

**Cinvestav**  
Unidad Irapuato

---

## **Interacciones ecológicas que producen sinergismo o antagonismo**

*Estudio de las interacciones ecológicas que producen synergismo o antagonismo entre papaya mosaic virus, papaya ringspot virus y la planta de papaya a nivel molecular*

Tesis de Doctorado del Programa de Biotecnología de Plantas

**GABRIELA CHÁVEZ CALVILLO**



TESIS DE DOCTORADO 2016:FEBRERO

## **Interacciones ecológicas que producen sinergismo o antagonismo**

Estudio de las interacciones ecológicas que producen synergismo o antagonismo entre *papaya mosaic virus*, *papaya ringspot virus* y la planta de papaya a nivel molecular

GABRIELA CHÁVEZ CALVILLO

Departamento de Ingeniería Genética  
*Laboratorio de Interacciones Planta-Virus*  
CINVESTAV, IRAPUATO  
Guanajuato, México 2016

Interacciones ecológicas que producen sinergismo o antagonismo  
Relaciones ecológicas complejas entre *papaya mosaic virus*, *papaya ringspot virus* y  
la planta de papaya a nivel molecular  
CHAVEZ-CALVILLO, G.

© CHAVEZ-CALVILLO, 2016.

Supervisor: Laura Silva Rosales, Cinvestav, Irapuato  
Sinodales:  
Rafael Rivera Bustamante, Cinvestav, Irapuato  
Mauricio Carrillo Tripp, Cinvestav, Langebio  
John Délano Frier, Cinvestav, Irapuato  
Tzvetanka Dimitrova Dinkova, UNAM, Facultad de Química

Tesis de Doctorado 2016:2  
Departamento de Ingeniería Genética  
Cinvestav, Irapuato  
Guanajuato, México

Typeset in L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X  
Impreso por ....  
Guanajuato, México 2016

A mis padres, Margarita Calvillo Aranda y Gabriel Chávez Carrasco,  
por su amor por la vida, la ciencia, la educación y hacia sus hijos

Guanajuato, México 2016



## Abstract/Resumen

Antagonism between unrelated plant viruses has not been thoroughly described. Our studies showed that two unrelated viruses, Papaya ringspot virus (PRSV) and Papaya mosaic virus (PapMV) produce different symptomatic outcomes during mixed infection depending on the inoculation order. Synergism occurs when plants are inoculated first with PRSV or in plants inoculated simultaneously with PRSV and PapMV. Conversely, antagonism occurs when plants are inoculated first with PapMV and later inoculated with PRSV. During antagonism, elevated pathogenesis-related (PR-1) gene expression and increased reactive oxygen species (ROS) production indicated the establishment of a host defense response, resulting in reduction in PRSV titers. Polyribosomal fractioning showed that PRSV affects translation of cellular eEF1 $\alpha$ , PR-1,  $\beta$ -tubulin, and PapMV RNAs *in planta*, suggesting that PRSV symptoms could be related to an imbalance in the translation machinery. Our data suggest that primary PapMV infection activates a defense response against PRSV and establishes a protective relationship in the papaya host.

Las relaciones antagónicas entre virus de plantas no relacionados no se conocen a profundidad. Este trabajo mostró que dos virus no relacionados, el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) y el virus del mosaico de la papaya (PapMV) producen diferentes resultados sintomáticos durante la infección mixta en función del orden de su inoculación. El sinergismo se produce cuando las plantas son inoculadas primero con PRSV o en plantas inoculadas simultáneamente con PRSV y PapMV, mientras que el antagonismo se produce en las plantas inoculadas primero con PapMV y posteriormente inoculadas con el PRSV. Durante el antagonismo, la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR-1) y el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) indican el establecimiento de una activación de las respuestas de defensa del hospedero que resulta en la reducción de los títulos de PRSV. Un fraccionamiento poliribosomal mostró que PRSV afecta la traducción celular del gen eEF1 $\alpha$ , PR-1,  $\beta$ -tubulina y del primer marco de lectura abierto (ORF1) de PapMV *in planta*, lo que sugiere que los síntomas de PRSV podrían estar relacionados con un desequilibrio en la maquinaria de traducción. Nuestros datos sugieren que la infección primaria por PapMV activa una respuesta de defensa contra PRSV y establece una relación protectora con la papaya, su hospedero.

Palabras clave: PapMV, PRSV, antagonismo, sinergismo, ROS, SAR, RNAi, infecciones mixtas, coevolución.



## Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado a través del registro de CVU con número 291952, así como a todos los contribuyentes que son los que hacen posible que haya ciencia en México.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) unidad Irapuato por el buen diseño del plan de estudios y las excelentes cátedras brindadas a lo largo de este periodo de formación profesional, las magníficas instalaciones de primer nivel y los recursos destinados a este proyecto.

Al proyecto SAGARPA-papaya, a las empresas y a las personas que financiaron esta investigación.

A mi asesora la Dra. Laura Silva Rosales, por darme libertad y dejarme aprender de mis propios errores. Por todos estos años de darme cabida en su laboratorio y financiar mis hipótesis a veces descabelladas.

Al Dr. Mauricio Carrillo Tripp, por dedicarme tiempo, amistad y por su apoyo con la parte bioinformática. Y a todo su valioso grupo de investigación: A Gabriel Jiménez (François) por su ayuda con los scrips en R, a Araceli Fernández por su valiosa ayuda con Jbrowse, a José Marcos Falcón por su apoyo en la formalización de las ecuaciones, a Armando Díaz, a Yardená González, a Julián por su apoyo, sus risas y su confianza para sentirme parte de la manada.

A los valiosos investigadores que formaron parte de mi comité tutorial, por sus comentarios, críticas y sugerencias a este trabajo: Dr. Mauricio Carrillo Tripp, Dr. Rafael Rivera Bustamante, Dr. John Délano Frier y en especial a la Dra. Tzvetanka Dimotrova Dinkova por permitirme aprender y realizar los experimentos de polisomas en su laboratorio en la Facultad de Química de la UNAM.

Al Dr. Diego González de León por sus críticas objetivas y atinadas a este trabajo. Al personal de la secretaría académica: A Dora Anguiano y a Diana Barbosa por su insuperable apoyo, su eficiencia y agilidad con inscripciones, trámites, calificaciones, becas, congresos, etc. Pero sobre todo por ser personal amable, confiable y muy eficiente.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación profesional y personal, con enseñanzas, consejos y largas charlas sobre ciencia, filosofía o historia: Dr. Blanco, Dr. Neftalí, Dr. Rivera, Dr. González de la Vara.

Al mis colaboradores y amigos: Javier Mora, Carlos A. Contreras Paredes, a Isaac Rodríguez, por sus ideas y su calidad profesional, sin duda unos investigadores con muchísimo futuro que espero siempre tener de mi lado.

A Fulgencio Alatorre Cobos por su infinita ayuda, amistad y confianza.

A Shreya Sahana, Swarnalok De, Andres Lômus y en especial a Kristiina Mäkinen.  
A mis amigos polares: Eerika, Irma, Alex, Alexandra, Umair, Tania, Cezary, Barbara, Juan, Susan, Douwe, Yoland, Vivian, Anisha, Karina, Uyen, Jerry, Anna y Rafa.

A mis compañeros de generación: Elvira, Andrea, Ricardo, Fernanda, Fernando, Ana, etc.

A mis estudiantes: Domitila Jarquín, Joel Romero, Abigail Ramírez, Gloria Hernández.

A mi familia: a mi madre, mi padre, mis hermanos Rockan y Carlos Alberto, mis tios Rafa, Vero, Tucky, Martín, Arfo, Chino, Gaby, a mis abuelas Queta y Chayo, a mis primos Rufus y Mapipos.

Y sobre todo a la persona mas importante en mi vida, mi apoyo, mi amigo, mi esposo, mi colaborador, un científico de gran envergadura y una persona única, a la que le debo en gran parte este trabajo, a mi amor: Javier Mora Macias.

Chávez-Calvillo, Guanajuato, Febrero 2015

# Contenido

Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XIX
<b>1. Lista de Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>3</b>
2.1. La Antigua, Veracruz . . . . .	4
2.2. Virus: una pequeña introducción . . . . .	5
2.3. Interacciones ecológicas entre organismos . . . . .	6
2.3.1. Interacciones sinérgicas . . . . .	7
2.3.2. Interacciones antagónicas . . . . .	10
2.3.2.1. Mutualismo condicional . . . . .	13
2.4. Mecanismos de defensa . . . . .	14
2.4.0.2. Resistencia Sistémica Adquirida . . . . .	15
2.4.0.3. RNAi . . . . .	17
2.5. <i>Carica papaya</i> . . . . .	18
2.6. Papaya Mosaic Virus . . . . .	20
2.7. Papaya Ringspot Virus . . . . .	22
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivos . . . . .	25
<b>4. Métodos</b>	<b>27</b>
4.1. Obtención del material biológico . . . . .	27
4.1.1. Plantas de papaya a partir de semillas . . . . .	27
4.1.2. Plantas de papaya micropropagadas . . . . .	28
4.2. Generación de construcciones genéticas . . . . .	28
4.2.1. Generación de la biblioteca de fragmentos del icDNA de PapMV . . . . .	29
4.3. Titulación de virus . . . . .	29
4.3.1. Preparación del estándar para PapMV y PRSV . . . . .	30
4.4. Procedimientos de inoculación . . . . .	31
4.5. Cuantificación del daño . . . . .	31
4.6. Estimación de proteína viral . . . . .	32
4.7. Evaluación de la traducción . . . . .	33
4.8. Medición de especies reactivas de oxígeno . . . . .	34
4.9. Líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	34

4.10. Análisis de RNAs pequeños . . . . .	35
<b>5. Resultados</b>	<b>37</b>
5.1. Infecciones mixtas descritas en México . . . . .	37
5.2. Caracterización de las infecciones simples . . . . .	38
5.3. Titulación de los inóculos . . . . .	39
5.4. Caracterización de las infecciones simples . . . . .	42
5.4.1. Caracterización fenotípica . . . . .	42
5.5. Caracterización de las infecciones mixtas . . . . .	44
5.5.1. Caracterización fenotípica . . . . .	44
5.6. Análisis de siRNAs . . . . .	51
5.6.1. vsiRNAs . . . . .	54
5.6.2. miRNAs . . . . .	56
5.7. Respuesta de la planta a la infección viral . . . . .	57
5.8. icDNA autoreplicativo de PapMV y PRSV . . . . .	58
5.9. Generación de plantas de <i>A. thaliana</i> susceptibles a PapMV . . . . .	61
<b>6. Discusión</b>	<b>67</b>
6.1. Sinergismo . . . . .	67
6.2. Antagonismo . . . . .	68
6.3. PRSV, el maestro de la traducción . . . . .	69
6.4. PapMV desencadena una respuesta de defensa en la planta . . . . .	70
<b>7. Conclusiones</b>	<b>73</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>75</b>

# Índice de figuras

2.1.	Producción nacional de papaya por estado. En verde se muestran los datos de 2003, en azul los datos obtenidos en 2014. Con información tomada del SIAP-SAGARPA. . . . .	4
2.2.	Producción de papaya por municipio en el estado de Veracruz. . . . .	5
2.3.	Fenotipos de las interacciones sinérgicas entre PVX-potyvirus en <i>N. benthamiana</i> (arriba) y <i>N. tabacum</i> (abajo). Las plantas de la derecha fueron inoculadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo) con PVX, Mock, PVY, PVX+PVY. Las plantas de la izquierda fueron inoculadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo) con PVX, Mock, TEV, PVX+TEV y fotografiadas a los 12 dpi. Imagen modificada de (González-Jara et al., 2004) . . . . .	10
2.4.	Protección cruzada inducida por TRV-GFP (imagen tomada de la publicación de (Ratcliff et al., 1999)). . . . .	12
2.5.	Los macrófagos son activados mediante la infección latente por $\gamma$ -HV68. En el panel (a) macrófagos de los ratones sanos (b) macrófagos de los ratones que ratones presentaban una infección latente de herpes virus $\gamma$ -HV68. Se graficaron los conteos de CFU a las 0, 6 y 12 horas después de la infección con <i>L. monocytogenes</i> , en los ratones sanos o tratamiento Mock, en negro (c) y en los ratones que presentaban una infección latente de herpes virus $\gamma$ -HV68, en rojo (d). . . . .	13
2.6.	Incremento en la inmunidad innata de ratas con infección latente de $\gamma$ -HV68 herpes virus. En el panel (a) se graficaron las tasas de sobrevivencia de los ratones con infección latente (línea roja) y el grupo control de ratones sanos (línea negra), desde el día 1 hasta el día 28 posteriores a la inoculación con <i>L. monocytogenes</i> . En el panel (b) se graficaron las medias y la desviación estándar de los niveles de citocinas a los 28 dpi y a los 41 dpi, de ratones ratones con infección latente (barras rojas) y el grupo control de ratones sanos (barras negras). Imagen tomada de (Barton et al., 2007). . . . .	14
2.7.	El modelo de Zig-Zag ilustra el desarrollo de los mecanismos que involucran el sistema de defensa de las plantas (Jones and Dangl, 2006). . . . .	17
2.8.	Para contra-atacar la respuesta antiviral, los virus codifican supresores de silenciamiento como es el caso de la proteína potyviral HC-Pro. Figura modificada de ViralZone . . . . .	19
2.9.	Organización del genoma en 9 cromosomas de <i>C. papaya</i> . . . . .	20

2.10.	Comparación del número de genes que codifican para factores de transcripción y otras familias de genes entre <i>Arabidopsis</i> and <i>Carica papaya</i> (Zhang et al., 2014). . . . .	20
2.11.	Organización del genoma de los potexvirus (tomada de ViralZone) . . . . .	22
2.12.	Organización del genoma de los potyvirus (imagen tomada de ViralZone) . . . . .	23
4.1.	Especies de plantas utilizadas en esta tesis: <i>C. papaya</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>A. thaliana</i> . . . . .	27
4.2.	Diagrama que muestra la organización del vector de entrada pDONR de todas las construcciones generadas con tecnología <i>Gateway</i> . . . . .	28
4.3.	Diagrama de la organización del vector pFAST-G02 . . . . .	29
4.4.	Escala $\delta$ comparativa para evaluar los cambios en las hojas de papaya producidos por infecciones virales simples o mixtas. . . . .	33
5.1.	Síntomas observados en las infecciones simples y mixtas por PRSV y/o PapMV en plantas de papaya utilizadas para generar la escala de daño y metodología empleada para asignar los valores de $\delta$ . . . . .	38
5.2.	Partículas virales teñidas con ácido fosfotúngstico observadas en un microscopio electrónico. Un fondo de color ha sido sobrepuesto artificialmente al procesar la fotografía por medio de un editor de imagen. Panel A. Micrografía electrónica de partículas de PapMV, B. Micrografía electrónica de partículas de PRSV, C. RT-PCR con oligomeros multiplex para diagnóstico diferencial, la banda superior indica el fragmento correspondiente a la CP de PapMV, la banda inferior corresponde a un gen endógeno ( $\beta$ -tubulina) utilizado como control. La banda indicada como $\alpha$ -CP PapMV, corresponde a la inmuno detección con anticuerpos contra la CP PapMV. En el panel D. Se observa el mismo sistema de diagnóstico RT-PCR triplex, en este caso la banda superior corresponde al fragmento de la CP de PRSV y en la inmunodetección se utilizaron $\alpha$ -CP PRSV. . . . .	40
5.3.	Curvas estándar utilizadas para la estimación de partículas virales de PapMV (en círculos verdes) y PRSV (en rombos anaranjados) en tejido de hoja de papaya. En el eje de las ordenadas se graficaron los valores promedio de $C_T$ obtenidos en el qPCR, en el eje de las abscisas se graficaron los valores (en ng) correspondientes a la cantidad conocida de las diluciones de DNA utilizadas. Se generaron dos regresiones lineales independientes para cada virus y con ellas se estimó la cantidad en (ng) de RNA genómico contenida en el tejido infectado. . . . .	41
5.4.	Representación gráfica de la titulación de virus en hojas de papaya infectada con PRSV o PapMV. Las planta se dibujó como se observó cuando se realizó el corte de las hojas: 1 (la hoja más joven), 2 (la segunda hoja más joven), y 3 (la tercer hoja más joven) y la cantidad estimada de virus en ( $\mu$ g) correspondiente a cada virus: Para PRSV: Y1, Y2 y Y3. En el caso de PapMV: X1, X2 y X3. . . . .	41

5.5.	Caracterización de las infecciones simples. En el panel A. Fenotipos de las plantas inoculadas con Mock (plantas control), PapMV o PRSV a los 50 dpi. B. Gráfico que muestra la progresión de la severidad de los síntomas (evaluado a través del $\delta$ ) en las infecciones simples a lo largo de 50 días posteriores a la inoculación. C. Gráfico que muestra la estimación de la abundancia relativa de los virus PapMV (en verde) y PRSV (en anaranjado), por RT-qPCR a los 5 dpi y a los 50 dpi. . . . .	43
5.6.	Fenotipos de plantas infectadas con buffer (Mock), PapMV, PRSV y coinfectadas con PapMV y PRSV a los 60 dpi. . . . .	43
5.7.	Fenotipos de las plantas infectadas con PapMV y PRSV en infecciones mixtas y secuenciales a los 60 dpi. . . . .	44
5.8.	Severidad de los síntomas y abundancia relativa de los RNAs genómicos en los tratamientos control: Mock→PapMV y Mock→PRSV, comparados con las infecciones PRSV→PapMV y PapMV→PRSV respectivamente. A. Progesión de la severidad de los síntomas (estimado por $\delta$ ) a lo largo de 60 dpi en dichos tratamientos. B. Acumulación viral de PapMV (en negro) y PRSV (en blanco) estimada por RT-qPCR a los 5 dpi y a los 60 dpi, el gen eIF4E fue utilizado para normalizar por medio del método de $\Delta\Delta C_T$ . La prueba de $t$ mostró diferencias significativas para $**p = 0,0088$ y $***p = 0,0003$ respectivamente. C. Acumulación viral de Mock (en gris), PapMV (en negro) y PRSV (en blanco) estimada por RT-qPCR a los 60 dpi, el gen eIF4E fue utilizado para normalizar por medio del método de $\Delta\Delta C_T$ . La prueba de $t$ no mostró diferencias significativas entre la acumulación viral de PapMV entre los tratamientos Mock→PapMV y PapMV así como tampoco hubo diferencias significativas en la acumulación de PRSV entre los tratamientos Mock→PRSV y PRSV a los 60 dpi. . . . .	46
5.9.	Caracterización fenotípica de las interacciones sinérgicas «S» y la interacción antagónica «A». (A) Cinética de la severidad de los síntomas, usando $d$ a lo largo de 60 dpi, (B) fenotipos característicos de la primer hoja sistémica, (C) medición de clorofila $a$ y $b$ . Grupos de plantas: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi . . . . .	48
5.10.	Abundancia relativa de los RNAs genómicos (A), RNAs intermedarios de replicación viral (B) y acumulación de proteína de la cápside (C) en los tratamientos: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. . . . .	49
5.11.	Abundancia relativa de los RNAs genómicos de PapMV (en barras sólidas negras) y PRSV (en barras sólidas blancas) y acumulación de proteína de la cápside de PapMV (en barras rayadas negras con blanco) y de PRSV (en barras blancas con negro) en los tratamientos: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. Un análisis de varianza fue utilizado para identificar diferencias estadísticas entre tratamientos, los resultados de una prueba <i>post-hoc</i> (análisis de Tukey) son mostrados con las letras a, b y c. . . . .	50

5.12. Perfiles poliribosomales (A) y RT-PCRs (B) de las 8 fracciones obtenidas a través de la separación por medio de un gradiente continuo de sacarosa del 15 % al 60 % de los RNAs mensajeros ligeros o no asociados a poliribosomas (fracciones 1-2) y RNAs mensajeros pesados o asociados a poliribosomas (fracciones 3-8) de tejidos de papayas inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV colectado a los 60 dpi. . . . .	52
5.13. Esquema general del análisis de datos de la secuenciación masiva de RNAs pequeños por Illumina. . . . .	53
5.14. Perfiles de RNAs pequeños de 20 a 24 nucleótidos, mapeados hacia los genomas de papaya, PapMV y PRSV en plantas inoculadas con buffer (Mock), PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. . . . .	54
5.15. Perfiles de vsiRNAs en plantas: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. En rojo se observan las lecturas que corresponden al genoma viral en sentido 5' → 3', en azul se observan las lecturas que corresponden al genoma viral en sentido 3' → 5' de A. PapMV ó B. PRSV. . . . .	55
5.16. Mapa de calor en donde se graficó el logaritmo en base 2 de las veces de cambio (log2FoldChange) de la acumulación de microRNAs en plantas inoculadas con PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV diferencialmente al tratamiento control (Mock) a los 60dpi. El color rojo se utilizó para representar las veces de cambio «negativo», el color azul representa las veces de cambio «positivo». En análisis jerárquico de arriba se realizó aleatoriamente para agrupar aquellos los tratamientos que tuvieran miRNAs similarmente acumulados. El análisis jerárquico de la izquierda fue secundario y se realizó para agrupar la acumulación de los miRNAs. . . . .	57
5.17. Respuesta diferencial de PR-1 y ROS a las infecciones virales. A. Expresión relativa del gen PR-1 (barras sólidas en negro) en plantas de papaya inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PapMV+PRSV, PRSV→PapMV, y PapMV→PRSV analizado en tejido de hoja sistémica a los 60 dpi. Un análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey posterior mostró los tratamientos que presentan diferencias estadísticas representadas por *, ** y *** B. Tinción histoquímica del ion superóxido (O <sup>2</sup> ) usando cloruro de nitro azul tetrazolio (NBT) tomadas a los 60 dpi a partir de hojas sistémicas inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PapMV+PRSV, PRSV→PapMV, y PapMV→PRSV .	59
5.18. Representación esquemática de la reacción de Gibson. . . . .	60
5.19. Representación esquemática de la reacción de Gibson para generar el icDNA de PapMV. . . . .	62
5.20. Semillas T <sub>1</sub> de las plantas de <i>A. thaliana</i> agroinfiltradas, observadas por medio de un microscopio estereoscópico, a la izquierda bajo luz visible, a la derecha con un filtro para detectar GFP. . . . .	63

---

5.21. Semillas T <sub>3</sub> de las plantas <i>A. thaliana</i> observadas por medio de un microscopio estereoscópico, a la izquierda bajo luz visible, a la derecha con un filtro para detectar GFP. Como puede observarse para ambas líneas ya no existe segregación, lo que confirma que las líneas son homocigotas. . . . .	63
5.22. RT-PCR con primers para amplificar el transgen insertado <i>C. papaya</i> eIF4E o eIF(iso)4E en las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> . Los cDNAs utilizados fueron obtenidos a partir de la extracción de RNA de plantas Col-0 ( <i>A. thaliana</i> "silvestres"), 35S::C.p.eIF4E ( <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes del <i>C. papaya</i> eIF4E o del eIF(iso)4E), y plantas de papaya ( <i>C. papaya</i> ). Una reacción sin cDNA fue utilizada como control negativo (H <sub>2</sub> O). . . . .	64
5.23. RT-PCRs e inmuno detecciones (o westernblots) realizadas para identificar la presencia de los RNAs genómicos y la proteína de la cápside de PapMV y/o PRSV en las líneas transgénicas homocigotas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes del eIF4E y eIF(iso)4E de papaya inoculadas con PapMV y/o PRSV. Se tomaron hojas sistémicas asintomáticas a los 33 dpi. . . . .	65



# Índice de tablas

4.1. PapMV: preparación de diluciones seriales 1:5 v/v a partir de 100 ng de plásmido . . . . .	31
4.2. PRSV: preparación de diluciones seriales 1:10 v/v a partir de 10 ng de plásmido . . . . .	31
5.1. Oligos para construcción de icDNA de PapMV . . . . .	60
5.2. Oligos para construcción de icDNA de PRSV . . . . .	61
5.3. Biblioteca de fragmentos para la construcción del icDNA de PapMV .	61



# 1

## Lista de Abreviaturas

(-) RNA, cadena negativa de RNA  
(+) RNA, cadena positiva de RNA  
AGO, proteína argonauta  
CP, *coat protein*  
dpi, día o días post inoculación  
dsRNA, *double stranded RNA*  
ETS, *Effector-triggered susceptibility*  
GFP, *Green fluorescent protein*  
GUS,  $\beta$ -glucoronidasa  
HC-Pro, *Helper component proteinase*  
icDNA, cDNA infeccioso  
MAMPs, *Microorganism-associated molecular patterns*  
miRNA, micro RNA  
NBS-LRR, *Nucleotide-binding site leucine-rich repeat*  
PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*  
PapMV, *Papaya Mosaic Virus* (potexvirus)  
PRSV, *Papaya RingSpot Virus* (potyvirus)  
PTGS, *Post-transcriptional gene silencing*  
PTI, *PAMP (or MAMP)-triggered immunity*  
PVX, potato virus X  
PVY, potato virus Y  
RISC, *RNA interference silencing complex*  
RNAi, RNA de interferencia  
ROS, *Reactive Oxygen Species*  
SAR, *Systemic Acquired Resistance*  
siRNA, RNA pequeño interferente  
ssRNA, RNA de una sola hebra  
vsiRNA, RNA pequeño interferente derivado de virus  
X, papaya mosaic virus (por potexvirus)  
Y, papaya ringspot virus (por potyvirus)

## 1. Lista de Abreviaturas

---

# 2

## Introducción

“ *Aniquila virus a la papaya en La Antigua, Veracruz. La enfermedad de la mancha anular tiene al campo papayero completamente destruido. Campesinos se desaniman, prefieren dejar perder la cosecha o 'rematarla' a intermediarios. La historia de cómo un virus mantiene al borde de la extinción al sector papayero en el estado de Veracruz, esta tragedia trae pobreza, desnutrición y quiebra la esperanza de las familias que dependen de la producción de este fruto.* ”

---

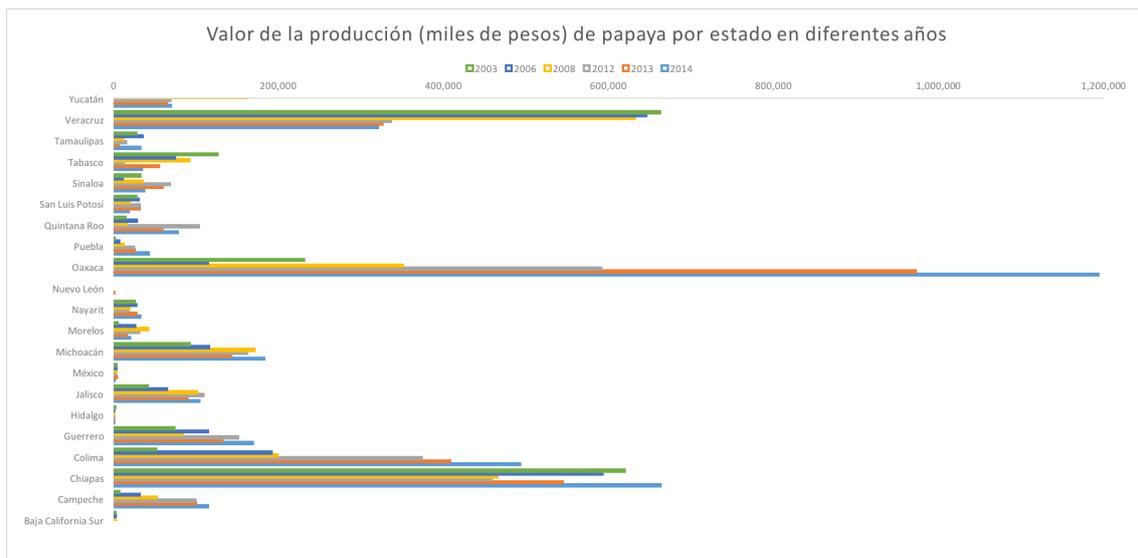
La Antigua, Veracruz, *Esperanza Morales*, La Jornada del Campo, Agosto de 2015



## 2.1. La Antigua, Veracruz

El estado de Veracruz se perfilaba como el principal productor de papaya en México (ver Fig. 2.1). En particular, el municipio de La Antigua, Veracruz generaba en 2003 una producción papayera anual calculada en \$385,371,000 de pesos. Hoy, el valor de su producción anual se calcula en apenas 22 mil pesos, según cifras del SIAP-SAGARPA (Ver Fig. 2.2).

La producción de esta fruta se vio severamente afectada por la enfermedad que produce el virus de la mancha anular de la papaya, provocando pérdidas de entre el 80 al 100 % de los cultivos. En el gráfico 2.1 se observa como durante 2003 (en verde), 2006 (en violeta) y hasta 2008 (en amarillo), el estado de Veracruz junto con Chiapas eran los líderes en la producción. Sin embargo, Chiapas mantiene su producción hasta la fecha (en anaranjado), y Veracruz sufre una caída drástica en su producción a partir del 2012 (en gris) que continúa hasta la fecha. El estado de Oaxaca en cambio, tiene un incremento importante durante esos años, lo que ha ayudado a compensar el valor de la producción nacional.



**Figura 2.1:** Producción nacional de papaya por estado. En verde se muestran los datos de 2003, en azul los datos obtenidos en 2014. Con información tomada del SIAP-SAGARPA.

En el caso de la producción de papaya por municipio en el estado de Veracruz (Fig. 2.2), es posible observar que durante 2003 (en verde), La Antigua logró generar hasta casi 400,000,000 de pesos y en 2014 (en anaranjado) tristemente apenas alcanzó los 20 mil pesos al año. Esto impactó directamente en el poder adquisitivo, desarrollo y bienestar de las familias que dependen de la producción y comercialización de este cultivo y trajo consigo marginación y pobreza a esa comunidad.

En 2008, México se colocaba en el segundo lugar a nivel mundial en la producción de esta fruta. Hoy, ocupa el lugar número cinco. Pese a eso, sigue siendo el principal

exportador de papaya en el mundo. El árbol de papaya crece en climas tropicales y subtropicales, es endémico de la región centro de América y los países que han sabido impulsar la producción de papaya son India, Brasil, Indonesia y EUA en el estado de Hawai.

La historia de La Antigua, Veracruz, es un caso entre muchos otros, de cómo las enfermedades virales en plantas conducen al fracaso de la producción en regiones que tienen todas las condiciones climáticas, de abastecimiento de agua y demográficas que tienen todo el potencial para ayudar a consolidar la soberanía alimentaria.

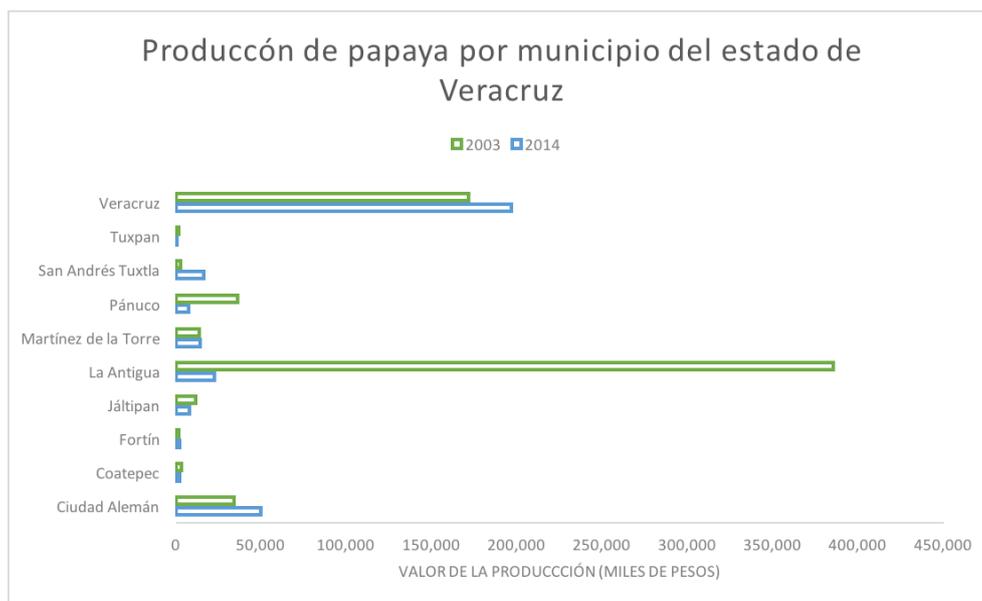


Figura 2.2: Producción de papaya por municipio en el estado de Veracruz.

## 2.2. Virus: una pequeña introducción

¿Qué son los virus? -Un joven estudiante le pregunta al profesor emérito Sir Peter Medawar, en una charla en donde se discute el origen de los virus y su clasificación. Él, se detiene a pensar un momento y aún meditando le responde «*a piece of bad news wrapped up in a protein*».

Existen opiniones diversas sobre si los virus son una forma de vida o sólo son estructuras orgánicas que interactúan con los seres vivos. Debido a que comparten algunas características compatibles con «*la vida*», como genomas que contienen marcos de lectura abiertos y elementos de regulación en *cis*, evolucionan por selección natural. Por otro lado, carecen de estructura celular, (la cual según la teoría celular es considerada la unidad básica de la vida) y no tienen metabolismo autónomo (Elena et al., 2014; Werner et al., 2014).

Son controladores implacables de los ciclos biogeoquímicos del planeta y el depósito

de la mayor diversidad genética inexplorada de la Tierra. Son, por mucho, las más abundantes «formas de vida» sobre la tierra. Los virólogos estiman que hay  $10^{30}$  partículas solamente en el mar, y que, si se apilaran de extremo a extremo, podrían extenderse más allá de las 60 galaxias más cercanas. Los virus infectan probablemente todos los seres vivos: bacterias, arqueas, insectos, plantas y animales (Suttle, 2007; Culley et al., 2006; Angly et al., 2006). Generan una variedad de efectos estructurales y bioquímicos sobre sus hospederos que van desde lisis celular, alteraciones en su membrana y otros organelos, ciclo celular, modificaciones en la cromatina o reclutamiento de maquinaria traduccional, entre otros. Sin embargo, no todos causan cambios aparentes en la célula infectada, ya que algunos pueden permanecer latentes por largos periodos sin producir cambios en la homeostasis de la célula, e incluso ceder o intercambiar genes con su hospedero (Syller, 2012).

Dado que los virus utilizan la maquinaria de una célula huésped para reproducirse son patógenos biotróficos intracelulares obligados. Por lo tanto, el control de las enfermedades provocadas por virus es un gran reto. No hay ningún tratamiento efectivo contra las enfermedades virales. Los enfoques más eficientes para su control se limitan a una sola estrategia: generación de resistencia o, en muchos casos tolerancia.

### 2.3. Interacciones ecológicas entre organismos

“ Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place.

”

---

Red Queen, *Lewis Carol*, Through the Looking-Glass

Cuando dos o más especies tienen interacciones tan cercanas, que afectan recíprocamente su mutua evolución, el cambio en una especie que produce presión de selección sobre la otra, genera una carrera descrita como la teoría «*arms race*» pues desarrolla nuevos y continuos alelos de resistencia y virulencia (Kovalchuk et al., 2013; Ausubel, 2005; Aziz et al., 2010). Estas relaciones ecológicas incluyen:

- Parasitismo
- Competencia
- Mutualismo

La vida es una competencia por ocupar un nicho del cual abastecer las necesidades de carbono y otros elementos indispensables para fabricar las moléculas orgánicas que le permitirán perpetuar su información genética a través del paso del tiempo.

Los virus son patógenos biotróficos que dependen de sus hospederos para llevar a cabo todas sus funciones. Esta relación tan estrecha, genera eventos de coevolución patógeno-virus que pueden llegar a ser muy complejos. Si bien se consideran patógenos, algunos virus no provocan fenotipos de enfermedad en sus hospederos o generan poco daño celular. Cuando influyen en la composición de las comunidades ecológicas causando enfermedad, potencialmente introducen una nueva variable de presión de selección en un organismo, o en los virus de la progenie, impulsando así la evolución del hospedero y de su propia progenie viral. Aquellos virus que logran coexistir con su hospedero, generalmente tienen mayores tasas de morbilidad y búsqueda de otros hospederos (Syller, 2012, 2000; Elena, 2008; Roossinck, 2013, 2011).

Los virus que producen la muerte en sus hospederos sin llegar a generar la suficiente progenie, no logran sobrevivir como especie con el paso del tiempo. En humanos, datos epidemiológicos revelan cómo los virus más infecciosos son también los menos virulentos, por ejemplo: el virus de la rabia, alcanza una mortalidad del 99 % pero su morbilidad apenas llega al 1 %. En cambio, el virus del herpes simple, en un 70 % de la población humana es asintomático, y no produce mortalidad alguna (0.00 %), pero su morbilidad es altísima, ya que el 90 % de los seres humanos tiene anticuerpos contra el virus del herpes simple tipo I (cifras tomadas de la organización mundial de la salud o WHO).

Lo que nos dicen estos datos estadísticos es que los virus sobrellevan la batalla contra el tiempo haciendo un balance entre el daño que produce el uso de recursos celulares para su replicación, transcripción, traducción, encapsidación y propagación, y la pérdida de la homeostasis de la célula que infectan. El equilibrio entre estos dos aspectos es la clave para entender un concepto relativamente nuevo para la ciencia, pero uno de los primeros que influenciaron en el origen de la vida: «*el mutualismo condicional*» (Roossinck, 2011).

Este trabajo pretende retomar un enfoque holístico de los procesos infecciosos en plantas, desde un punto de vista ecológico, evolutivo y molecular, e intenta dilucidar qué procesos subyacen a los fenotipos contrastantes antagonico-sinérgico en un modelo de estudio que tiene implicaciones económicas importantes.

### 2.3.1. Interacciones sinérgicas

El hecho de que los virus sean mucho más abundantes en número que sus hospederos, implica que la probabilidad de que un hospedero se infecte con dos o más virus en un mismo periodo de tiempo es muy alta (Culley et al., 2006; Rosario et al., 2009; Kristensen et al., 2010; Angly et al., 2006; Aziz et al., 2010; Edwards and Rohwer, 2005).

Muchas de las enfermedades virales, son en realidad el resultado del conjunto de interacciones entre dos o más agentes infecciosos con su hospedero. Y aunque la

## 2. Introducción

---

microbiología clásica se ha enfocado a estudiar los procesos infecciosos asociados a una sola especie de virus, estos estudios no pueden explicar algunos fenotipos diferenciales que suceden en la naturaleza en donde al aislar el agente infeccioso, es imposible repetir los fenotipos de la enfermedad que provocó en el hospedero original.

Las infecciones mixtas en plantas pueden provocar un fenómeno conocido como *sinergismo*, que se define como el incremento en la severidad de los síntomas relacionado a la interacción entre los virus y/o sus componentes con su hospedero, comparado con las infecciones que ocurren en forma individual.

Una de las infecciones mixtas mejor estudiadas ha sido la coinfección de PVX (*potato virus X*) y PVY (*potato virus Y*) en *Nicotiana tabacum*. Los reportes datan de 1955, en donde Frank Ross y colaboradores reportaron detalladamente la relación que existe ente el incremento en la severidad de los síntomas y la cantidad de virus (Rochow and Ross, 1955).

El trabajo de Ross y colaboradores identificó dos fases de la enfermedad sinérgica que dependen del «*timing*» de la infección. Estos autores establecieron que cuando los virus son co-inoculados, se genera una fase aguda que se manifiesta en las primeras hojas no inoculadas que desarrollan síntomas, en dónde detectaron un incremento en la acumulación del RNA potexviral aunado al incremento en la severidad de los síntomas de la enfermedad. Posterior a la fase aguda, reportaron que la enfermedad entra en una fase crónica, que se manifiesta en las hojas más jóvenes que se diferenciaron posterior a la inoculación, en donde el aumento tan dramático en PVX no fue tan evidente aunque los síntomas fueron severos (Rochow and Ross, 1955).

Años más tarde, identificaron que esto se debe a que durante la fase aguda de la enfermedad, no se produjo un incremento en el número de células infectadas, sino un aumento en la acumulación de PVX por célula (Goodman and Ross, 1974). Más tarde, Vicky Vance en los 90's, encontró que el nivel del templado de RNA (-) de PVX incrementó desproporcionalmente en la infección mixta PVX-PVY, induciendo el incremento en la acumulación de PVX como partícula, como anteriormente había sido descrito por Ross. Este fenómeno se relacionó con una desregulación en la replicación de PVX (Vance, 1991).

Más tarde Vance identificó a la proteína colaboradora conocida como HC-Pro como el elemento de PVY que está relacionado a la desregulación de PVX. Con este hallazgo demostró que la replicación de PVY no es requerida para producir sinergismo entre PVX-PVY, sino que es dependiente de la expresión de HC-Pro. (Vance et al., 1995)

HC-Pro es una proteína multifuncional codificada por los potyvirus. La porción carboxilo de la proteína tiene un dominio de proteasa, mientras que la región central estabiliza la CP y hace más eficiente la encapsidación del RNA viral. Así mismo, en la región amino se encuentra un dominio necesario para la transmisión por áfidos, este tiene un papel fundamental en la formación de los complejos de replicación, así como en el reclutamiento de los factores de inicio de la traducción necesarios

para el inicio de la síntesis de proteínas virales. Además, es indispensable para la infectividad, por lo que es considerado como un factor de patogenicidad relacionado a la actividad de supresión de RNA de silenciamiento (Roudet-Tavert et al., 2007; Siddiqui et al., 2008; Maliogka et al., 2012; Mangrauthia et al., 2008; Valli et al., 2011; Brigneti et al., 1998).

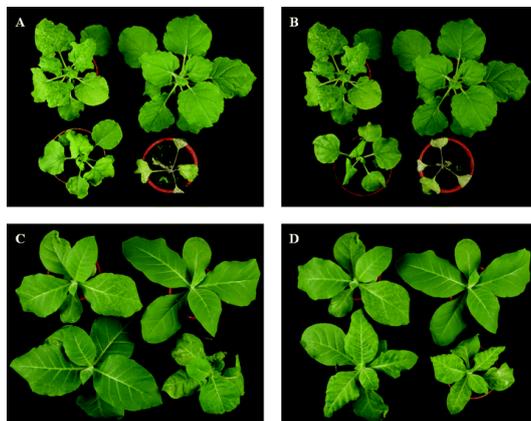
El grupo de investigación más fuerte en el estudio de la interacción sinérgica entre PVX-PVY en *N. tabacum*, del cual Vicky Vance forma parte, encontró que la infección por una mutante de PVY que carece de la secuencia que codifica para la proteína HC-Pro (PVY $\Delta^{HC-Pro}$ ), no es capaz de producir sinergismo cuando se coinocula con PVX. También encontraron que las líneas transgénicas sobreexpresantes de HC-Pro en *N. tabacum* (Ntab35S::HC-Pro) infectadas solamente con PVX, son capaces de reproducir el fenotipo sinérgico. A partir de éstos resultados, los autores propusieron que el mecanismo molecular que subyace al fenotipo sinérgico observado durante la coinfección de PVY-PVX es dependiente solamente de HC-Pro y que no requiere de ningún otro elemento de PVY (Vance et al., 1995).

Recientemente el grupo de investigación liderado por Juan Antonio García, demostró la capacidad de HC-Pro de unirse *in vitro* a RNAs pequeños interferentes (siRNAs) y RNAs pequeños interferentes derivados de virus (vsiRNAs). Estos resultados sugieren que el rol de esta proteína es secuestrar vsiRNAs de manera inespecífica para impedir su unión a las proteínas Argonauta, que son las responsables del reconocimiento y escisión de mensajeros, así como de bloquear la entrada de los mensajeros al proceso de traducción, impidiendo así la síntesis de proteínas (Roudet-Tavert et al., 2007; Valli et al., 2011).

Algunos autores han propuesto que debido a que HC-Pro es un poderoso supresor inespecífico de silenciamiento, su rol en el sinergismo debe estar relacionado a la actividad que tiene esta proteína como supresora del silenciamiento de RNA de interferencia. HC-Pro logra secuestrar RNAs pequeños interferentes derivados de ambos virus, y debido a que PVX no cuenta con esta proteína, la presencia de la HC-Pro potyviral en la infección mixta impide también el silenciamiento asociado a los RNAs de PVX incrementando así la cantidad de RNAs intermediarios de la replicación (Roudet-Tavert et al., 2007; Valli et al., 2011; Vance et al., 1995; Anandalakshmi et al., 1998; Vance, 1991; Mlotshwa et al., 2008).

Sin embargo, Tenllado y colaboradores publicaron un trabajo en 2004, en el cual manifiestan que no están seguros de que los eventos sinérgicos entre PVX y diversos potyvirus estén relacionados con la actividad de supresión de silenciamiento de RNA de proteínas potyvirales. Estos investigadores realizaron experimentos con diferentes asociaciones potex-potyvirus, en dos hospederos: *N. tabacum* y *N. benthamiana*, encontrando que el incremento en la acumulación de RNAs de PVX solamente ocurría en *N. tabacum* y no en *N. benthamiana* (ver figura 2.3). Aunque los fenotipos de severidad eran mucho más drásticos en *N. benthamiana* los autores sugieren que el sinergismo está más relacionado con una respuesta del hospedero que con un incremento en acumulación potexviral (González-Jara et al., 2004).

Más tarde, en 2012, el mismo grupo de investigación encontró que son moléculas de RNAs no codificantes de tipo microRNAs las que regulan una respuesta diferencial entre hospederos y que cambios asociados con estrés oxidativo son posiblemente los responsables del incremento de la severidad de los síntomas asociado a las infecciones mixtas (Pacheco et al., 2012).



**Figura 2.3:** Fenotipos de las interacciones sinérgicas entre PVX-potyvirus en *N. benthamiana* (arriba) y *N. tabacum* (abajo). Las plantas de la derecha fueron inoculadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo) con PVX, Mock, PVY, PVX+PVY. Las plantas de la izquierda fueron inoculadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo) con PVX, Mock, TEV, PVX+TEV y fotografiadas a los 12 dpi. Imagen modificada de (González-Jara et al., 2004)

### 2.3.2. Interacciones antagónicas

No todas las asociaciones ternarias entre virus y plantas son perjudiciales para el hospedero. Existen reportes de fenómenos en donde un virus, usualmente una cepa tenue (que origina lesiones de poca severidad), produce un efecto de *protección cruzada*, la cual se presenta cuando el hospedero previamente es infectado con esta, antes que con una cepa del mismo género de virus pero de una cepa velogénica o altamente virulenta (Gal-On and Shibolet, 2006).

Se han reportado diversos intentos por utilizar este efecto de la *protección cruzada* en cultivos comerciales en la década de los 80's. En Brasil se infectaron millones de árboles de cítricos con cepas benignas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV, por *Citrus tristeza virus*), mostrando en un inicio un buen control de la enfermedad. Sin embargo, a largo plazo hubo algunos problemas relacionados a la falta de efectividad debido a una protección incompleta, y una pérdida de control del mantenimiento de las cepas benignas por la generación de poblaciones virales mutantes que desarrollaban enfermedades en asociación con otros patógenos (Fulton, 1986). También existen aislamientos tenues de PRSV en papaya que han sido utilizados para generar *protección cruzada*, en este caso el hecho de que el virus es transmitido por un áfido vector genera cuellos de botella de las poblaciones virales con efectos impredecibles

(Fulton, 1986; Gonsalves and Ishii, 1980). Este es un fenómeno interesante, pero muy poco útil en el campo debido a que los virus requieren tener una alta similitud de secuencia, y por tanto sólo ocurre entre cepas del mismo virus.

Por otro lado, un trabajo previo reportó que las hojas más jóvenes de plantas de *N. tabacum* infectadas por nepovirus y caulimovirus no mostraron fenotipos de infección y estaban libres de virus; a este efecto se le llamó *recuperación* (Lindbo et al., 1993).

La inducción artificial de un estado antiviral que confiere resistencia a la infección por TEV mediante un mecanismo derivado de la degradación de RNAs virales por medio de la sobreexpresión en su versión traducible y no traducible del gen que codifica para la proteína de la cápside de TEV en plantas de *N. tabacum* fue demostrada más tarde por Lindbo y colaboradores en 1993 (Lindbo et al., 1993). Estos autores propusieron que la acumulación del transcrito inducido era capaz de inactivar moléculas homólogas de RNAs virales, previniendo así la infección y confiriendo resistencia (Lindbo et al., 1993).

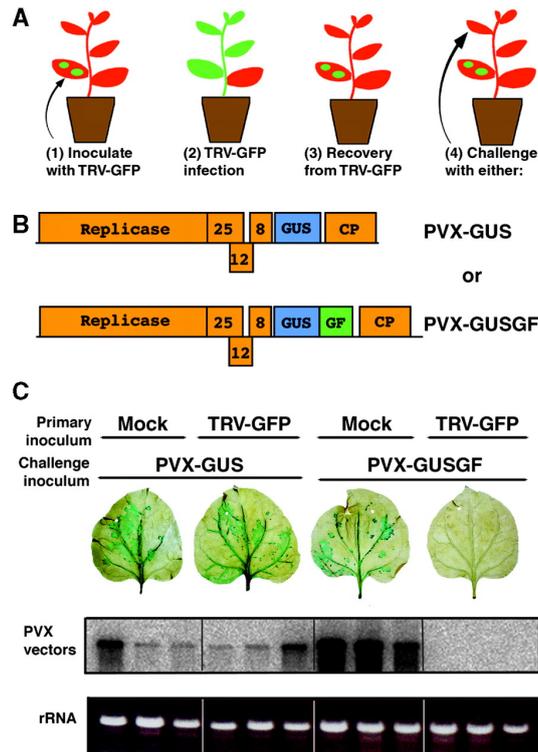
En 1996, el grupo de David Baulcombe propuso que tanto el fenómeno de *recuperación* como el de *protección cruzada* comparten el mismo mecanismo de defensa que subyace a esta especie de *resistencia*: el silenciamiento de RNAs mediado por RNAs de interferencia. Debido a la composición bioquímica de las moléculas a las que regulan, este fenómeno se nombró como silenciamiento de genes post-transcripcional o PTGS (de las siglas en inglés, post-transcriptional gene silencing) (Ratcliff et al., 1997, 1999; Baulcombe, 1996; Chapman et al., 1992; Lindbo et al., 1993).

Las bases moleculares que subyacen a este fenómeno fueron descritas por Ratcliff y colaboradores en 1999, quienes indujeron la *protección cruzada* a partir de plantas recuperadas de la infección por TRV-GFP. En la figura 2.4, tomada de ese trabajo (Ratcliff et al., 1999), se muestra un esquema del procedimiento experimental empleado para lograrla:

En (A), se muestra una representación esquemática del procedimiento experimental empleado. Las plantas se dibujaron como se observaron bajo iluminación UV.

En (B), se muestran las construcciones utilizadas para la reinoculación: PVX-GUS y PVX-GUSGF. Los marcos de lectura abierta de PVX se muestran como *Replicase* (es decir, la RNA polimerasa dependiente de RNA), las proteínas 25k, 12k, y 8K, y la proteína de cubierta (CP). Tanto PVX-GUS y PVX-GUSGF expresan el gen reportero GUS, además de lo cual PVX-GUSGF lleva 363 nucleótidos de la secuencia GFP.

En (C), se muestra la susceptibilidad de las hojas TRV-GFP-recuperadas retadas con PVX-GUS ó PVX-GUSGF. Plantas recuperadas de TRV-GFP y plantas inoculadas con buffer (Mock) fueron re-inoculados con transcritos *in vitro* de PVX-GUS o PVX-GUSGF a los 8 DPI. Siete días después, la acumulación de PVX se evaluó en las hojas inoculadas utilizando histoquímica con GUS. En las tres hojas restantes, la



**Figura 2.4:** Protección cruzada inducida por TRV-GFP (imagen tomada de la publicación de (Ratcliff et al., 1999)).

acumulación de PVX se evaluó mediante hibridación de RNA con un fragmento de DNA marcado con  $P^{32}$  correspondiente al gen GUS. Se muestra la banda genómica principal. Al final una tinción de bromuro de etidio del gel muestra la carga rRNA.

Dado que el TRV-GFP no tiene fragmentos homólogos a PVX-GUS, la inoculación de PVX-GUS en plantas *recuperadas* de la infección por TRV-GFP, no generó el silenciamiento de PVX-GUS, mientras que la sólo adición de un fragmento de 363 nt del extremo 5' de GFP a ese mismo icDNA (es decir PVX-GUSGF) tuvo el efecto de silenciar por completo el RNA producido por PVX (Ratcliff et al., 1999).

Este experimento demostró que el fenómeno de *protección cruzada* puede ser inducido al reinocular un virus que contenga solamente un fragmento que sea 100 % homólogo al virus que produjo inicialmente la *recuperación* (Beachy, 1999; Gal-On and Shibolet, 2006; Chmielowska et al., 2010; Ratcliff et al., 1999; Kung et al., 2014; Wen et al., 2013).

Dos años más tarde, Dougherty y Parks (Dougherty and Parks, 1995) proponen que la degradación de RNA activada por un RNA de secuencia específica es un fenómeno mediado por moléculas pequeñas de RNA llamadas RNAs de interferencia o RNAi.

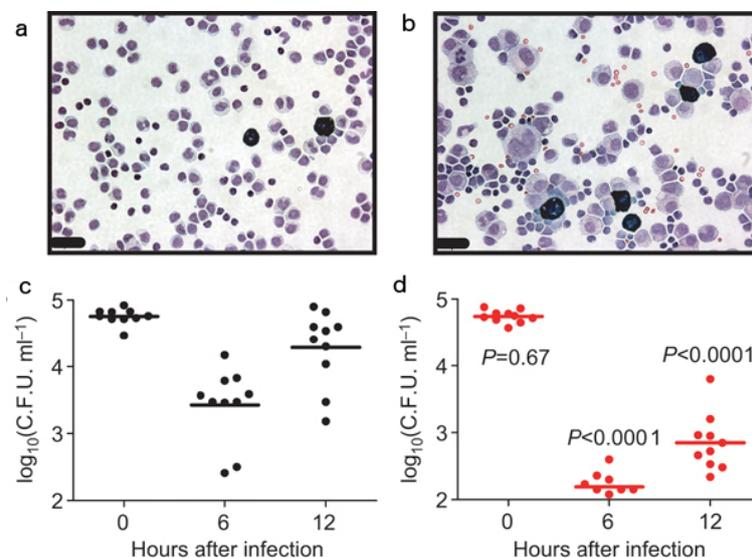
La propuesta completa del mecanismo que subyace a este fenómeno sorprendió a la comunidad científica, pues este fue solamente el comienzo de una serie de trabajos que reflejan las complejas interacciones mediadas por el RNA no codificante y las

repercusiones que este puede tener en la historia de coevolución entre un patógeno y su hospedero.

### 2.3.2.1. Mutualismo condicional

El hallazgo de que la infección latente por el herpes virus  $\gamma$ -HV68 (parecido al que infecta al 90 % de los seres humanos), incrementa la resistencia a la infección por *Listeria monocytogenes* en ratones, sugiere que (al menos en animales) hay eventos de mutualismo condicional que confieren una relación estrecha de protección que es benéfica entre el virus y su hospedero (Barton et al., 2009, 2007).

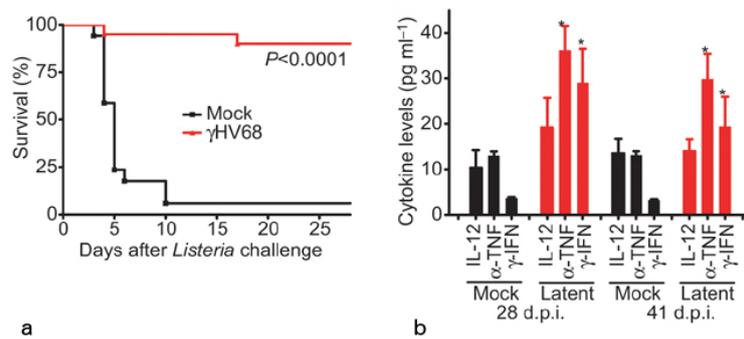
En la figura 2.5 (tomada del trabajo de Barton et al. (2007)) se observa en el panel (a) macrófagos de los ratones sanos (b) macrófagos de los ratones que presentaban una infección latente de herpes virus  $\gamma$ -HV68, (c y d) y sus conteos de unidades formadoras de colonia (CFU, de las siglas en inglés de *Colony Forming Units*) tomados a las 0, 6 y 12 horas después de la infección con *Listeria monocytogenes*, comparados con los macrófagos activados de los ratones sanos (Mock, en negro) y la disminución en las CFU de *L. monocytogenes* en los ratones que presentaban una infección latente de herpes virus  $\gamma$ -HV68 (en rojo) a partir de las 6 y hasta las 12 horas después de la infección.



**Figura 2.5:** Los macrófagos son activados mediante la infección latente por  $\gamma$ -HV68. En el panel (a) macrófagos de los ratones sanos (b) macrófagos de los ratones que presentaban una infección latente de herpes virus  $\gamma$ -HV68. Se graficaron los conteos de CFU a las 0, 6 y 12 horas después de la infección con *L. monocytogenes*, en los ratones sanos o tratamiento Mock, en negro (c) y en los ratones que presentaban una infección latente de herpes virus  $\gamma$ -HV68, en rojo (d).

En este caso, el virus enciende un mecanismo de defensa innata (ver figura 2.5, tomada del artículo de Barton et al. (2007)) mediado por citocinas, como la interleucina

12 (IL-12), el factor de necrosis tumoral ( $\alpha$ -TNF) y el interferón  $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN). Como se observa después, en la figura 2.6, las tasas de sobrevivencia de los ratones con infección latente (línea roja) son cercanos al 100% incluso hasta 25 días después de la inoculación con *L. monocytogenes*, similar al grupo control, que está representados por ratones sanos, inoculados con buffer (Mock), presentan tasas de supervivencia (ver fig. 2.5a) cercanas al 0% a partir del día 10 después de la inoculación con *L. monocytogenes*. En el panel 2.5b se observa que los niveles de citocinas son elevados, lo que sugería que el sistema inmune innato había sido activado a los 28 y a los 41 dpi.



**Figura 2.6:** Incremento en la inmunidad innata de ratas con infección latente de  $\gamma$ -HV68 herpes virus. En el panel (a) se graficaron las tasas de sobrevivencia de los ratones con infección latente (línea roja) y el grupo control de ratones sanos (línea negra), desde el día 1 hasta el día 28 posteriores a la inoculación con *L. monocytogenes*. En el panel (b) se graficaron las medias y la desviación estándar de los niveles de citocinas a los 28 dpi y a los 41 dpi, de ratones ratones con infección latente (barras rojas) y el grupo control de ratones sanos (barras negras). Imagen tomada de (Barton et al., 2007).

El propósito de esta sección fue dar un ejemplo de cómo los virus colaboran con las plantas, aunque, como tal, el mutualismo condicional entre virus-hospedero solamente ha sido descrito en modelos animales, pero no hay razón para pensar que en plantas no suceda. El caso del herpes virus  $\gamma$ -HV68 y *L. monocytogenes* en ratones, sugiere que la infección latente genera una relación benéfica tanto para el virus como para el mismo hospedero, lo que permite que la infección no sea mortal a cambio de generar resistencia contra otro patógeno que sí lo hace (Barton et al., 2009, 2007). Por ello, al estudiar este tipo de interacciones ternarias es imprescindible evaluar la respuesta de defensa del hospedero hacia sus patógenos.

## 2.4. Mecanismos de defensa

Las plantas tienen diversos mecanismos para defenderse de una gran variedad de patógenos dispuestos a invadirlas, debido a que representan una fuente rica de nutrientes y maquinaria celular.

Existen dos hipótesis que pretenden explicar la existencia de complejos mecanismos de defensa que las plantas poseen. Uno de ellos ya fue abordado en la sección 2.3, conocido como «*arms race*» (en español «carrera armamentista»), en donde se cree que continuas mejoras en los genotipos tanto del hospedero como del patógeno son aislados por medio de la presión de selección mutua que se ejerce entre ellos. La otra hipótesis se denomina guerra de trincheras o «*trench warfare*», y plantea que realmente los polimorfismos se acumulan en los genomas por largos periodos de tiempo generando variabilidad en las poblaciones, los cuales son usados cuando se requiere (Ding and Voinnet, 2007; Stahl et al., 1999; Charron et al., 2008; Pumplin and Voinnet, 2013).

El entramado bioquímico y fisiológico del que dependen estos complejos mecanismos de defensa antivirales, ha sido dividido en dos secciones (SAR -2.4.0.2- y RNAi-2.4.0.3-) para facilitar el entendimiento de la interacción PRSV-PapMV-papaya. Sin embargo, es posible que ambos mecanismos estén interconectados.

En este trabajo se mencionan sólo algunos de los mecanismos de defensa de las plantas que han sido reportados que se activan en la infección por virus. Sin embargo, se entiende que los mecanismos de defensa que tienen las plantas para resistir en contra de sus patógenos son muy complejos y que diversas moléculas que participan en el desarrollo de la respuesta.

#### **2.4.0.2. Resistencia Sistémica Adquirida**

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es una respuesta de defensa *de toda la planta* que se produce después de haber sido expuesta a un patógeno, usualmente biotrófico. La SAR es análoga al sistema inmune innato encontrado en los animales, y hay evidencia que sugiere que la SAR en plantas y la inmunidad innata en animales están conservadas evolutivamente (Durrant and Dong, 2004).

Las plantas usan receptores que reconocen firmas microbianas conservadas conocidas como MAMPs o PAMPs (de las siglas en inglés de *Microbial Associated Molecular Patterns* y *Pathogen Associated Molecular Patterns*), las cuales son moléculas imprescindibles para el funcionamiento de los patógenos y que solamente éstos producen y que son reconocidas casi exclusivamente en la membrana por receptores que forman parte del sistema inmune celular. Este reconocimiento desencadena una respuesta inmune de defensa. Además, como producto de la resistencia descrita originalmente por Flor en 1971, bajo el concepto de resistencia «*gen por gen*», también existen receptores que reconocen una amplia variedad de efectores de los patógenos, que en un momento de la mencionada carrera armamentista fueron factores de virulencia capaces de evitar al sistema inmune innato de las plantas. Estos usualmente son reconocidos por proteínas del tipo NBS-LRR, localizados predominantemente en el interior de la célula (Rodrigo et al., 2012).

La SAR genera resistencia y fomenta además recuperación de la infección. Este

tipo de resistencia es eficaz contra una amplia variedad de patógenos; de hecho, se considera una resistencia de «amplio espectro». Esta respuesta está asociada a la inducción de una amplia gama de genes (llamados genes PR, que codifican las llamadas «proteínas de patogenicidad»), y usualmente requiere la acumulación de ácido salicílico (SA) endógeno (Rodrigo et al., 2012; Cao et al., 1994; Zhang et al., 2012; Baxter et al., 2014; Durrant and Dong, 2004).

La formación del complejo receptor-ligando inicia cascadas de señalización que generan la llamada respuesta de hipersensibilidad (HR), que es una reacción local que se caracteriza por la aparición de zonas altamente localizadas alrededor del sitio de infección, la cual se caracteriza por estar constituida por células que perecieron por un proceso de muerte celular programado genéticamente, que es en cierta medida similar a la apoptosis que ocurre en células animales (Belkhadir et al., 2004).

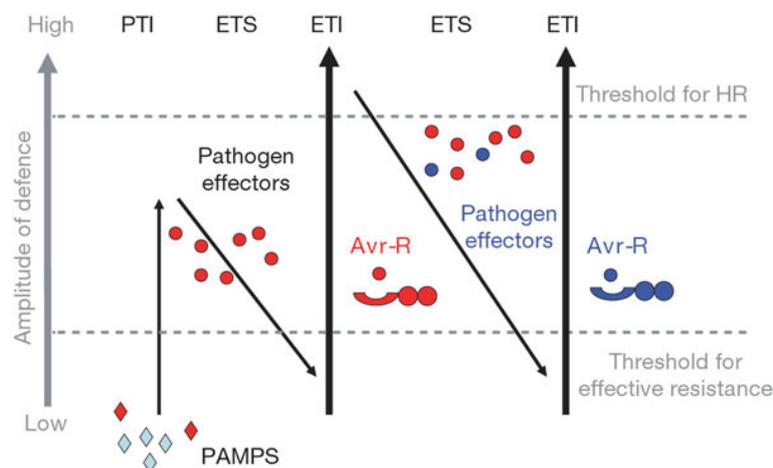
Como consecuencia de la respuesta HR, se detiene la invasión del patógeno en las células inicialmente infectadas, evitando la diseminación del patógeno por toda la planta. La HR se desencadena debido a ciertos eventos moleculares que permiten la restricción del movimiento del patógeno como son la acumulación rápida y temporal del radical superóxido ( $O_2^-$ ), seguida de otras especies reactivas de oxígeno (ROS) un poco más estables, como el ion hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es por mucho la ROS más importante en plantas por su relativa estabilidad y capacidad de moverse a través de las células gracias a su baja polaridad (Baxter et al., 2014).

La HR es una respuesta activa e inducible, que obedece a una respuesta de la planta frente al patógeno y está basada en el modelo de la teoría del gen por gen descrito mencionada anteriormente (Flor, 1971). Este se define por la expresión de un gen de resistencia (R) en la planta, el cual puede unir directa o indirectamente al producto del gen de avirulencia (avr) del patógeno invasor. Por lo tanto, las proteínas R actúan como receptor y las proteínas activadoras avr como ligando.

Los genes avr son dominantes y codifican para una sola proteína o efector. En el caso de los virus, este puede ser la proteína de la cápside o la replicasa. Si la planta no posee un gen R capaz de reconocer los efectores específicos generados por patógenos, se produce una reacción compatible o virulenta. En una interacción compatible, la planta no activa una eficiente respuesta de defensa, y permite la penetración, invasión y multiplicación del virus (o cualquier otro patógeno) en sus células; en pocas palabras es susceptible (Verchot-Lubicz et al., 2007; Aguilar et al., 2015).

La figura 2.7 muestra el modelo más aceptado para entender la evolución de los mecanismos de defensa y el rompimiento de la resistencia. La amplitud máxima de la resistencia a enfermedades o la susceptibilidad es proporcional a [PTI - ETS + ETI]. En la fase 1, las plantas detectan MAMPs, (rombos rojos) a través de la primera línea de defensa para activar la inmunidad activada por PAMP, o PTI (de las siglas en inglés de *Effector Triggered Susceptibility*). En la fase 2, los patógenos exitosos que codifican efectores que interfieren con PTI, dan como resultado la susceptibilidad a los

mismos como consecuencia de la incapacidad de neutralizar dicho efector (conocida como ETS; de las siglas en inglés *Effector Triggered Susceptibility*). En la fase 3, un efector (indicado en rojo) es reconocida por una proteína de resistencia NB-LRR, la cual es responsable de la activación de la inmunidad mediada por efectores (conocida como ETI, por sus siglas en inglés de *Effector Triggered Immunity*), una versión amplificada de PTI que a menudo pasa un umbral para la inducción de la muerte celular representada casi siempre por la HR. En la fase 4, se seleccionan cepas de patógenos que han perdido el efector «rojo», y tal vez adquirido nuevos efectores a través de flujo horizontal de genes (en azul), ya que pueden ayudar a los agentes patógenos para reprimir la versión más reciente de ETI. La selección favorece nuevas plantas que posean alelos NB-LRR que pueden reconocer uno de los efectores recién adquiridos, lo que resulta de nuevo en la ETI (Jones and Dangl, 2006).



**Figura 2.7:** El modelo de Zig-Zag ilustra el desarrollo de los mecanismos que involucran el sistema de defensa de las plantas (Jones and Dangl, 2006).

La reacción hipersensible contra un patógeno es uno de los mecanismos de defensa más eficientes en la naturaleza e induce numerosos genes que codifican proteínas de defensa de las plantas. Entre estas se encuentran las proteínas PR, que están clasificadas en más de 12 familias diferentes, las cuales mejoran la defensa innata del huésped cuando se produce una segunda infección debido a que tienen funciones capaces de afectar la supervivencia de los patógenos al tener actividad enzimática capaz de alterar elementos básicos de su estructura y metabolismo, como la pared celular, la hidrólisis de proteínas y la duplicación de DNA (Jones and Dangl, 2006).

#### 2.4.0.3. RNAi

El silenciamiento de genes mediado por RNA (también conocido como RNA de interferencia, o RNAi) es un mecanismo muy conservado de regulación génica específica, que tiene un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del genoma celular (Pumplin and Voinnet, 2013; Lindbo and Dougherty, 2005).

En animales, insectos y plantas también funciona como un mecanismo adaptativo de

defensa antiviral inducible. Consiste en el reconocimiento de una secuencia específica y la inhibición de la expresión de los genes endógenos (genes involucrados en desarrollo, regulación de la respuesta al estrés, etc.) o RNAs pequeños derivados de virus (vsiRNAs) (Haasnoot et al., 2007).

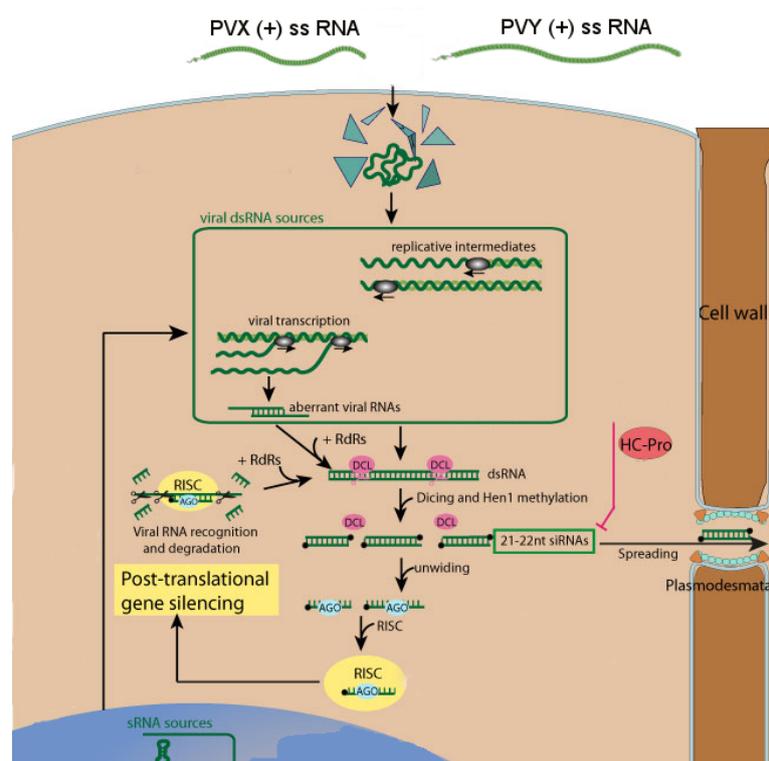
La expresión de estos genes puede ser inhibida justo antes de la traducción. Este mecanismo se conoce como silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS. Los RNAs de doble cadena (o *double stranded RNAs*, o dsRNA) son reconocidos por enzimas *tipo* DICER o DCL (de las siglas en inglés de *Dicer-like*) y cortado en pequeños segmentos de RNA de aproximadamente 21 a 24 nt, que interactúan con las proteínas Argonauta (AGO) y otras proteínas asociadas para formar complejos de silenciamiento de RNA (en animales llamados RISC) para dirigir por medio de su homología en secuencia, la destrucción de RNAs mensajeros de manera específica. El PTGS también puede ser llevado a cabo por mirRNAs endógenos. Los miRNAs difieren de siRNAs en que están codificados por genes celulares (se expresan, tienen promotores, están conservados, etc.) y en algunos, el apareamiento de bases es imperfecto hacia los RNAs mensajeros que serán destruidos o inhibidos para impedir su traducción (Zamore, 2001).

Para contra-atacar la respuesta antiviral de la planta, los virus de casi todos los géneros que infectan plantas (y también de algunos virus animales) codifican supresores de silenciamiento de RNA o VSRs, (de las siglas en inglés de *Viral Suppressors of RNA silencing*) que inhiben pasos clave del mecanismo de RNAi (Kasschau and Carrington, 1998; Anandalakshmi et al., 1998; Garcia-Ruiz et al., 2010; Ziebell and Carr, 2009; Siddiqui et al., 2008; Csorba et al., 2009). Algunos son multifuncionales (ver figura 2.8) y juegan un papel importante en la replicación viral, encapsidación, movimiento y patogénesis, además de la supresión de la inmunidad antiviral basada en el silenciamiento de RNA (Kasschau and Carrington, 1998).

Los modelos ecológicos sobre enfermedades tienden a exhibir un comportamiento cíclico, ya que la gravedad de las epidemias depende en gran medida de la cantidad y virulencia del patógeno, pero también de la frecuencia de individuos susceptibles. En el caso de «*La Antigua*» (ver la sección 2.1), es posible que el brote de PRSV se debiera a factores como el incremento en el número de individuos seleccionados por características productivas de un sólo linaje de plantas y en consecuencia, poca variabilidad polimórfica. Por otro lado, PRSV tiene una gran flexibilidad genética y posibilidad de recombinación, y viene de un linaje de virus que poseen estrategias adaptativas que se caracterizan por generar alta virulencia (Noa-Carrazana et al., 2007), lo que produce daños severos en su hospedero: la papaya.

### 2.5. *Carica papaya*

El objetivo de la producción de esta planta es la comercialización del fruto. La papaya ocupa el primer lugar en los resultados nutricionales entre 38 frutas comerciales



**Figura 2.8:** Para contra-atacar la respuesta antiviral, los virus codifican supresores de silenciamiento como es el caso de la proteína potyviral HC-Pro. Figura modificada de ViralZone

comunes, con base en el porcentaje de la cantidad diaria recomendada de vitamina A, vitamina C, potasio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, hierro y calcio, además de fibra. Se recomienda el consumo de su fruto para la prevención de deficiencia de vitamina A, una causa de ceguera infantil en los países en desarrollo tropicales y subtropicales. La fruta, tallos, hojas y raíces de papaya se utilizan en una amplia gama de aplicaciones médicas, incluyendo la producción de la papaína, una enzima proteolítica utilizada en medicina humana para tratar problemas relacionados con el tracto gastrointestinal así como en la industria alimentaria en el tratamiento de productos cárnicos (Zhang et al., 2014; Ming et al., 2008; Colina et al., 2004).

La papaya es un árbol tropical. Tiene un genoma de 372 megabases (Mb), es diploide con nueve pares de cromosomas (ver fig 2.9). Es una planta de fácil transformación con un tiempo de generación corto (9-15 meses), de floración continua durante todo el año y un sistema de cromosoma sexual primitivo, lo que genera plantas hembras, machos y hermafroditas. Es un miembro del orden Brassicales, es decir que comparte un ancestro común con *Arabidopsis* hace unos 72 millones años atrás (Zhang et al., 2014).

El genoma de la papaya es tres veces mayor que el tamaño del genoma de *Arabidopsis*, pero contiene menos genes, incluyendo un número significativamente menor de genes ortólogos de resistencia a enfermedades así como factores de transcripción responsables

de la regulación de respuestas de defensa de la planta contra patógenos tales como MYB, WRKY y otros (ver figura 2.10 (Zhang et al., 2014)).

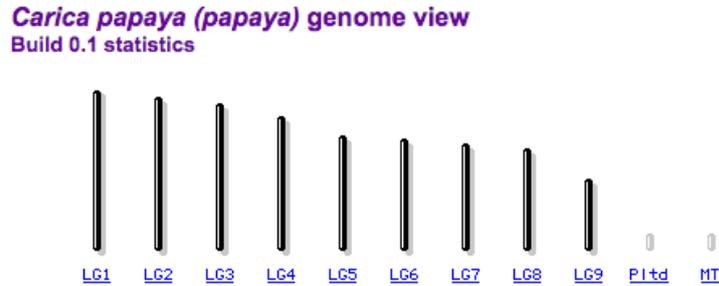


Figura 2.9: Organización del genoma en 9 cromosomas de *C. papaya*.

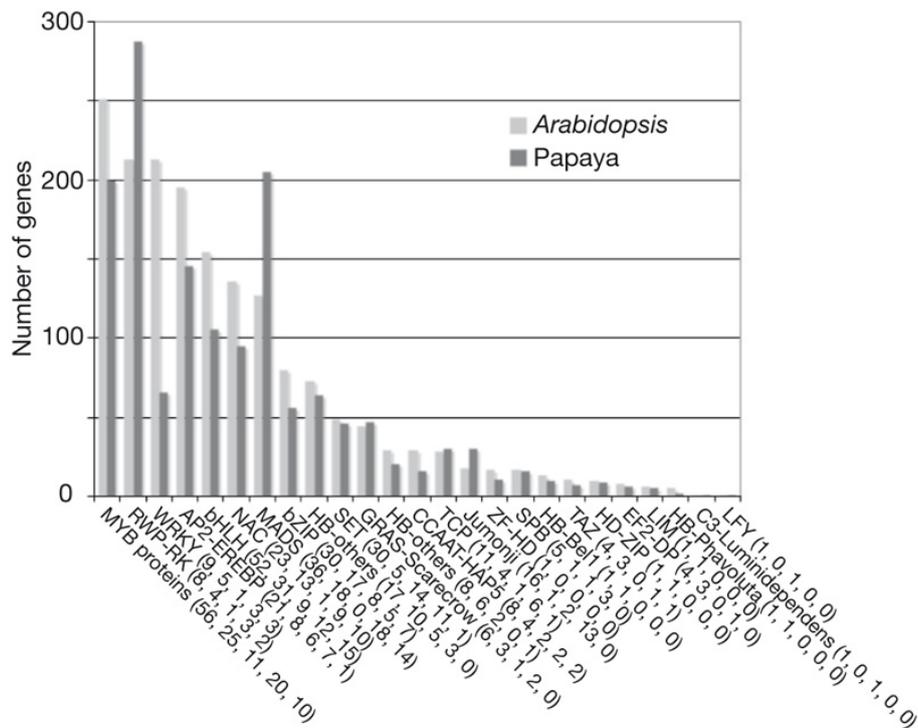


Figura 2.10: Comparación del número de genes que codifican para factores de transcripción y otras familias de genes entre *Arabidopsis* and *Carica papaya* (Zhang et al., 2014).

## 2.6. Papaya Mosaic Virus

El virus del mosaico de la papaya (PapMV, por sus siglas en inglés y su actual nombre científico *Papaya Mosaic Virus*) es un potexvirus que pertenece a la familia *Alphaflexiviridae*, son virus flexibles, filamentosos, de 470 hasta 580 nm en longitud y 14 nm de ancho. Las partículas infecciosas consisten de 1000 a 1500 subunidades de una sola proteína de la cápside (CP). El RNA genómico es de cadena sencilla y

de sentido positivo con rangos de tamaño de 5.8 a 7.0 Kb. El genoma monopartita consiste en un hebra RNA<sup>+</sup> con el extremo 5' UTR protegido por una estructura de m<sup>7</sup>GpppG y el extremo 3' UTR poliadenilado. Al contrario de muchos otros virus de plantas que son transmitidos por insectos vectores, los potexvirus al parecer se diseminan vía transmisión mecánica. Las plantas con infecciones sistémicas muestran generalmente lesiones tipo mosaico, clorosis o moteados. Las pérdidas de la producción debido a la infección de estos virus no superan el 20 % del valor total del producto comercializable (Noa-Carrazana et al., 2006; Noa-Carrazana and Silva-Rosales, 2001; Sit et al., 1989; Abouhaidar, 1988; Bateson et al., 2002; Erickson et al., 1978).

En el sentido 5'→3' del genoma se encuentran 5 marcos abiertos de lectura u ORFs (de las siglas en inglés de *Open Reading Frame*). El ORF 1 se transcribe directamente del RNA genómico y codifica para la RdRP, una proteína que tiene dos dominios conservados de helicasa y replicasa. El producto de ORF 1 forma parte de un complejo que dirige junto con las proteínas del hospedero y posiblemente con otras proteínas virales, la síntesis y la replicación del RNA viral (Erickson et al., 1978) .

Los ORFs 2, 3 y 4 se transcriben del mismo mRNA subgenómico y se caracterizan por el solapamiento de sus marcos de lectura. Estos son referidos comúnmente como los genes del triple bloque o TGB (de las siglas en inglés de *Triple Gene Block*). Los TGBs participan en el movimiento de célula a célula, siendo requerido para la infección en las plantas, más no en protoplastos (Verchot-Lubicz et al., 2007; Tilsner et al., 2012).

El ORF 2 (TGB1 o P25), es un supresor de silenciamiento mediado por RNA (supresor de PTGS) que interactúa con AGO1 (Aguilar et al., 2015), está asociado al movimiento viral puesto que incrementa el límite de exclusión del plasmodesmo y tiene un motivo conservado. Estudios *in vitro* de esta proteína han demostrado que también tiene función de ATPasa-helicasa (Tilsner et al., 2012).

El ORF3 (TGB2 o P12) juega un papel importante en la propagación célula a célula, por medio de la facilitación del transporte del RNA viral a través de los plasmodesmos (Katiyar-Agarwal et al., 2006; Tilsner et al., 2012).

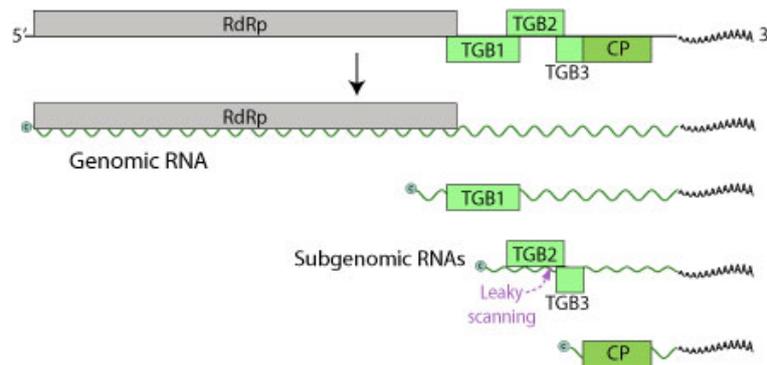
La localización inmunológica ha demostrado que el producto del ORF 4 (TGB3 o P7) se asocia a la pared de la célula vegetal. También tiene un papel importante en el movimiento a corta distancia e induce la formación de vesículas granulares derivadas del retículo endoplásmico asociadas a filamentos de actina (Tilsner et al., 2012).

A pesar de algunas evidencias sobre la función de los productos del TGB, el papel exacto de estos ORFs en el ciclo vital de los potexvirus aún no se determina completamente.

El ORF 5 codifica para la CP, que es una proteína de entre 19 y 23 kDa requerida para la encapsidación del genoma. También forma complejos de ribonucleoprotéicos junto a TGB1 helicasa y RNA viral (Verchot-Lubicz et al., 2007) .

## 2. Introducción

Durante su replicación, se producen RNAs subgenómicos o sgRNA. Los dos sgRNAs más abundantes son de 0.9-1.0 Kb y 1.9-2.1 Kb de tamaño. Estos tienen extremos 5' que corresponden a las regiones internas del RNA genómico o gRNA, y son coterminales con el gRNA en sus extremos 3'. Al parecer la formación de sgRNAs en este grupo de virus se requiere para propósitos de incremento en la tasa de transcripción de las proteínas que se requieren en mayor cantidad para el ciclo viral. Ver figura 2.11.



**Figura 2.11:** Organización del genoma de los potexvirus (tomada de ViralZone)

## 2.7. Papaya Ringspot Virus

El virus de la mancha anular de la papaya o PRSV (por sus siglas en inglés y su actual nombre científico *Papaya Ringspot Virus*) es considerado el virus de mayor importancia económica dentro del cultivo de la papaya debido a su gran dispersión en prácticamente todas las regiones productoras de papaya del mundo, su facilidad de transmisión y las grandes pérdidas que causa a este cultivo comercial, que pueden llegar a ser hasta del 100 % del total del cultivo (Tripathi et al., 2007, 2008; Yeh et al., 1992).

Los miembros de la familia *Potyviridae* se caracterizan por ser viriones filamentosos flexibles de aproximadamente 680 a 950 nm de largo y 11 nm de ancho. La partícula viral contiene 5 % de ácido nucléico y 95 % de proteína. La cubierta está formada de 2 mil copias de la misma proteína de la cápside (CP), que varía en tamaños de 30 a 37 kDa. El RNA genómico es de cadena sencilla positiva de 9.4 a 10.3 Kb, tiene en su extremo 5' UTR una proteína adherida al genoma (Vpg) y en el 3' UTR está poliadenilado. Son transmitidos de manera no persistente por áfidos. Al entrar a la célula su RNA<sup>+</sup> genómico se traduce en el citoplasma sin ninguna modificación en una poliproteína autoproteolítica, que se modifica postraduccionalmente para formar 11 proteínas virales, algunas de las cuales se asocian con proteínas del huésped para formar complejos de replicación con el RNA<sup>+</sup> que se utiliza como molde para generar copias complementarias antisentido (RNA<sup>-</sup>). Estas a su vez, sirven como molde para la síntesis de numerosos RNA<sup>+</sup> traducibles (Gonsalves and Ishii, 1980;





# 3

## Hipótesis y Objetivos

Los fenotipos de las infecciones mixtas por PRSV y PapMV en papaya, son el resultado de interacciones conocidas como sinergismo o antagonismo y dependen del éxito en la infección sistémica en su hospedero.

A su vez, la interacción antagónica que genera la infección secuencial PapMV-PRSV, es un caso diferente al fenómeno de protección-cruzada o recuperación y es independiente del mecanismo de defensa mediado por RNAs pequeños derivados de virus.

### 3.1. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar las infecciones mixtas por PapMV-Gto y PRSV Mex-VrPO en papaya a nivel molecular. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Estimar el daño que producen PapMV y PRSV en infecciones simples y mixtas en plantas de papaya. Con ello, se propuso caracterizar las infecciones simples y mixtas a nivel fenotípico.
2. Analizar los niveles de acumulación de: RNA genómico, proteína de la cápside, intermediarios replicativos y actividad traduccional, de ambos virus en las interacciones antagónicas o sinérgicas.
3. Analizar la respuesta del hospedero por medio de marcadores moleculares conocidos para mecanismos de defensa.
4. Analizar las poblaciones de RNAs pequeños: vsiRNAs, microRNAs y otros siRNAs en ambos fenotipos de respuestas a las infecciones virales.

### 3. Hipótesis y Objetivos

---

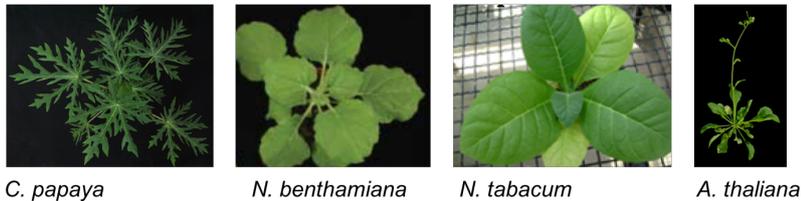
# 4

## Métodos

### 4.1. Obtención del material biológico

Las plantas de papaya utilizadas en este trabajo tuvieron dos orígenes distintos: plantas de semilla (obtenidas de los mercados locales) y plantas obtenidas a través de micropropagación clonal. Los virus PapMV, PRSV y TEV fueron obtenidos del cepario del laboratorio de Interacciones Planta-Virus del Cinvestav, Irapuato (Noa-Carrazana et al., 2007). Las semillas silvestres (WT) de *A. thaliana* fueron donadas por el laboratorio del Dr. Luis Herrera Estrella, del Langebio. Los ensayos en *N. benthamiana* con PYX y PVY fueron realizados en la Universidad de Helsinki, Finlandia en el laboratorio de la Dra. Kristiina Mäkinen.

Especies usadas en esta tesis:



**Figura 4.1:** Especies de plantas utilizadas en esta tesis: *C. papaya*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *A. thaliana*.

#### 4.1.1. Plantas de papaya a partir de semillas

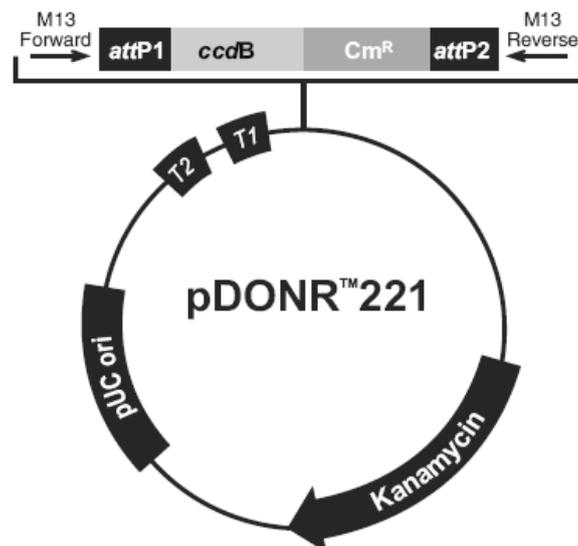
Las semillas de papayas comerciales variedad Maradol fueron colectadas para este estudio. Se realizaron procedimientos de limpieza estándar para favorecer y homogeneizar la germinación. Las semillas lavadas y secadas fueron colocadas en mezcla de germinación. Las plántulas de 2 a 3 semanas, fueron trasplantadas en macetas individuales que contenían mezcla general. Las plantas fueron fertilizadas semanalmente y regadas dos veces por semana. En todos los experimentos aquí reportados, las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero durante primavera-verano.

### 4.1.2. Plantas de papaya micropropagadas

En el laboratorio de transformación del Cinvestav, Irapuato y con ayuda de la Dra. Selene Aguilera, se obtuvieron plantas clonales hermafroditas de papaya Maradol. Las plántulas fueron mantenidas en cuartos de crecimiento hasta su aclimatación y posteriormente se trasladaron al invernadero, donde se mantuvieron durante el resto del experimento.

## 4.2. Generación de construcciones genéticas

Por medio de RT-PCR realizado a partir de tejido infectado por PapMV se amplificaron todos los fragmentos correspondientes a los marcos de lectura reportados de este virus. Para contemplar la posibilidad que algún elemento en *cis* o estructura secundaria de los RNAs subgenómicos que produce el virus fuera la que estuviese produciendo el efecto antagónico, se agregó también una construcción que contiene TGB1-TGB2-TGB3 en tándem. Éstos fragmentos se recombinaron en los plásmidos: pDONR (BP) y posteriormente en el plásmido (LR) pH7FWG2 con tecnología tipo *Gateway*.



**Figura 4.2:** Diagrama que muestra la organización del vector de entrada pDONR de todas las construcciones generadas con tecnología *Gateway*.

Los fragmentos que codifican para el factor eucariótico de inicio de la traducción de la familia de los 4E: Cp-eIF4E y su *isoforma*, el Cp-iso-eIF4E, fueron recombinados en pDONR (BP), y después en pFAST-G02, con el sistema comercial *Gateway*.

El promotor OLE1 unido a GFP funciona como un marcador para identificar semillas homocigotas transformadas en la segunda generación  $T_2$ .



**Figura 4.3:** Diagrama de la organización del vector pFAST-G02

### 4.2.1. Generación de la biblioteca de fragmentos del icDNA de PapMV

Se generó una biblioteca con todos los fragmentos de PapMV traslapados para su posterior ensamblado a partir de una reacción de recombinación. Los fragmentos de RT-PCR se extendieron por medio de adaptadores (en el caso del primer y el último fragmento, los que cierran el vector) o produciendo fragmentos traslapados. La lista de primers utilizados para ésta estrategia se muestra en las tablas 5.1 y 5.2.

## 4.3. Titulación de virus

La titulación de los virus PapMV y PRSV se realizó a través de conteos de moléculas de RNAs genómicos. Para estimar la cantidad de RNA genómico viral de PapMV y PRSV se generaron construcciones que contienen un fragmento de la RdRP de PapMV y un fragmento de CP de PRSV. Éstas construcciones se usaron como templado para una curva estándar hecha con concentraciones conocidas de cada plásmido en una serie de diluciones seriales 1:10, 1:5 ó 1:2 (dependiendo de la concentración esperada) por PCR cuantitativo (qPCR) usando SyberGreen. Finalmente, por medio de una regresión lineal, se estimaron las concentraciones de RNA genómico viral de PapMV y PRSV en tejido de hoja de papayas infectadas.

Este cálculo se basa en la estimación por el peso promedio de un par de bases (pb) que corresponde a 650 Daltones (Da). Esto significa que un mol de un pb pesa 650 g y que el peso molecular de cualquier molde de DNA de doble cadena puede ser estimado tomando el producto de su longitud (en pb) multiplicado por 650. El inverso del peso molecular es el número de moles del templado presente en un gramo de material. Usando el número de Avogadro,  $6,022 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$  (moléculas / mol) el número de moléculas de la plantilla por gramo se puede calcular a partir de la siguiente operación:

$$\frac{\text{mol}}{\text{g}} \times \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}} = \frac{\text{moléculas}}{\text{g}}$$

Por último, el número de moléculas o el número de copias de molde en la muestra se puede estimar mediante la multiplicación por  $1 \times 10^9$  para convertir a ng y luego multiplicando por la cantidad DNA (también en ng).

Éste cálculo requiere una cantidad de DNA en ng (calculada a partir de plásmidos con diluciones seriales de una concentración determinada) de longitud conocida (en pb). Con esta información se calcula el número de moléculas.

La fórmula final para calcular el número de moléculas es la siguiente:

$$\text{número.de.moléculas} = \frac{(\text{cantidad} \cdot 6,022 \times 10^{23})}{(\text{longitud} \cdot 1 \times 10^9 \cdot 650)}$$

Y las unidades en que se expresan son:

$$\text{número.de.moléculas} = \frac{(\text{ng} \times \text{Número/mol})}{(\text{pb} \cdot \text{ng/g} \cdot \text{g/mol}(\text{pb}))}$$

### 4.3.1. Preparación del estándar para PapMV y PRSV

1. Cuantificación de los plásmidos. La cantidad de DNA o RNA en solución, puede ser estimada a través de la Ley de Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon cl$$

En donde, A= Absorbancia,  $\varepsilon$  =coeficiente de extinción, C= concentración molar l= longitud de celda (cm).

Usando un equipo *Nanodrop* (Thermo, CA, USA), esta medición fue obtenida para ambos plásmidos y la confirmación de la cantidad de DNA plasmídico en las diluciones correspondientes (cuando las concentraciones estaban por arriba de 1 ng).

2. Preparación de diluciones seriales. Al ser PapMV más abundante en la planta, se utilizaron diluciones seriales 1:5 v/v para preparar el estándar, iniciando con una concentración de 10 ng. De este modo el tejido analizado se ubicó dentro de un rango por debajo del máximo y por encima del mínimo de la serie de diluciones en la tabla 4.1. Para el caso de PRSV, se utilizó una concentración inicial de 10 ng y diluciones seriales 1:10, como se muestra en la tabla 4.2.

Cada dilución se utilizó como templado para la reacción estándar de qPCR. En la placa se cargan de dos a tres réplicas técnicas junto con las muestras a analizar para hacer los análisis comparativos de fluorescencia.

Estándar	EUAdilución 1:5	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ l)
1	1	100
2	5	20
3	25	4
4	125	0.8
5	625	0.16

**Tabla 4.1:** PapMV: preparación de diluciones seriales 1:5 v/v a partir de 100 ng de plásmido

Estándar	EUAdilución 1:10	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ l)
1	$10^0$	10
2	$10^1$	1
3	$10^2$	0.1
4	$10^3$	0.01
5	$10^4$	0.001

**Tabla 4.2:** PRSV: preparación de diluciones seriales 1:10 v/v a partir de 10 ng de plásmido

#### 4.4. Procedimientos de inoculación

A partir de tejido de hojas sistémicas de plantas infectadas ya sea de PapMV o de PRSV y previo a una confirmación usando una reacción multiplex de RT-PCR, se titularon los inóculos por medio del procedimiento anteriormente descrito y se realizaron abrasiones con carborúndum (o carburo de silicio) sobre las hojas. Se tomaron 5  $\mu$ l del sobrenadante del tejido macerado y suspendido en agua destilada para inocular cada planta. En el caso de las inoculaciones mixtas, se colocaron 5  $\mu$ l de cada virus en la misma herida.

#### 4.5. Cuantificación del daño

De la observación visual de lesiones en las hojas de la planta, se realizó la evaluación y cuantificación del grado de infección por medio de una escala a la que nombramos: «*damnum*». Esta escala está basada en la magnitud del daño que se produce a medida que avanza la infección de PapMV y/o PRSV en Papaya.

La evaluación se hizo en cada una de las hojas  $\lambda$  del número de plantas denominadas por  $n$  que componen la población a analizar. Cada una es una evaluación independiente.

La fórmula matemática para describir esta metodología fue formalizada (con la ayuda del Dr. José Marcos Falcón, del Laboratorio de la Diversidad Biomolecular, UGA, Cinvestav y Dr. Diego González de León, del CIMMYT):

$$\bar{\delta}_t = \left( \frac{\sum_{i=1}^j \delta_i}{\lambda_1} + \frac{\sum_{i=1}^k \delta_i}{\lambda_2} + \frac{\sum_{i=1}^l \delta_i}{\lambda_3} + \dots + \frac{\sum_{i=1}^m \delta_i}{\lambda_n} \right) / n$$

El daño asignado por la escala  $\delta_0^7$  significa que  $\delta$  puede tomar una serie de valores de 0 a 7. Es decir si la hoja  $\lambda$  evaluada no presenta ningún daño, el valor de  $\delta$  será de 0, si visualmente presenta uno o más fenotipos asociados a la escala de la figura estos valores de daño se suman para cada una de las hojas  $\delta_i$  de la planta  $n$  y al final se dividen entre el total de hojas por planta  $\lambda_{1,2,3,\dots,n}$  para sacar el promedio del daño en esa planta  $n$ .

En la fórmula correspondiente al  $\bar{\delta}_t$ , el valor de  $t$  representa el factor tiempo; es decir los días después de la inoculación en los que se realizó esta medición. Por ello, si se tienen diferentes valores de  $t$ , se podrá generar una gráfica con la cinética del daño provocado por la infección. El símbolo  $\bar{\delta}$  representa el promedio del daño; es decir, la suma de los daños totales ( $\sum_{i=1}^j \delta_i$ ) por hoja ( $\lambda$ ) entre el número de hojas totales de la planta.

Para generar una cinética de la evolución de la enfermedad basada en los fenotipos asociados a la infección, se utilizaron datos de tres experimentos independientes, con 16 plantas por tratamiento para calcular la media  $\bar{\delta}_t$  y la desviación estándar  $\delta s^2 = (\sum_{i=1}^n \delta_i - \bar{\delta}_t)^2 / n - 1$  a partir de ( $t =$ ) 0, 5, 12, 19, 21, 25, 28, 30, 35 y hasta 60 días después de la inoculación.

## 4.6. Estimación de proteína viral

Se utilizaron extractos solubles de hojas sistémicas infectadas para el análisis de las proteínas virales mediante un ensayo de inmunoabsorción con anticuerpos dobles ligados a enzimas (DAS-ELISA) usando anticuerpos dirigidos a las proteínas de la cubierta  $\alpha$ -CP de PapMV (Agdia SRA 53400) y  $\alpha$ -CP de PRSV (ECA 53500), (Agdia, IL, EUA) y siguiendo los protocolos del fabricante. La actividad de fosfatasa alcalina se estimó indirectamente por medio de la medición colorimétrica a 405 nm después de 15 min de incubación con para-nitrofenilfosfato (PNPP) como sustrato.

Para los ensayos de detección de inmunotransferencia de CP, la proteína se purificó a partir de tejido de hoja de papaya de acuerdo con un protocolo previamente publicado (Faurobert et al., 2007). Después de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, se realizó un análisis de inmunodetección utilizando diluciones 1:200 de los anticuerpos primarios de Agdia  $\alpha$ -CP de PapMV y  $\alpha$ -CP de PRSV. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron utilizando un anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa



**Figura 4.4:** Escala  $\delta$  comparativa para evaluar los cambios en las hojas de papaya producidos por infecciones virales simples o mixtas.

alcalina por medio de la reacción colorimétrica que genera la actividad promiscua de la fosfatasa sobre el cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT-BCIP), del cual se forma un precipitado de coloración morada en la membrana.

#### 4.7. Evaluación de la traducción

A partir de tres experimentos independientes con 8 plantas en cada tratamiento, se separaron los complejos poliribosomales usando 1 g de tejido de hojas sistémicas (0.125 g de cada planta  $\times$  8 plantas) de acuerdo a un protocolo publicado anteriormente por Contreras-Paredes et al. (2013) y por Davies and Abe (1995). Después de la concentración inicial de los polisomas que atraviesan un colchón de sacarosa 60 % a 275,000  $\times$  g durante 3 h a 4 °C, los ribosomas asociados con el ARN se cargaron en un gradiente de sacarosa 15-60 % y se centrifugaron durante 1.25 h a 4 °C a 250,000  $\times$  g.

Los gradientes se separaron en ocho fracciones por medio de un colector automático Densi-flujo (Labconco, Kansas city, MO, EUA) acoplado a un monitor UV de EM-1 de absorbancia ajustado a una longitud de 260 nm (BioRad; Hercules, CA, EUA) acoplado a un plotter de LKB BROMMA 2210 (Farmacia LKB, Upsala, Suecia) para obtener los perfiles poliribosomales. A partir de las fracciones poliribosomales colectadas, se extrajo el RNA de cada fracción con fenol-cloroformo seguido de

precipitación con isopropanol y se analizó por RT-PCR. Se incluyó un tratamiento con puromicina como control del desensamblaje poliribosomal, por medio de la adición de un buffer de GTP (20 mM Tris-HCl, pH 8, KCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0,5 mM puromicina y 0,2mM GTP) e incubando durante 45 min a 37 °C.

### 4.8. Medición de especies reactivas de oxígeno

Para detectar la producción del ion superóxido, se realizaron tinciones *in situ* mediante el tratamiento de las hojas con NBT como se describe en el reporte de (Rao and Davis, 1999). Para ello, se cortaron pedazos de las hojas distales de la hoja inicialmente inoculada (infección sistémica) y se colocaron dentro de una jeringa de 50 ml llena con 10 mM NaN<sub>3</sub>, azida de sodio y solución de fosfato de potasio 10 mM a pH 7,8 durante 1 min. Se aplicó presión a la jeringa con tapa con el fin de infiltrarse en la solución en el tejido. Esta solución se reemplazó con 0,1 % de NBT en fosfato de potasio 10 mM (pH 7,8) y se incubó durante 24 h a temperatura ambiente. Las hojas teñidas se clarearon mediante el uso de un método reportado previamente por (Malamy and Benfey, 1997). Una hoja representante fue elegida para cada tratamiento y fotografiada usando un estéreo microscopio estereoscópico Lumar.V12 (ZEISS, Thornwood, NY, USA).

### 4.9. Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

La generación de dos líneas transgénicas de *A. thaliana* se llevó a cabo mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en silicuas por medio de una técnica conocida como inmersión floral ("floral-dip") con ayuda de Javier Mora Macias de la UGA, Cinvestav, de acuerdo al método reportado por Clough and Bent (1998).

Para ello, se transformaron por medio de electroporación células competentes de *A. tumefaciens* con el vector binario LR en donde fue insertado el gen de interés, que fue, en este caso: a) el gen eIF4E de *A. thaliana*, usado como control, b) el gen eIF4E de *Carica papaya* o c) el gen eIF(iso)4E de *C. papaya*. Se crecieron en medio líquido LB con antibióticos para seleccionar el plásmido binario a 28 °C hasta alcanzar la fase estacionaria determinada por la densidad óptica del medio a una longitud de  $OD_{600} = 0,8$  ( $\approx$  4-6 hrs). Se resuspendieron las células en 50mL de una solución de sacarosa al 5 % con Silwet L-77 a una concentración de 0,05 % (500  $\mu$ l / L).

Después, se utilizaron plantas sanas de *A. thaliana* antes de antesis, las flores prematuras abiertas se retiraron. Con una pipeta se colocaron gotas de la solución de *Agrobacterium* sobre los primordios florales y se cubrieron las plantas con bolsas plásticas.

Las plantas ( $T_0$ ) se abastecieron de agua y fertilizante con normalidad y se dejaron secar cuando las silicuas inoculadas maduraron. Una semana después, se cosecharon las semillas. Las líneas transformantes se seleccionaron usando un estereoscopio con fluorescencia y las semillas que expresaron GFP en la testa fueron sembradas en medio MS-agar usando el marcador de selección (Kanamicina). Las plantas transformantes ( $T_1$ ) se transplantaron al suelo, abasteciendo de agua y fertilizante con normalidad hasta la producción de silicuas maduras. Se cosecharon las semillas secas de las plantas  $T_1$  para obtener las líneas homocigotas  $T_2$  que fueron utilizadas para los experimentos de infección.

#### 4.10. Análisis de RNAs pequeños

Se secuenciaron dos bibliotecas independientes en cada condición, a partir de 100 mg de RNA total de una mezcla equimolar de RNA extraído de hojas distales (sistémicas) de seis plantas. Las condiciones analizadas fueron las siguientes: *Mock* (Control no infectado), y plantas inoculadas con PapMV, PRSV, PRSV+PapMV (en inoculación simultánea), PRSV→PapMV (inoculación con PRSV seguida por PapMV) y PapMV→PRSV (inoculación con PapMV seguida por PRSV). A partir de la generación de cDNA con oligos universales se colocaron adaptadores en ambos extremos 5' y 6' para identificar las bibliotecas. Las bandas de 145-160 pb fueron purificadas por SDS-PAGE, y fueron mezcladas en cantidades iguales y se secuenciaron todas las muestras en dos líneas utilizando secuenciación por síntesis de Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Los datos se analizaron como se describe en un reporte previo por (Fahlgren et al., 2009). Las secuencias de RNAs pequeños de *C. papaya*, PapMV y PRSV fueron analizadas, identificadas, mapeadas y se cuantificaron utilizando la versión *toolkit kraken* 13-274 (Wood and Salzberg, 2014). Se normalizaron las cuentas totales de reads por  $1 \times 10^6$ .



# 5

## Resultados

Los resultados presentados en esta tesis están basados en las publicaciones siguientes:

- Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology*, 489:179–191, Jan 2016 (Chávez-Calvillo et al., 2016).
- On the role of noncoding small RNA on antagonistic vs synergistic ternary interactions in plant-virus-virus infections. Chávez-Calvillo et al., (*Manuscrito en proceso.*)

### 5.1. Infecciones mixtas descritas en México

Un muestreo realizado en diferentes zonas productoras de papaya del territorio mexicano mostró un fenómeno que sugería que algún tipo de interacción mixta estaba ocurriendo en las plantas infectadas con virus (Noa-Carrazana et al., 2007).

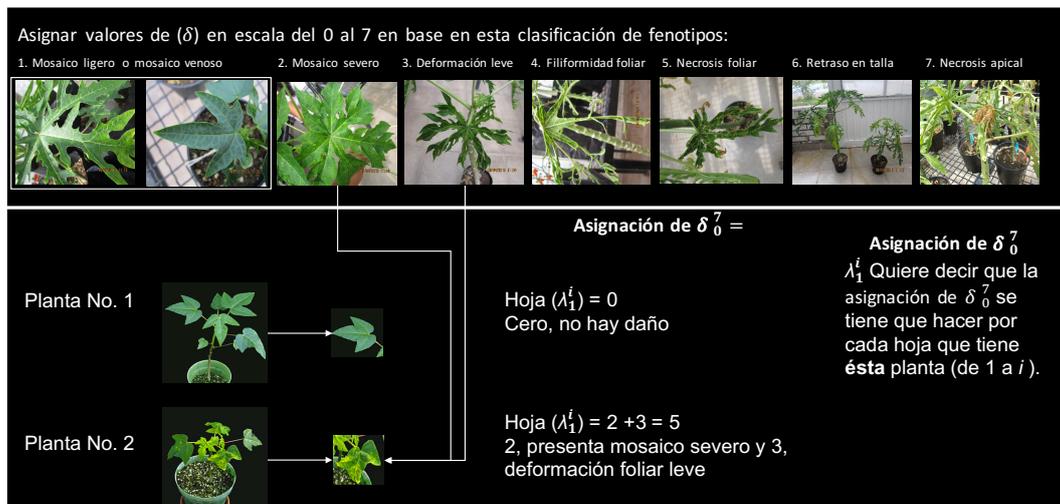
A partir del trabajo realizado por Noa-Carrazana et al. (2006), en donde identifica por primera vez en México a los virus PapMV y PRSV en cultivos de papaya a lo largo del territorio nacional, nace la inquietud de estudiar las infecciones mixtas e identificar si el orden de infección al hospedero tiene un efecto diferencial en los fenotipos de las plantas infectadas. Este investigador encontró que usualmente en cultivos infectados severamente prevalecía la coexistencia de PRSV y PapMV con títulos de virus altos. Como ya se sabía que las asociaciones PVX-potyvirus originan efectos dañinos como consecuencia de una interacción sinérgica, no fue sorprendente encontrar esa correlación; por ello se decidió estudiar esta interacción con más detalle y para ello se aislaron y purificaron ambos virus. En el reporte de Noa-Carrazana et al. (2006) se publicó una tabla como parte de los resultados suplementarios, donde se reportó que en cierto número de cultivos (2 de un total de 10 casos) los títulos de PapMV y PRSV eran muy altos sin que los síntomas fueran muy severos (sólo mosaicos en las hojas fueron reportados).

Más adelante, este investigador comenzó los experimentos posteriores al aislamiento y purificación de los virus, realizando infecciones mixtas (PapMV+PRSV) y agregando un componente de separación temporal entre las inoculaciones, generando los tratamientos de infección secuencial (PRSV→PapMV y PapMV→PRSV, respectivamente).

Este trabajo es una continuación de esa primera aproximación que subyace a complejas interacciones ecológicas que pueden coexistir entre dos virus y su planta hospedera.

## 5.2. Caracterización de las infecciones simples

Para confirmar que existe una relación sinérgica o antagónica, se tiene que demostrar que hay un incremento o disminución en el grado de severidad que producen las infecciones mixtas con respecto a las infecciones simples. Para ello inicialmente, caractericé las infecciones simples (con PapMV o PRSV), mixtas (PRSV+PapMV) y secuenciales (PRSV→PapMV y PapMV→PRSV, respectivamente) monitoreando la aparición de síntomas relacionados a la infección desde el día 0 post inoculación (dpi) hasta la muerte de las primeras plantas.



**Figura 5.1:** Síntomas observados en las infecciones simples y mixtas por PRSV y/o PapMV en plantas de papaya utilizadas para generar la escala de daño y metodología empleada para asignar los valores de  $\delta$

Con ello se generó una escala de la evolución de los *síntomas*, y se asignaron números enteros ascendentes según estos aparecieran en las plantas, a lo que llamo la «*escala de daño o  $\delta$* ». En ella el valor de 0 se asignó a plantas que no presentaron ninguno de los síntomas reportados en la escala. En forma subsecuente, se asignó el valor de 1 para aquellas plantas que presentaron mosaicos ligeros en sus hojas (los cuales se observaron en la primera etapa de la infección por PapMV) o mosaicos venosos (los cuales se observaron exclusivamente en la primera etapa de la infección por PRSV),

mientras que el valor de 2 se asignó a plantas que mostraron mosaicos severos. El valor de 3 se asignó para las plantas que mostraron deformación foliar ligera, de 4, cuando se observó filiformidad en las hojas, y de 5, cuando se presentó la necrosis foliar. Los síntomas que se desarrollaron a continuación sólo fueron observados en etapas avanzadas de la infección mixta. Se asignó el valor de 6, cuando se observó un retraso en la talla de la planta y 7 cuando la planta presentó necrosis y muerte apical (ver figura 5.1). La forma de cuantificar la severidad de los síntomas en una planta dada, se calculó por medio de la ecuación descrita en la sección 4.1.

Un ejemplo de cómo se realizó este cálculo se aprecia también en la figura 5.1. En donde en la planta No.1 es una planta sana que no muestra ninguno de los síntomas característicos de la escala  $\delta$ , por lo que se le asignó un valor de  $\delta = 0$ . Por su parte, la planta No.2 es una planta infectada con PRSV, en donde se aprecian los síntomas de mosaico severo y deformación foliar leve. Mediante el uso de la mencionada escala a esta planta se le asignó un valor de  $\delta = 5$ .

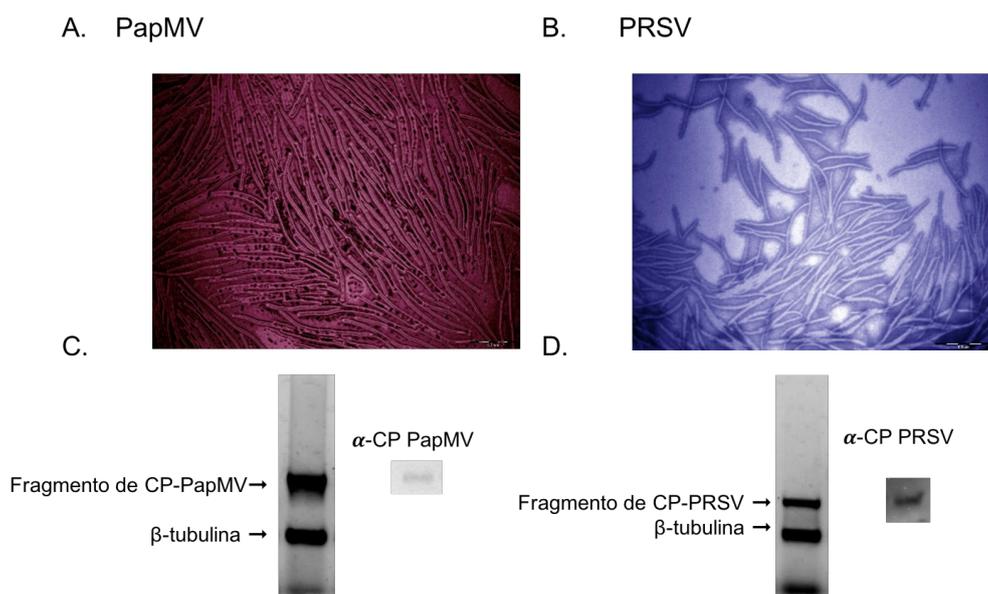
Con esta escala, se caracterizaron las infecciones simples, mixtas y secuenciales utilizando plantas de micropropagación y plantas de semilla. Dado que no se encontraron diferencias asociadas al origen de las plantas, se decidió trabajar con las plantas de semilla, por la facilidad de propagación.

Se purificaron los virus a partir de tejido de hoja infectado con PapMV o PRSV (trabajo apoyado por la Dra. Selene Aguilera) y se observaron las partículas al microscopio electrónico para confirmar su identidad (ver figura 5.2). Con la purificación de estos virus se realizaron ensayos de infecciones simples y se compararon con infecciones realizadas a partir de macerados de tejido infectado. Para determinar si existían diferencias atribuibles a la fuente de inóculo, se calculó el  $\delta$  y la acumulación de RNAs genómicos en estas plantas. Al no encontrar diferencias fenotípicas o en acumulación de RNA viral relacionadas a la fuente de inóculo, decidimos llevar a cabo las infecciones a partir de macerados de tejido infectado con PapMV o PRSV, siempre y cuando me asegurara de que el tejido no presentara contaminación cruzada y encontrara una forma de estimar el título viral que contiene el tejido utilizado para las infecciones.

### 5.3. Titulación de los inóculos

Para estimar el título viral presente en el tejido infectado usado para las inoculaciones, se realizó una titulación por RT-qPCR, a través de conteos de moléculas de RNAs genómicos de PapMV y PRSV. En donde, a partir de una curva estándar (ver sección 4.3) se estimó a continuación la cantidad de RNA genómico viral en el tejido infectado. En la figura 5.3 se observan las curvas obtenidas para la titulación viral del tejido infectado.

En cada planta, los títulos virales fueron distintos. Incluso, se observó una acumula-

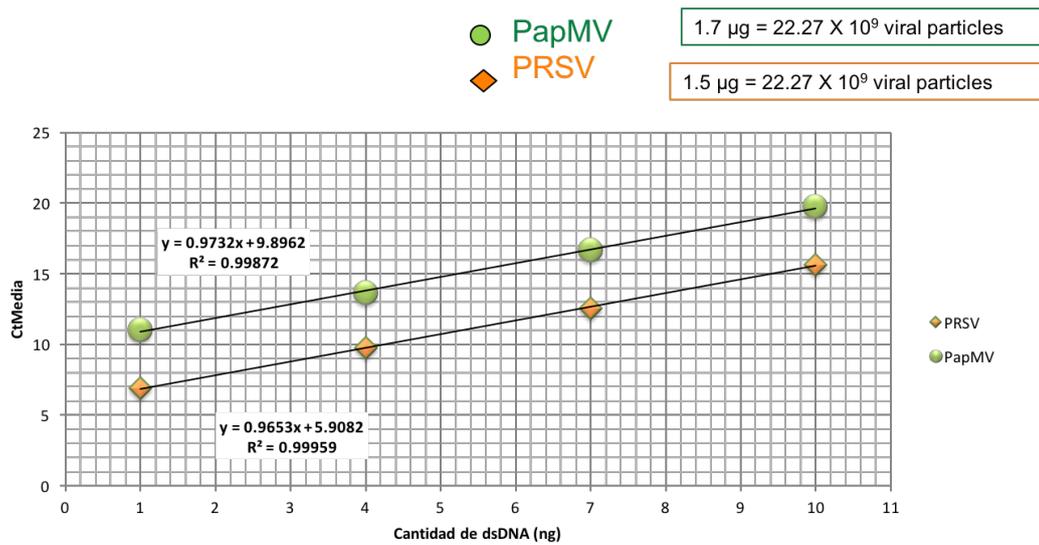


**Figura 5.2:** Partículas virales teñidas con ácido fosfotúngstico observadas en un microscopio electrónico. Un fondo de color ha sido sobrepuesto artificialmente al procesar la fotografía por medio de un editor de imagen. Panel A. Micrografía electrónica de partículas de PapMV, B. Micrografía electrónica de partículas de PRSV, C. RT-PCR con oligómeros multiplex para diagnóstico diferencial, la banda superior indica el fragmento correspondiente a la CP de PapMV, la banda inferior corresponde a un gen endógeno ( $\beta$ -tubulina) utilizado como control. La banda indicada como  $\alpha$ -CP PapMV, corresponde a la inmunodetección con anticuerpos contra la CP PapMV. En el panel D. Se observa el mismo sistema de diagnóstico RT-PCR triplex, en este caso la banda superior corresponde al fragmento de la CP de PRSV y en la inmunodetección se utilizaron  $\alpha$ -CP PRSV.

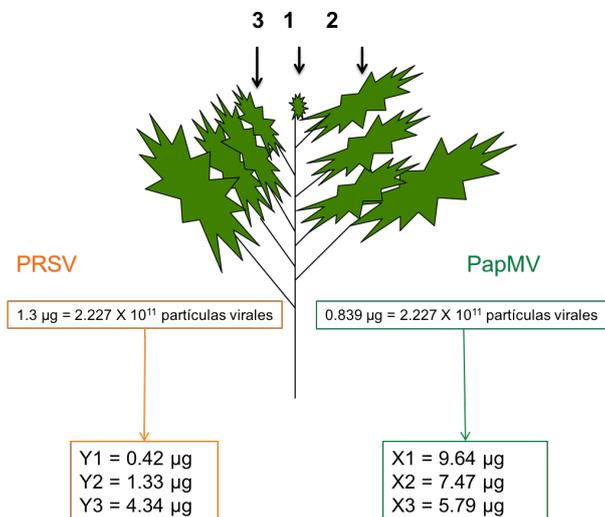
ción diferencial en las distintas hojas de la misma planta infectada. Así mismo, la acumulación fue distinta para cada virus, aunque ambos reflejan un patrón semejante, por ejemplo: en una planta infectada por PRSV (Y) se estimó que por cada 100 mg de tejido homogeneizado colectado para la extracción de RNA, en la hoja más joven (Y1) la acumulación alcanzó apenas 0.42  $\mu$ g correspondiente al gRNA del virus, mientras que los títulos virales se incrementaron a medida que la edad de la hoja se incrementó, ya que en la hoja localizada justo debajo de ésta (hoja Y2), la cantidad de virus se estimó en 1.33  $\mu$ g, y se acumularon aún más en la próxima hoja más vieja, donde la cantidad de virus fue de 4.3  $\mu$ g (hoja Y3). En este caso, se tomó la hoja Y2 con 1.3  $\mu$ g, y se utilizaron 4.5 g de tejido homogeneizado de Y2 que corresponden a  $2.227 \times 10^{11}$  partículas de PRSV (Y) (Ver figura 5.4).

En forma inversa, en las plantas utilizadas como fuente de inóculo para PapMV, se detectaron 9.64  $\mu$ g en la hoja X1 (ver figura 5.4 para identificar X1, X2, X3), 7.47  $\mu$ g en X2, y 5.7  $\mu$ g en la hoja X3. En este caso también se tomó la hoja X2 y se utilizó 1g de tejido de X2 que corresponde a  $2.227 \times 10^{11}$  partículas de PapMV (X).

Una vez obtenidos estos datos, fue posible realizar inoculaciones controlando la



**Figura 5.3:** Curvas estándar utilizadas para la estimación de partículas virales de PapMV (en círculos verdes) y PRSV (en rombos anaranjados) en tejido de hoja de papaya. En el eje de las ordenadas se graficaron los valores promedio de  $C_T$  obtenidos en el qPCR, en el eje de las abscisas se graficaron los valores (en ng) correspondientes a la cantidad conocida de las diluciones de DNA utilizadas. Se generaron dos regresiones lineales independientes para cada virus y con ellas se estimó la cantidad (en ng) de RNA genómico contenida en el tejido infectado.



**Figura 5.4:** Representación gráfica de la titulación de virus en hojas de papaya infectada con PRSV o PapMV. Las planta se dibujó como se observó cuando se realizó el corte de las hojas: 1 (la hoja más joven), 2 (la segunda hoja más joven), y 3 (la tercer hoja más joven) y la cantidad estimada de virus (en µg) correspondiente a cada virus: Para PRSV: Y1, Y2 y Y3. En el caso de PapMV: X1, X2 y X3.

cantidad de virus inicial aun utilizando macerado de tejido infectado para ambos virus.

## 5.4. Caracterización de las infecciones simples

Se utilizaron 32 plantas germinadas de semilla para cada grupo de este experimento. Las primeras 8 plantas fueron inoculadas con buffer de fosfatos, las siguientes 8 con tejido infectado con PRSV con una estimación de  $2.227 \times 10^{11}$  partículas virales, las siguientes 8 con tejido infectado con PapMV con una estimación de  $2.227 \times 10^{11}$  partículas virales, y las 8 plantas restantes fueron inoculadas con una mezcla de tejido infectado con  $1.1 \times 10^{11}$  de partículas de PRSV y de PapMV, respectivamente.

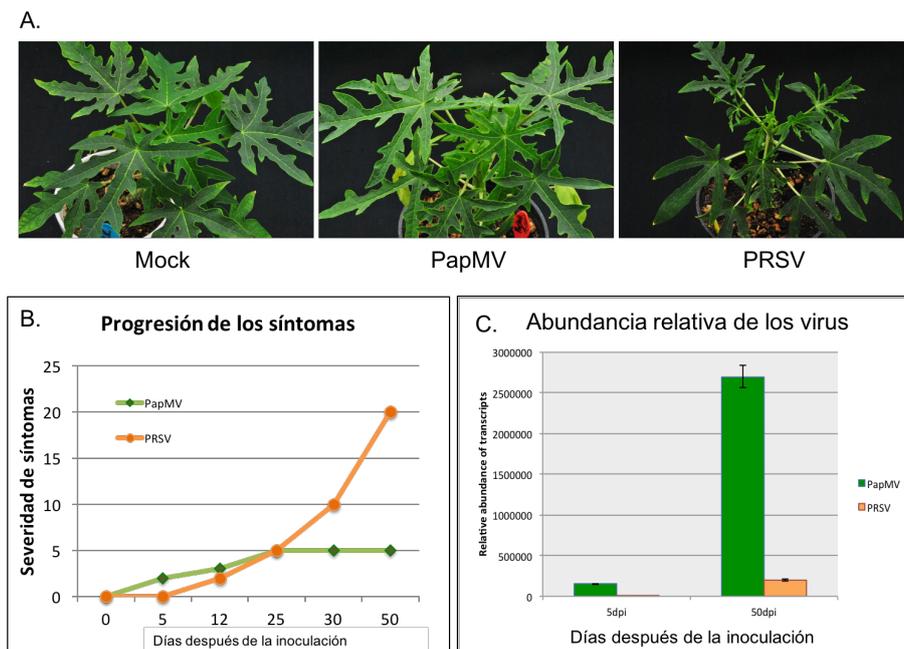
### 5.4.1. Caracterización fenotípica

Una vez realizada la inoculación, se evaluaron los daños causados por la infección por PapMV después de 0, 5, 12, 25, 30 y 50 días (en verde) o por PRSV (en naranja) por medio del valor de  $\delta$ . Los resultados de esta evaluación se graficaron en la figura 5.5, en el panel de la derecha, titulado como *Disease Progression* se observan los valores atribuidos a la severidad de síntomas estimados conforme al  $\delta$ . En esa gráfica se observa que PRSV produce 4 veces más daño que PapMV a los 50 dpi. Sin embargo, PapMV produce síntomas desde los primeros 5 dpi pero estos parecen mantenerse a lo largo del tiempo a partir de los 25 dpi, en donde se establece una especie de «saturación», pues el  $\delta$  asociado no incrementa. Este comportamiento fue contrario al observado en las plantas infectadas con PRSV, en las cuales los síntomas de la enfermedad no aparecieron sino hasta los 12 dpi, pero continuaron incrementando de manera casi exponencial al menos hasta los 50 dpi.

Debido al interés de saber si los títulos virales estaban relacionados con el incremento en  $\delta$  en las plantas infectadas con PapMV o PRSV, se realizaron mediciones de abundancia relativa de virus en la primer hoja distal (sistémica) a los 5 y 50 dpi.

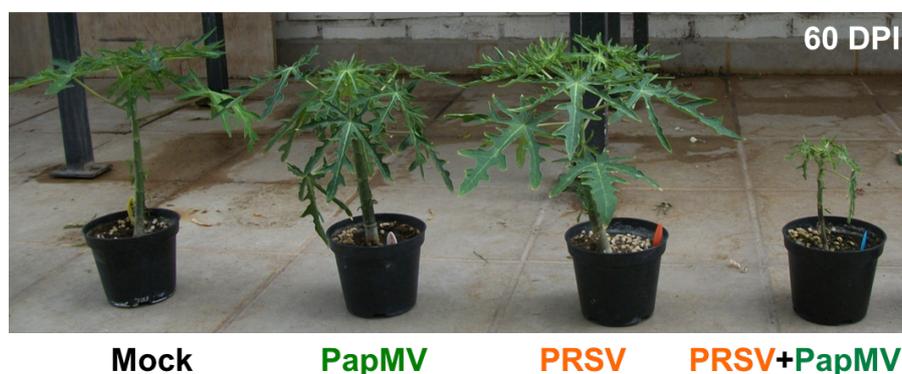
Se encontró que los títulos de PapMV fueron más altos desde los 5 dpi, y varios ordenes de magnitud más grandes a los 50 dpi. Lo que estos resultados sugieren, es que al menos para las infecciones producidas por PapMV y PRSV en papaya, la severidad de los síntomas en las infecciones simples parece que no estuvo relacionada con la cantidad de virus.

Una de las inquietudes que surgió a partir de este resultado fue la de indentificar qué estaba ocurriendo en las infecciones mixtas y si los títulos de los virus cambiaban al estar en una infección mixta. En este último caso, ¿competirían por los recursos celulares? ¿habría una separación espacial sobre los nichos celulares de conquista? ¿se vería eso reflejado en los síntomas, acumulación de RNA genómico o activación de maquinaria de defensa de la célula?. Una conjetura un poco más aventurada que se planteó fue si PapMV pudiera tener una estrategia distinta de adecuación a su hospedero y de alguna manera ser capaz de seleccionar poblaciones virales que producen menos daño a su hospedero simultáneamente con alta tasas de replicación.



**Figura 5.5:** Caracterización de las infecciones simples. En el panel A. Fenotipos de las plantas inoculadas con Mock (plantas control), PapMV o PRSV a los 50 dpi. B. Gráfico que muestra la progresión de la severidad de los síntomas (evaluado a través del  $\delta$ ) en las infecciones simples a lo largo de 50 días posteriores a la inoculación. C. Gráfico que muestra la estimación de la abundancia relativa de los virus PapMV (en verde) y PRSV (en anaranjado), por RT-qPCR a los 5 dpi y a los 50 dpi.

Para contestar algunas de estas preguntas, se realizó la coinfección de PapMV y PRSV en plantas de papaya. Los síntomas de las plantas coinfectadas muestran que existe un incremento en la severidad de los síntomas en comparación con los síntomas observados en las plantas inoculadas solamente con PapMV o con PRSV. Ver figura 5.6.



**Figura 5.6:** Fenotipos de plantas infectadas con buffer (Mock), PapMV, PRSV y coinfectadas con PapMV y PRSV a los 60 dpi.

## 5.5. Caracterización de las infecciones mixtas

Con base en los resultados anteriores, es posible que los fenotipos observados durante la infección mixta por PRSV y PapMV en papaya (ver figura 5.7) sean el resultado de la interacción ecológica conocida como sinergismo. Además, es muy probable que este tipo de infecciones sean comunes en la naturaleza, siempre y cuando la prevalencia de las enfermedades por PapMV y PRSV converja. Es por ello que se considera que los resultados reportados en la literatura y en este estudio posiblemente representen un artefacto que no refleja lo que realmente ocurre en el campo.

Por ello se decidió investigar qué ocurre al manipular las infecciones mixtas conforme el paso del tiempo. Al agregar esta nueva variable, se generaron dos tratamientos más: es decir, aquellas plantas inoculadas con PRSV que presentaban infección sistémica, reinoculadas con PapMV a los 30 dpi y evaluadas 30 después, es decir a los 60 dpi (PRSV→PapMV). Y viceversa, plantas con PapMV que presentan infección sistémica, reinoculadas con PRSV a los 30 dpi y evaluadas a los 60 dpi (PapMV→PRSV).

### 5.5.1. Caracterización fenotípica

Al comparar las plantas sanas (H, del inglés *Healthy*), las plantas inoculadas con PapMV (X), PRSV (Y), co-inoculadas con ambos virus (YX) así como en inoculación secuencial PRSV→PapMV (Y→X) y PapMV→PRSV (X→Y) se encontraron síntomas diferenciales (Ver figura 5.7). El marcado contraste observado refleja la complejidad de las interacciones que pudieran estar ocurriendo en la naturaleza, y es posible que se aproximen un poco más a las condiciones reales.



**Figura 5.7:** Fenotipos de las plantas infectadas con PapMV y PRSV en infecciones mixtas y secuenciales a los 60 dpi.

La caracterización fenotípica reveló que tanto la coinfección (XY) como la infección

secuencial ( $Y \rightarrow X$ ) producen un incremento drástico en la severidad de los síntomas. Sin embargo, parece ser que el hecho de que PapMV infecte previamente de manera sistémica a la planta afecta la generación de síntomas de PRSV cuando PRSV es reinoculado 30 días después. Este fenómeno puede observarse en la figura 5.7 en la esquina inferior derecha indicada como ( $X \rightarrow Y$ ). Las plantas correspondientes a ese tratamiento, presentaron una reducción en la severidad de los síntomas al ser comparados con los otros tratamientos, en los cuales plantas fueron inoculadas al mismo tiempo o secuencialmente de la forma  $Y \rightarrow X$ . Inclusive las plantas sometidas al tratamiento  $X \rightarrow Y$  presentaron menor daño que las plantas infectadas solamente con PRSV.

Quedaba pendiente, sin embargo, comprobar si las diferencias observadas en la severidad de los síntomas se debían a una interacción ecológica diferente o al hecho de que la infección por PRSV en el grupo de plantas inoculadas de la forma  $PRSV \rightarrow PapMV$  había alcanzado los 60 días, ya que en el grupo  $PapMV \rightarrow PRSV$  la infección por PRSV tuvo una duración de solamente 30 días. Para ello, debió confirmarse que la evaluación de los síntomas se hizo en el estado estacionario de la infección.

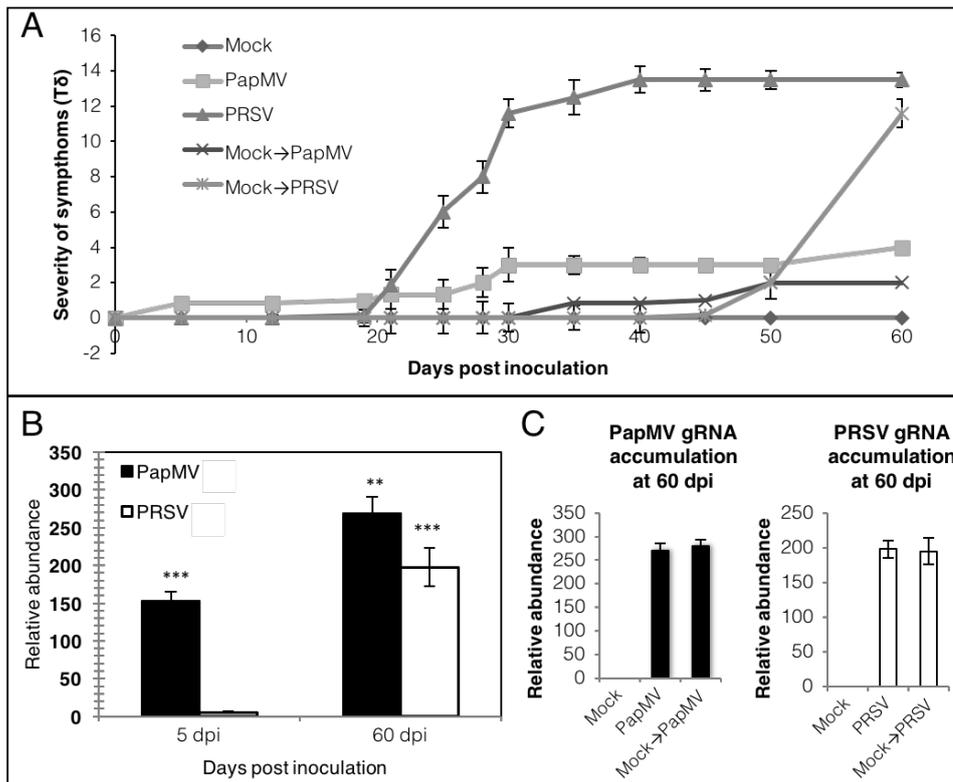
En consecuencia, se decidió incluir los controles  $Mock \rightarrow PapMV$  y  $Mock \rightarrow PRSV$ , y compararlos con las infecciones simples de PapMV y PRSV, respectivamente. Es decir, plantas inoculadas primero con buffer y 30 días después con el virus (PapMV o PRSV), fueron comparadas a los 60 dpi, con plantas inoculadas desde el día 0 con el virus (ver figura 5.8). En esta figura se observa una cinética (de 0 a 60 dpi, sobre el eje  $y$ ) de la severidad de los síntomas  $\delta$ , en el eje  $x$ , en donde se aprecia que desde los 30 días tanto PapMV como PRSV alcanzan una fase estacionaria, es decir, pasado este tiempo alcanzan el máximo de severidad y ya no desarrollan síntomas más severos posteriormente.

Además fue necesario asegurar que tampoco hubiese cambios en la acumulación de virus a los 30 dpi con respecto a los 60 dpi. Por lo que se decidió medir la acumulación de RNAs genómicos de ambos virus en las plantas inoculadas a los 30 días con PapMV o PRSV ( $Mock \rightarrow PapMV$  o  $Mock \rightarrow PRSV$ ) con respecto a las plantas inoculadas a los 60 días (ver figura 5.8). En esta se observa que los títulos fueron prácticamente idénticos a pesar de que hacía 60 días que las plantas con PapMV habían sido inoculadas, los títulos registrados no fueron diferentes a los detectados en el grupo de plantas  $Mock \rightarrow PapMV$ . Lo mismo se observó con plantas inoculadas con PRSV. Por lo que puede concluirse con certeza que a los 30 dpi se ha alcanzado ya una fase de «saturación» o estacionaria para las infecciones con un solo virus.

Consecuentemente, parece ser que las diferencias observadas en la severidad de los síntomas se deben a una interacción ecológica diferente entre los virus y no al hecho de que las plantas fueron reinoculadas 30 días después.

Para entonces, ya se tenía certeza de que era posible caracterizar eficientemente las infecciones mixtas e identificar la posibilidad de que algún tipo de interacción ecoló-

## 5. Resultados



**Figura 5.8:** Severidad de los síntomas y abundancia relativa de los RNAs genómicos en los tratamientos control: Mock→PapMV y Mock→PRSV, comparados con las infecciones PRSV→PapMV y PapMV→PRSV respectivamente. A. Progresión de la severidad de los síntomas (estimado por  $\delta$ ) a lo largo de 60 dpi en dichos tratamientos. B. Acumulación viral de PapMV (en negro) y PRSV (en blanco) estimada por RT-qPCR a los 5 dpi y a los 60 dpi, el gen eIF4E fue utilizado para normalizar por medio del método de  $\Delta\Delta C_T$ . La prueba de  $t$  mostró diferencias significativas para  $**p = 0,0088$  y  $***p = 0,0003$  respectivamente. C. Acumulación viral de Mock (en gris), PapMV (en negro) y PRSV (en blanco) estimada por RT-qPCR a los 60 dpi, el gen eIF4E fue utilizado para normalizar por medio del método de  $\Delta\Delta C_T$ . La prueba de  $t$  no mostró diferencias significativas entre la acumulación viral de PapMV entre los tratamientos Mock→PapMV y PapMV así como tampoco hubo diferencias significativas en la acumulación de PRSV entre los tratamientos Mock→PRSV y PRSV a los 60 dpi.

gica estuviese ocurriendo. Por definición las relaciones antagónicas entre patógenos producen un fenotipo benéfico para el hospedero; si una interacción de este tipo estuviese ocurriendo en las infecciones mixtas, no podría ser fácilmente identificable porque estaría por debajo del valor de  $\delta$  de la infección simple de ambos virus. Por el contrario, si una relación sinérgica estuviese ocurriendo, el valor de  $\delta$  estaría por encima del valor de la suma de la infección simple de PapMV y PRSV.

Para ello, se realizó una cinética en donde se determinó el daño total en diferentes tiempos  $\delta$  de los grupos de plantas: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV,

PRSV→PapMV y PapMV→PRSV durante 60 dpi (ver figura 5.9, panel A). En esa misma figura se puede observar también, en el panel B, que la primer hoja sistémica la cual se utilizó para cuantificar los niveles de clorofila *a* y *b*, muestran el mismo patrón que la evaluación de los síntomas, los niveles de clorofila son uno de los indicadores más importantes de *vitalidad* de una planta por ello no es sorprendente que correlacionen con la severidad de los síntomas.

Estos resultados muestran que la infección mixta PRSV+PapMV y la infección secuencial PRSV→PapMV incrementan significativamente el grado de severidad de los síntomas en planta, lo que corresponde a una interacción sinérgica, que afecta la *vitalidad* de la planta, por lo que es dañina para su hospedero.

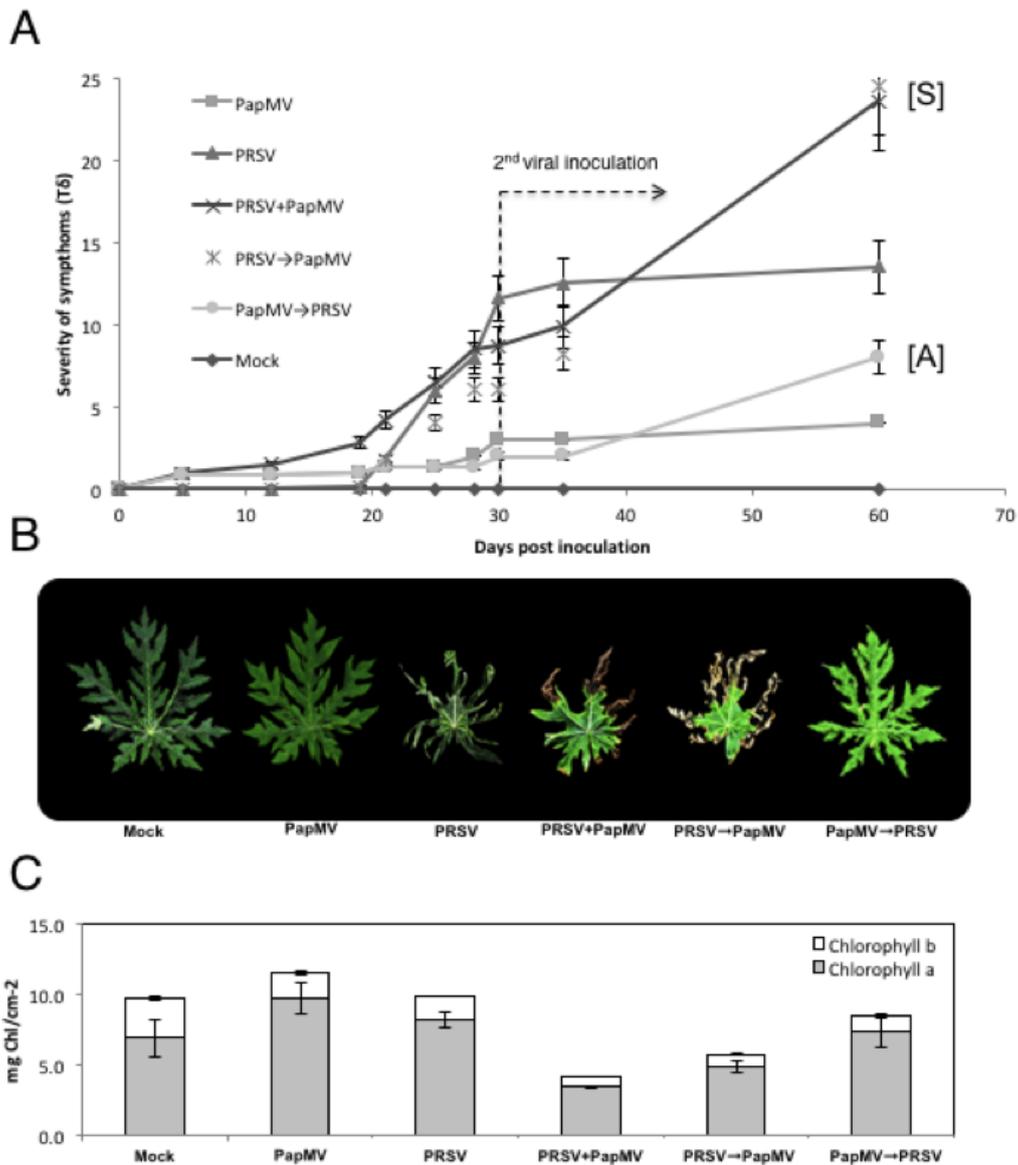
Por el contrario, también se observó que la infección secuencial PapMV→PRSV reduce la severidad de los síntomas y es benéfica para su hospedero (ver figura 5.9).

A continuación se hicieron experimentos para intentar encontrar una explicación a estos fenotipos a nivel molecular. Para ello, se pensó que era necesario mirar hacia los virus y estimar su abundancia relativa de RNAs genómicos, RNAs intermediarios de replicación viral y acumulación de proteína de la cápside en los tratamientos y evaluar si algunas de estas moléculas podrían contribuir a explicar el origen de las interacciones diferenciales antagónico-sinérgicas que se habían observado. Dado que una de las hipótesis propuestas para explicar las interacciones sinérgicas en tabaco se basó justamente en el drástico incremento de la acumulación de productos del potexvirus, se procedió a determinar si el mismo modelo podía ser aplicado en el caso de papaya.

Para ello, se realizó la caracterización molecular de los RNAs genómicos, RNAs intermediarios de replicación viral y acumulación de proteína de la cápside en los tratamientos: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi (ver figura 5.10). En ésta, es posible observar que, contrario a lo que se esperaba, no se observó un incremento en la acumulación de productos o intermediarios potexvirales en las condiciones sinérgicas.

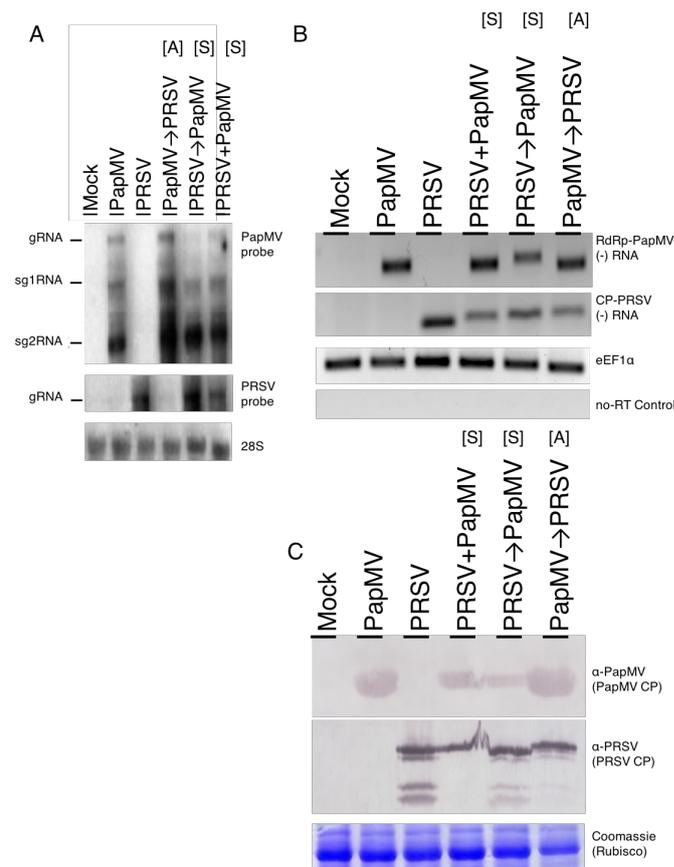
También se encontró una correlación entre la reducción de la acumulación del RNA genómico de PRSV (ver figura 5.10 panel A) y la reducción en severidad (ver figura 5.9 en la condición PapMV→PRSV). Este comportamiento sugiere que la reducción en las poblaciones del virus podría ser la responsable de que no se alcance una cantidad suficiente de virus para que se presenten síntomas severos de la infección. La presencia de una reducida, pero aún sustancial acumulación de CP de PRSV (ver figura 5.10, panel C), sugirió que esto no era del todo correcto o que posiblemente hubiese algún error durante la experimentación. Sin embargo, los resultados obtenidos en numerosos experimentos independientes fueron muy consistentes. Pero estos aún no permitían explicar por qué, a pesar de la reducción tan drástica del RNA que da origen a la CP, la acumulación de CP no se observó afectada.

Debido a ello se decidió medir la cantidad de RNA genómico y CP por medio de



**Figura 5.9:** Caracterización fenotípica de las interacciones sinérgicas «S» y la interacción antagonística «A». (A) Cinética de la severidad de los síntomas, usando *d* a lo largo de 60 dpi, (B) fenotipos característicos de la primer hoja sistémica, (C) medición de clorofila *a* y *b*. Grupos de plantas: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV->PapMV y PapMV->PRSV a los 60dpi

técnicas cuantitativas. Aún así, se obtuvieron resultados similares (ver figura 5.11). De manera que las tendencias generales observadas hasta estos momentos eran

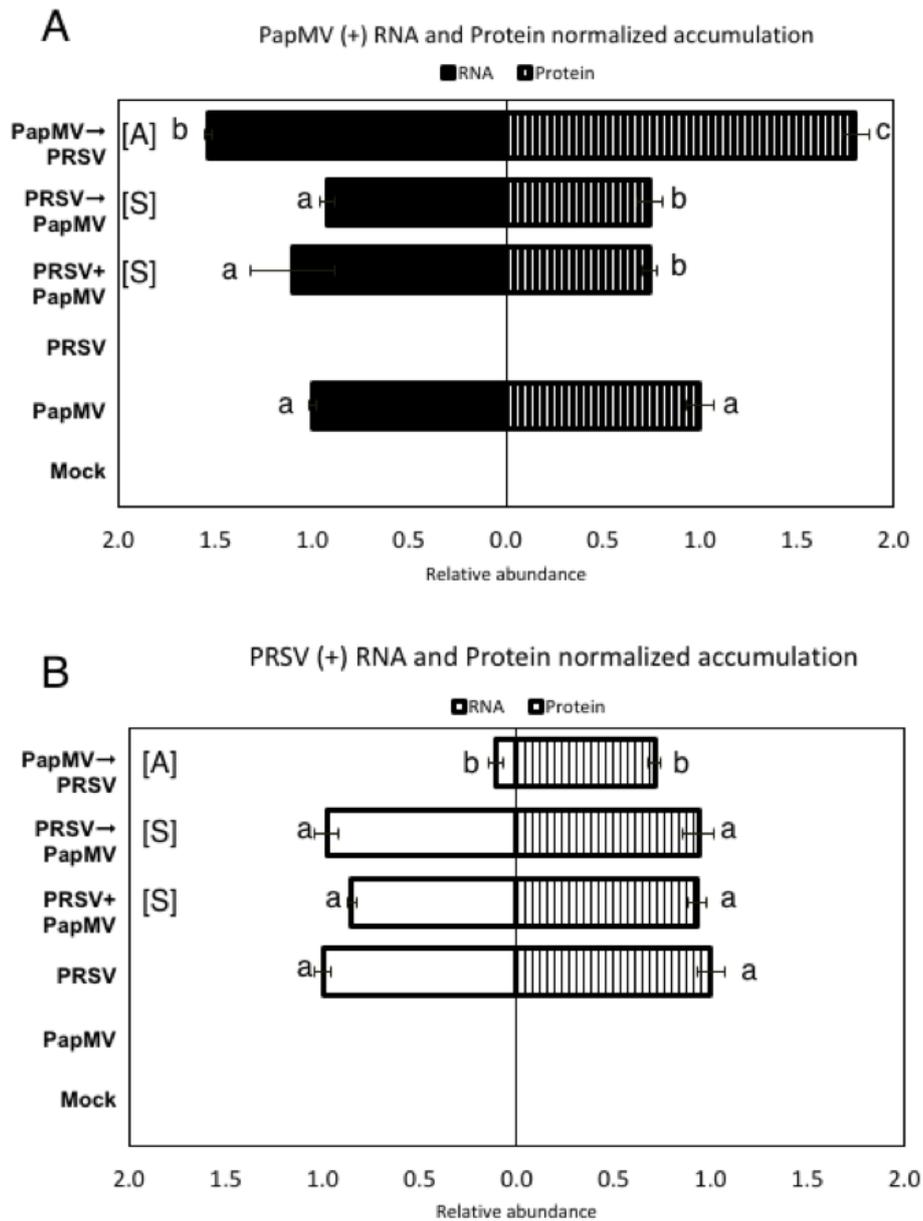


**Figura 5.10:** Abundancia relativa de los RNAs genómicos (A), RNAs intermediarios de replicación viral (B) y acumulación de proteína de la cápside (C) en los tratamientos: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi.

las siguientes: (1) durante el sinergismo, no sólo no se presentó un incremento en la cantidad de RNA PapMV, sino que hubo una disminución en la acumulación de la proteína de la capsida de PapMV. En contraste, no se observan cambios en la acumulación de PRSV. (2) durante el antagonismo, el incremento en el RNA genómico de PapMV fue significativo ( $P < 0.005$ ) así como la cantidad de CP de PapMV. A diferencia de la interacción sinérgica, se observó una reducción drástica del RNA genómico de PRSV, así como una reducción en la CP, sin embargo ésta fue mucho menor (ver figura 5.11).

El análisis de estos resultados generó nuevas preguntas: ¿cómo es posible que PRSV se siga traduciendo cuando hay tan poco (+)RNA? ¿Es posible que el mecanismo que subyace a la interacción antagonista esté más relacionado con la maquinaria de traducción?. Así mismo, tomando en cuenta que en otras interacciones antagonistas se ha observado que la maquinaria de RNAi participa de manera activa en el silenciamiento de RNAs virales, ¿podría ser el caso de que directa o indirectamente las poblaciones de RNAs pequeños interferentes derivados de virus (vsiRNAs), estuvieran involucradas?. Y por último, pero no por ello menos importante, ¿qué parte del

mecanismo de defensa de la planta está participando?



**Figura 5.11:** Abundancia relativa de los RNAs genómicos de PapMV (en barras sólidas negras) y PRSV (en barras sólidas blancas) y acumulación de proteína de la cápside de PapMV (en barras rayadas negras con blanco) y de PRSV (en barras blancas con negro) en los tratamientos: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. Un análisis de varianza fue utilizado para identificar diferencias estadísticas entre tratamientos, los resultados de una prueba *post-hoc* (análisis de Tukey) son mostrados con las letras a, b y c.

Se sabe que las moléculas de RNA mensajero se unen al inicio de la traducción a factores proteínicos, formando complejos RNA-proteína que unen primero a la

subunidad menor, que a su vez recluta a la subunidad ribosomal mayor formando complejos que tienen diferentes densidades dependiendo de la cantidad de ribosomas a los que esté unido el mensajero. Este tipo de estudios brindan la posibilidad de identificar aquellos mensajeros que están siendo asociados a muchos ribosomas (poliribosomas o polisomas) lo cual tiene una implicación directa sobre la eficiencia con lo cual esa molécula de RNA mensajero es traducida.

Los resultados de esta estrategia experimental confirmaron que durante la interacción antagónica apenas es posible amplificar un fragmento de PRSV, lo que fue un claro indicio de la escasa abundancia de su gRNA comparada con las detectadas en la infección simple o en las interacciones sinérgicas. Sin embargo, la localización de estas moléculas se ubicó en las fracciones más pesadas, lo cual reflejó que aunque los mensajeros son poco abundantes, están unidos a muchos ribosomas, lo que sugiere que están teniendo una traducción muy eficiente (ver figura 5.12).

Por el contrario la detección de moléculas de RNA de PapMV durante la interacción sinérgica se localizó solamente en las primeras fracciones, de la 1 a la 4 en las plantas coinoculadas con PRSV+PapMV y de la 1 a la 6 en la condición PRSV→PapMV. Estos resultados sugieren que en estas condiciones el RNA mensajero no está asociado a las fracciones que tienen mayor eficiencia durante la traducción (ver figura 5.12).

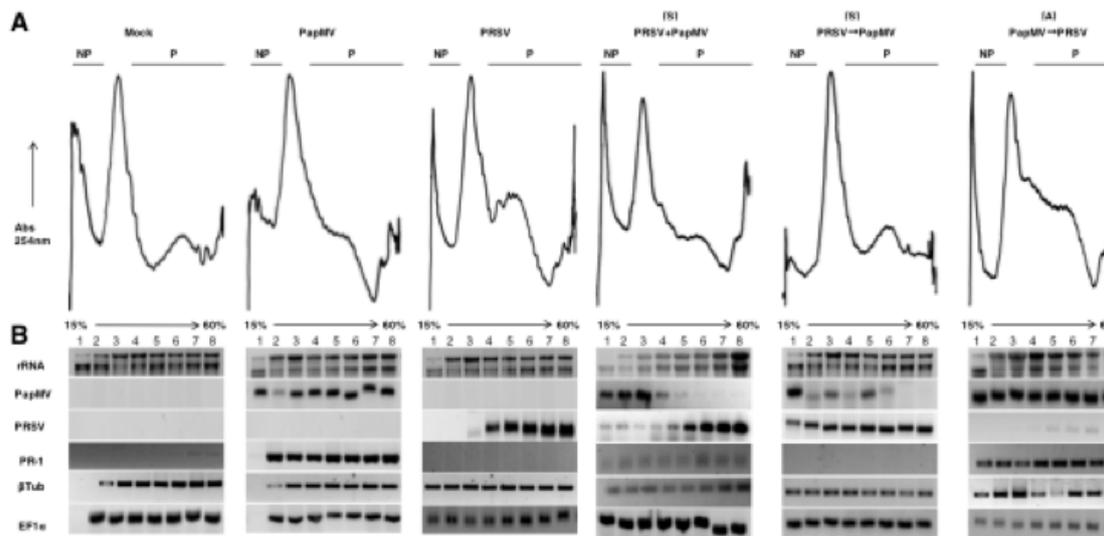
Estos resultados ofrecen una explicación a la acumulación de proteína de la cápside de PRSV presente durante el antagonismo (ver figura 5.10) aún cuando hay una reducción casi total en el gRNA de PRSV. Lo que parece estar ocurriendo es que esta cantidad tan pequeña de moléculas tienen una estrategia de traducción mucho más eficiente, posiblemente explicada por la presencia de la VPg, la cual es una proteína que emula la estructura canónica de los RNAs mensajeros para reclutar la maquinaria de inicio de la traducción (Eskelin et al., 2010).

Con respecto al sinergismo, estos resultados también explican que la reducción en la CP de PapMV observada en la figura 5.10, se debe a que esas moléculas no están siendo traducidas de manera tan eficiente como cuando PapMV se inocula en la infección simple o cuando es inoculado primero sobre una planta sana como en el caso de la interacción antagónica (ver figura 5.12).

Sin embargo, aún no se tiene una propuesta sólida para explicar la reducción en la cantidad de moléculas de RNA de PRSV durante la interacción antagónica.

## 5.6. Análisis de siRNAs

Para definir si la reducción en las moléculas de RNA de PRSV durante la interacción antagónica era el resultado de la degradación de RNA por medio de una respuesta activa de la maquinaria de silenciamiento de RNA de la planta, se decidió analizar las poblaciones de RNAs pequeños de las diferentes condiciones.



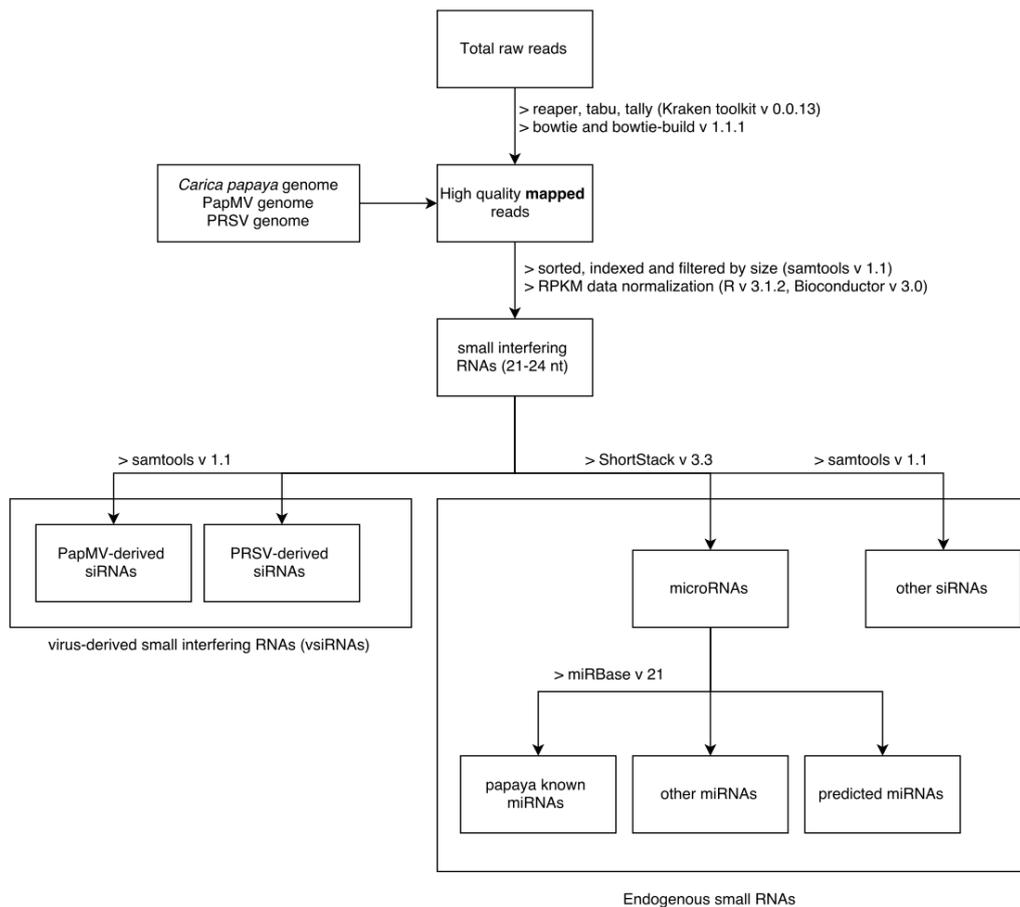
**Figura 5.12:** Perfiles poliribosomales (A) y RT-PCRs (B) de las 8 fracciones obtenidas a través de la separación por medio de un gradiente continuo de sacarosa del 15% al 60% de los RNAs mensajeros ligeros o no asociados a poliribosomas (fracciones 1-2) y RNAs mensajeros pesados o asociados a poliribosomas (fracciones 3-8) de tejidos de papayas inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV colectado a los 60 dpi.

A partir del total de las lecturas, se filtraron los *reads* de alta calidad y se mapearon en el genoma de *Carica papaya*, PapMV y PRSV. Este subconjunto de lecturas tienen tamaños de 6 a 50-52 nucleótidos (nt), sin embargo, el 98% de las lecturas se ubicó entre los 20 a 24 nt, que corresponde justamente a la población conocida como RNAs pequeños interferentes. La distribución del total de estos RNAs pequeños mapeados a los genomas de *Carica papaya*, PapMV y PRSV, pueden observarse en la figura 5.14.

Solamente 8 lecturas dieron *hit* tanto en el genoma de la planta como en el genoma de PapMV. Estos se encuentran en 2 locus distintos, ya que 2 lecturas se identificaron en el contig 524852.122 y las otras 6 lecturas en el contig 89255.357. Esto resultó interesante, porque creo que podría ser una evidencia de que ocurrieron eventos coevolutivos y de transferencia de genes entre este patógeno y su hospedero. Sin embargo, esta posibilidad no fue explorada con más profundidad.

También, se encontró que alrededor de un 60% de los RNAs pequeños (sRNAs) de las plantas infectadas corresponden a sRNAs endógenos de 21 nt. En el caso de las infecciones por PRSV, los RNAs pequeños de 21 nt que mapean al genoma de este virus alcanzan hasta un 15% del total de las lecturas y en las plantas infectadas solamente con PapMV llegan a ser alrededor de 21%. Por lo tanto las poblaciones más abundantes de RNAs pequeños son las especies de 21 nt.

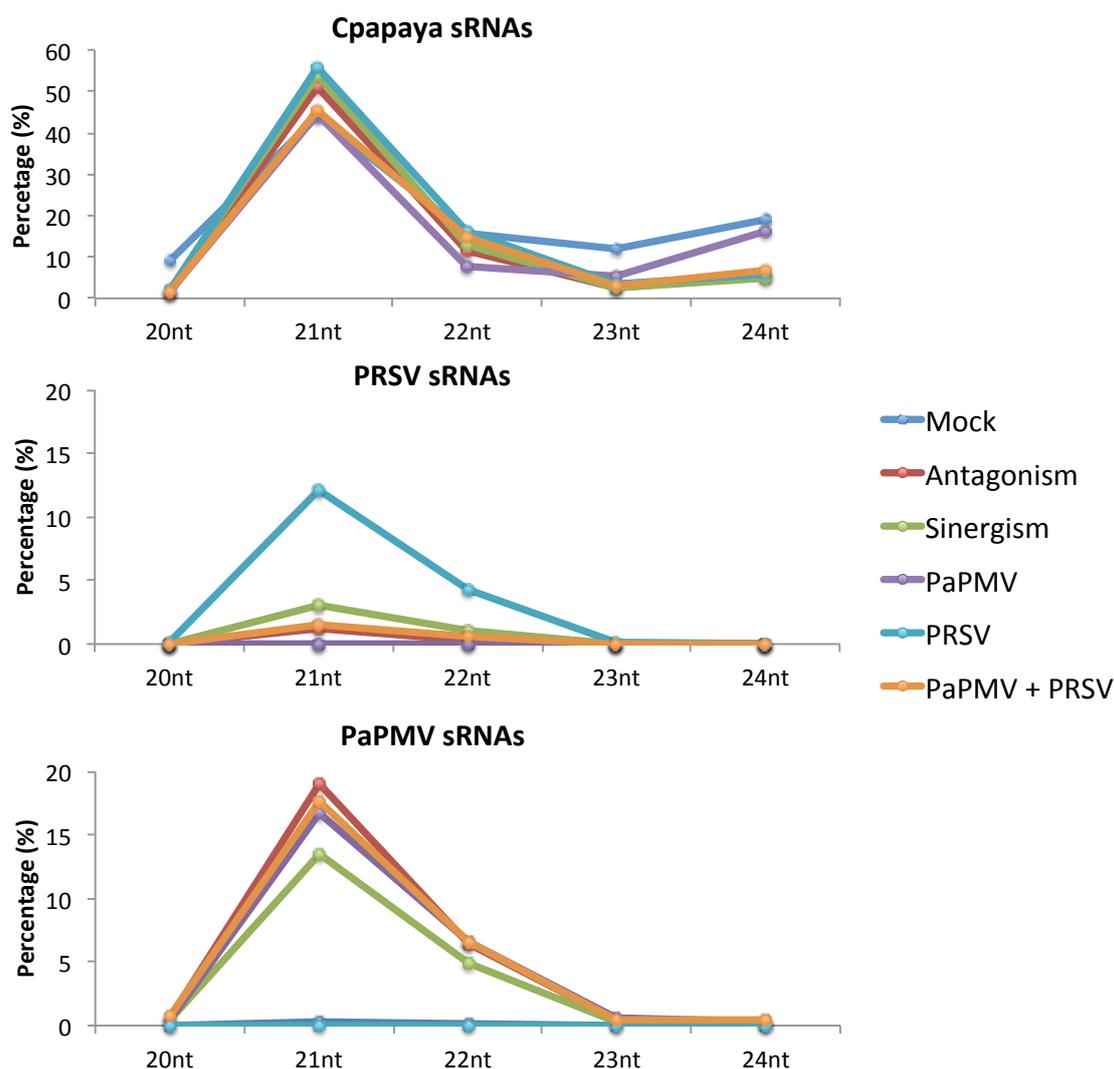
Esto es relevante debido a que se sabe que el silenciamiento de RNA de virus de



**Figura 5.13:** Esquema general del análisis de datos de la secuenciación masiva de RNAs pequeños por Illumina.

RNA y DNA depende de factores que participan en la biogénesis de siRNAs de 21 nt que son derivados del reconocimiento de moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA, sus siglas en inglés), los cuales son producidos por el virus mediante su replicación, pero identificados por la planta como (MAMPs) (ver sección 2.4.0.2) por proteínas de la familia de ribonucleasas similares a Dicer, (DCL-4 en *A. thaliana* es la que genera los fragmentos de 21 nt) que reconocen y cortan las moléculas de dsRNAs generando RNAs pequeños derivados de virus (vsiRNAs). Algunos de estos sirven como templado para la amplificación de la respuesta promoviendo la formación de siRNAs secundarios que son generados por las RNAs polimerasas dependientes de RNA del hospedero (RdRP, por sus siglas en inglés *RNA-dependent RNA Polymerase*). Los otros siRNAs son reconocidos por proteínas de tipo Argonauta y silencian por medio del reconocimiento homólogo a los RNAs virales produciendo su degradación (ver figura 2.8).

Llama la atención, el hecho de que cualquiera que sea la naturaleza de la infección mixta (sinérgica o antagónica) se observa una fuerte disminución en los vsiRNAs de PRSV (ver figura 5.14), lo cual al inicio se pensó que podría reflejar la actividad de supresión de silenciamiento de HCPro. Sin embargo, esta reducción no se observó



**Figura 5.14:** Perfiles de RNAs pequeños de 20 a 24 nucleótidos, mapeados hacia los genomas de papaya, PapMV y PRSV en plantas inoculadas con buffer (Mock), PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi.

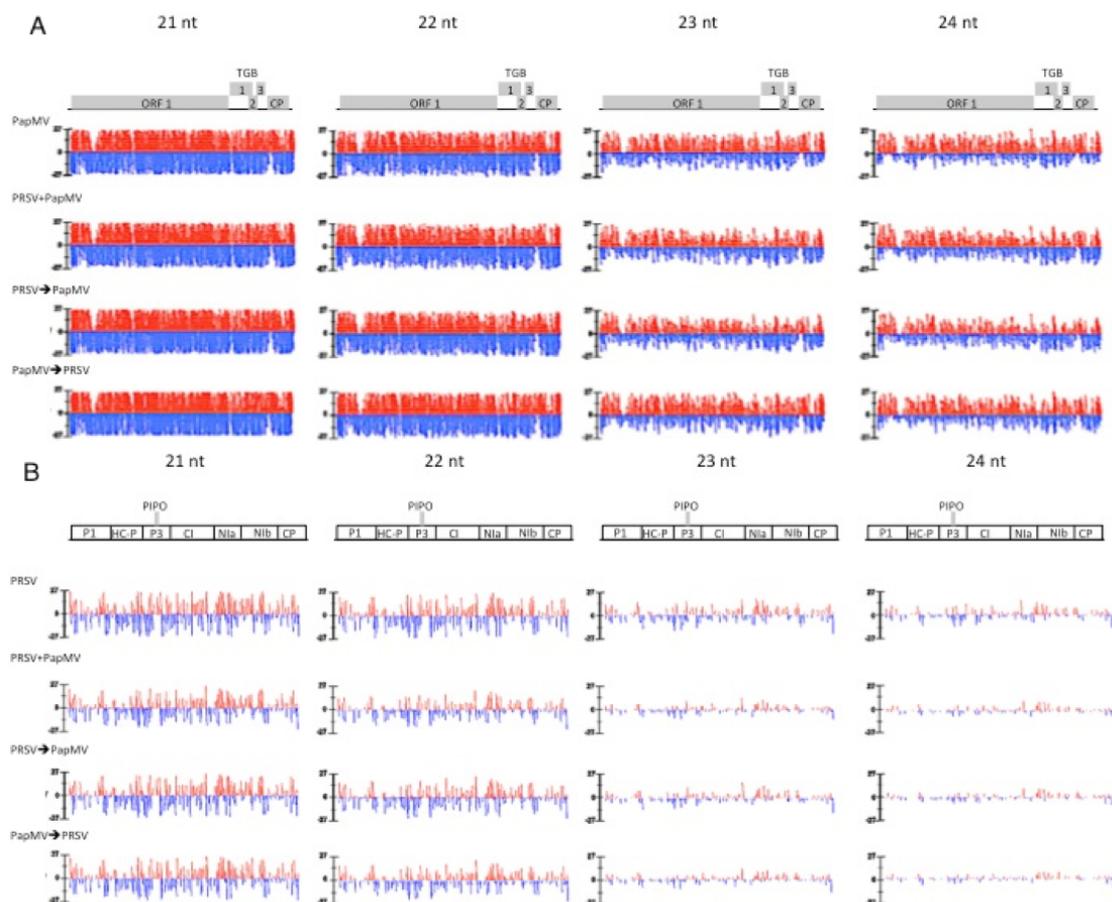
durante la infección simple por PRSV y tampoco tuvo un efecto sobre los vsiRNAs de PapMV, lo que sugiere que la presencia de PapMV es de algún modo necesaria.

### 5.6.1. vsiRNAs

Al identificar del conjunto de RNAs pequeños de 21-24 nt aquellos que empalmaron con los genomas de los virus PapMV o PRSV, se reconoció que correspondían a RNAs pequeños derivados de PapMV (PapMV-siRNAs) y PRSV-siRNAs. Estos RNAs cubren el total de los genomas virales y en todos los tratamientos muestran el mismo patrón, por lo que se consideró que no era posible atribuirles ninguna relación con la severidad de los síntomas (ver figura 5.15).

En la figura 5.15 se muestran los perfiles de plantas inoculadas con buffer (Mock), PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. Los vsiRNAs de 21, 22, 23 y 24 nt mapeados y normalizados a lo largo de los genomas virales se identificaron con dos colores: los vsiRNAs (+) en rojo, son los que silencian cadenas de RNA (-) que sirven como intermediarios de la replicación y los vsiRNAs (-) en azul, silencian cadenas de RNA (+) e impiden su traducción.

En general todas las gráficas tienen la misma distribución, por lo que se estimó que se trata de siRNAs primarios y no derivados de la transactivación. Otra evidencia de que se trató de vsiRNAs primarios es que la mayoría de ellos correspondieron a fragmentos de 21 nt, que es el tamaño más comúnmente reportado para estos RNAs pequeños.



**Figura 5.15:** Perfiles de vsiRNAs en plantas: Mock, PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV a los 60dpi. En rojo se observan las lecturas que corresponden al genoma viral en sentido  $5' \rightarrow 3'$ , en azul se observan las lecturas que corresponden al genoma viral en sentido  $3' \rightarrow 5'$  de A. PapMV ó B. PRSV.

Los siRNAs derivados de PapMV son mucho más abundantes y cubren  $\sim 35x$  del genoma del virus, posiblemente debido a que es el virus que tiene los títulos más altos, de los cuales se origina esta acumulación. También se observó esta correlación

en todas las condiciones en las cuales se usó el virus PRSV. La diferencia fue que este virus que presentó títulos más bajos y la cantidad de vsiRNAs derivados de PRSV también fue más baja, pues apenas alcanzó a cubrir ente 3 y 7x la totalidad del genoma de PRSV.

Todos estos resultados nos sugieren que los mecanismos para contrarrestar la infección de los virus que dependen de vsiRNA no están relacionados a las interacciones sinérgicas o antagónicas.

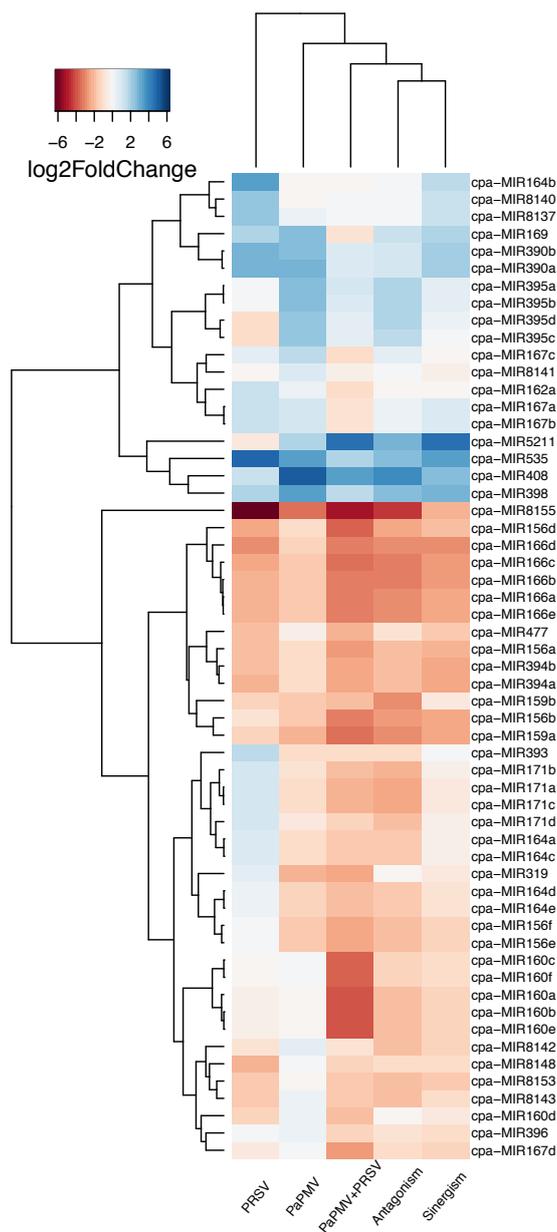
### 5.6.2. miRNAs

A partir de los miRNAs previamente reportados para *C. papaya* obtenidos a partir de un análisis computacional y posteriormente depositados en la miRBase, se generó un subconjunto de lecturas que empalmaron con los criterios descritos por Porter et al. (2008) para determinar el origen de los miRNAs.

El análisis realizado en este estudio indica que miRNAs endógenos se acumulan diferencialmente durante el antagonismo cuando se compara con sinergismo. Dicho hallazgo sugiere que existe un efecto diferencial sobre la biogénesis de siRNA y la función potencial de miRNAs durante la interacción de virus-virus en la planta de papaya. También se identificaron siRNAs derivados de virus implicados específicamente en la respuesta de defensa de las plantas contra PapMV o PRSV. Las poblaciones de vsiRNAs de PapMV son mucho más abundantes en todos los tratamientos a las poblaciones de vsiRNAs de PRSV. Esto posiblemente se explique por la presencia de la proteína HC-Pro del potyvirus que se ha reportado genera supresión del silenciamiento de RNAs de interferencia, esto se observó en todos los tratamientos con PRSV en inoculación simple o mixta, sin observarse diferencias entre las interacciones sinérgicas o antagónicas.

A partir del análisis bioinformático previamente descrito (ver figura 5.13) se filtraron aquellas lecturas que dieran *hit* con secuencias reportadas como miRNAs de *C. papaya* a partir de su comparación con la base de datos miRBase. Como resultado de este análisis se obtuvieron datos relacionados a la acumulación diferencial de miRNAs durante las interacciones sinérgicas y antagónicas. Esto puede ayudar a explicar algunos de los fenotipos contrastantes, las diferencias de acumulación pueden observarse en el mapa de calor de la figura 5.16. El color rojo refleja una acumulación diferencial mayor con respecto al tratamiento control y el color azul una acumulación diferencial menor con respecto al tratamiento control.

Finalmente, se observó que en todas las inoculaciones en donde PRSV está presente, los siRNAs endógenos de 24 nt fueron disminuídos en su acumulación con respecto al tratamiento control (Mock) y al tratamiento en donde PapMV fue inoculado.



**Figura 5.16:** Mapa de calor en donde se graficó el logaritmo en base 2 de las veces de cambio ( $\log_2\text{FoldChange}$ ) de la acumulación de microRNAs en plantas inoculadas con PapMV, PRSV, PRSV+PapMV, PRSV→PapMV y PapMV→PRSV diferencialmente al tratamiento control (Mock) a los 60dpi. El color rojo se utilizó para representar las veces de cambio «negativo», el color azul representa las veces de cambio «positivo». En análisis jerárquico de arriba se realizó aleatoriamente para agrupar aquellos los tratamientos que tuvieran miRNAs similarmente acumulados. El análisis jerárquico de la izquierda fue secundario y se realizó para agrupar la acumulación de los miRNAs.

## 5.7. Respuesta de la planta a la infección viral

Debido a que durante la interacción antagonica aún no se encontraba la causa de la reducción tan drástica en la acumulación de RNA de PRSV, decidimos evaluar 37

posible participación de la respuestas inmune de la planta mediada por PR-1. Para ello, se analizaron los niveles de la expresión diferencial de este gen en los diferentes tratamientos.

PR-1 es un marcador molecular útil y estable para evaluar la SAR, que está relacionada con la presencia del ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés *Salicylic Acid*). Para verificar si la expresión sistémica del gen PR-1 fue provocada por una infección viral, se analizó su expresión relativa por qPCR en hojas sistémicas a 60 dpi, durante las interacciones antagónicas o sinérgicas.

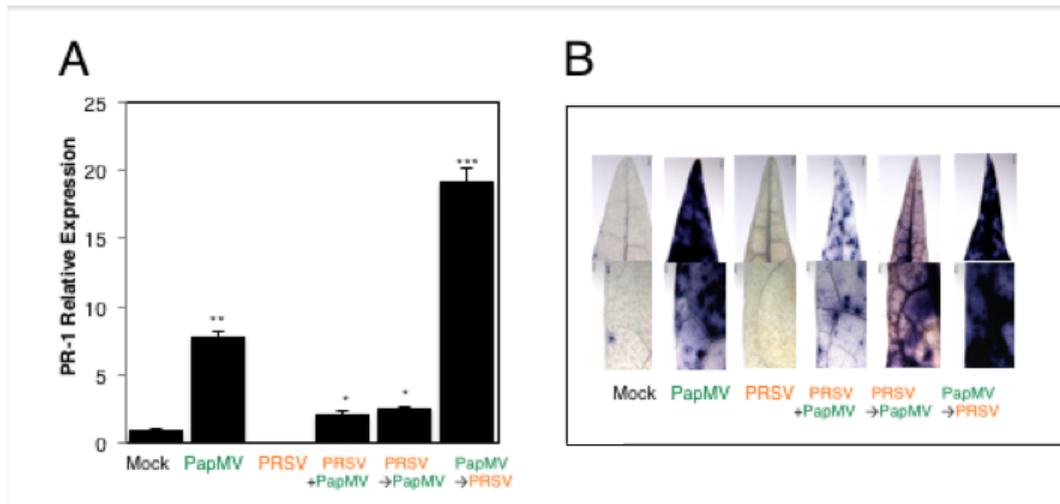
Se encontró que en el tejido sistémico de todas las plantas infectadas por PapMV se presentó una inducción de la expresión génica de PR-1. Durante las interacciones sinérgicas (PRSV + PapMV y PRSV→PapMV), PR-1 incrementó 2.2 y 2.5 veces, respectivamente. El cambio relativamente pequeño en el grupo de plantas infectadas de la forma PRSV→PapMV podría explicar también por qué no se detectó la amplificación de este gen por RT-PCR de la PR-1 en el análisis de polirribosomas (ver fig. 5.12). Tampoco se observó ningún cambio en la expresión de PR-1 durante la infección simple por PRSV en comparación con las plantas de mock. Sin embargo, en la condición antagónica (PapMV→PRSV), los niveles de PR-1 aumentaron 20 veces (ver figura 5.12).

Finalmente, se midió la producción sistémica del ion superóxido ( $O^2$ ) en hojas distales a los 60 dpi, usando cloruro de nitro azul tetrazolio (NBT) como sustrato de la tinción histoquímica. Esta forma de ROS fue fuertemente inducida en la interacción antagónica y la respuesta correlacionó con el incremento significativamente mayor de la expresión génica relativa de PR-1. Por el contrario, esta respuesta ROS en plantas infectadas únicamente con PapMV apareció ligeramente inferior en el análisis histoquímico, pero no tan baja como durante las interacciones sinérgicas (ver figura 5.17).

Como corolario, podría mencionarse que la infección por PapMV en papaya reduce la severidad de los síntomas producidos por PRSV. Este comportamiento está de acuerdo con la observación de que las infecciones mixtas que se producen en la naturaleza reflejan complejas interacciones ternarias que producen ventajas o desventajas en sus hospederos y son parte de un extenso proceso de coevolución planta-patógeno. Dicho fenómeno, una vez entendido, podría ser exitosamente utilizado para el desarrollo de plantas resistentes o tolerantes a las enfermedades virales.

### 5.8. icDNA autoreplicativo de PapMV y PRSV

La generación de «*clonas infecciosas*» o cDNAs infecciosos (icDNA, por sus siglas en inglés *infectious cDNA*) de virus de (+) RNA es una herramienta fundamental para el estudio de los elementos genéticos, su funcionalidad y el esclarecimiento de sus interacciones con moléculas celulares. A partir de los icDNA es posible generar



**Figura 5.17:** Respuesta diferencial de PR-1 y ROS a las infecciones virales. A. Expresión relativa del gen PR-1 (barras sólidas en negro) en plantas de papaya inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PapMV+PRSV, PRSV→PapMV, y PapMV→PRSV analizado en tejido de hoja sistémica a los 60 dpi. Un análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey posterior mostró los tratamientos que presentan diferencias estadísticas representadas por \*, \*\* y \*\*\* B. Tinción histoquímica del ion superóxido ( $O_2^-$ ) usando cloruro de nitro azul tetrazolio (NBT) tomadas a los 60 dpi a partir de hojas sistémicas inoculadas con Mock (tratamiento control), PapMV, PRSV, PapMV+PRSV, PRSV→PapMV, y PapMV→PRSV .

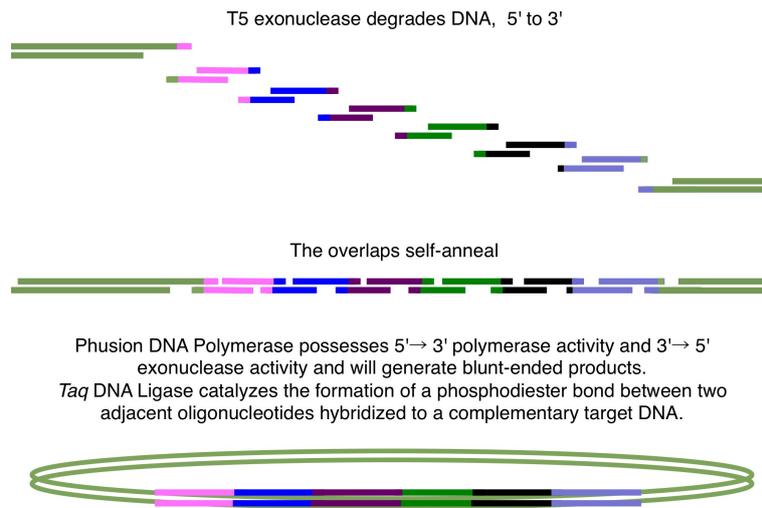
mutaciones que permitan elucidar los interactores que subyacen a un mecanismo en particular.

Por ello, se planteó generar un cDNA autoreplicativo clonado en un vector binario (icDNA) de ambos virus: PapMV y PRSV, con un tamaño de 6.656 Kb y 10.326 Kb respectivamente.

La publicación de un método que permite el ensamblado *in vitro* de varios fragmentos (3-8 fragmentos de DNA de diversos tamaños) en una reacción isotérmica (Gibson et al., 2009) con la que se ensambló el primer genoma sintético diseñado *in silico*, fue oportuno para la elección de un método que permitió generar las construcciones propuestas (ver figura 5.18).

Esta metodología requiere la generación de una biblioteca de fragmentos y la preparación de un vector para la circularización del icDNA. Para ello, se prepararon dos bibliotecas de fragmentos, una para cada virus en estudio.

Se diseñaron primers para amplificar cada fragmento y en el caso del fragmento que corresponde al extremo 5'UTR de cada virus se adicionó en el extremo 5' del primer la región correspondiente al extremo 3' del vector. Así como para amplificación de la región 3' UTR se añadió al primer en su extremo 5' la secuencia correspondiente al



**Figura 5.18:** Representación esquemática de la reacción de Gibson.

extremo 5' del vector. Todo esto se diseñó de manera automatizada con ayuda de la herramienta Gibthon. La siguiente lista de oligos utilizados para su construcción se muestra en la tabla 5.1

Nombre	Tamaño (pb)	Número en Base de Datos LiPlaVi
35S-RC-NotI-puc19Fw*	68	749
tNOS-NotI-puc19Rv*	68	750
UTR5-01-Fw	20	751
UTR5-01-Rv	65	752
RdRp-02-Fw	20	753
RdRp-02-Rv	20	754
RdRp-03-Fw	20	755
Tgb-03-Rv	60	756
YFP-04-Fw	20	757
YFP-04-Rv	20	758
CP-05-Fw	20	759
CP-05+tNOS-Rv	75	760
tNOS-universal-Rv*	20	761
tNOS-universal-Fw*	50	762

**Tabla 5.1:** Oligos para construcción de icDNA de PapMV

Para la construcción del icDNA de PRSV se generaron los fragmentos específicos para PRSV con los primers indicados en la tabla 5.2 y se adicionaron los primers de la tabla 5.1 que están señalados con un asterisco (\*).

Estos dos fragmentos corresponden a los extremos 3' y 5' del vector que fueron utilizados para circularizar la clona infecciosa sobre el *esqueleto* del plásmido comercial

pUC19. Para su posterior transformación en un vector binario, transcripción *in vitro* o inoculación directa del plásmido por daño mecánico en la planta.

Nombre	Posición en genoma (pb)	Secuencia LiPlaVi
PRSV1-Fw	1	763
PRSV1-Rv	2670	764
PRSV2-Fw	2,550	765
PRSV2-Rv	5230	766
PRSV3-Fw	5210	767
PRSV3-Rv	8020	768
PRSV4-Fw	7280	769
PRSV4-Rv	10311	770

**Tabla 5.2:** Oligos para construcción de icDNA de PRSV

Los fragmentos generados (ver tabla 5.3) quedaron listos para ser ensamblados en una reacción de Gibson (ver figura 5.19). A pesar de que se realizaron varios intentos, la transformación desafortunadamente no generó clonas resistentes. El resultado negativo posiblemente se debió a que se requiere enriquecer la cantidad de cada fragmento al menos para obtener 1 pmol por cada fragmento como lo sugiere el manual.

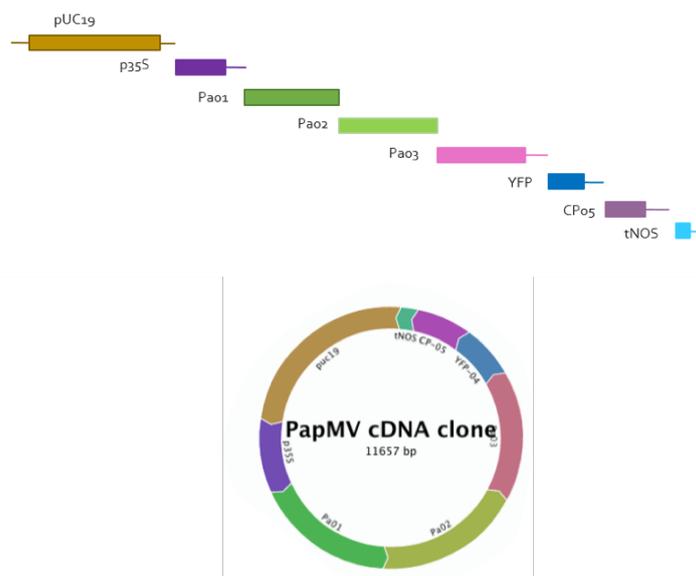
Identificación del fragmento	Tamaño (pb)	cantidad (ng)
puc19*	2692	60
promotor35S	1027	500
01-p35S-UTR5-RdRp	2006	25
02-RdRp-RdRp	2101	100
03-RdRp-Tgb	1838	75
04-YFP	717	250
05-YFP-CP-UTR	828	312
tNOS-universal*	250	300

**Tabla 5.3:** Biblioteca de fragmentos para la construcción del icDNA de PapMV

Los fragmentos de PRSV no se purificaron.

## 5.9. Generación de plantas de *A. thaliana* susceptibles a PapMV

Existen numerosos reportes en donde cambios en los factores de inicio de la traducción del hospedero generan resistencia a infecciones virales. Por otro lado algunas plantas han sido infectadas experimentalmente con PapMV y PRSV (de la familia *Caricaceae*,



**Figura 5.19:** Representación esquemática de la reacción de Gibson para generar el icDNA de PapMV.

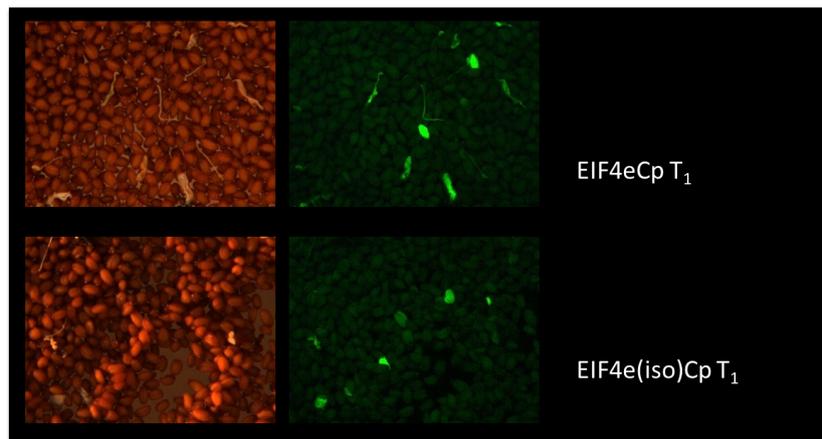
cucurbitáceas y otras). Sin embargo, *A. thaliana* no ha sido reportada como huésped alternativo.

Por ello, se pensó que si estos factores de inicio de la traducción estuviesen siendo determinantes de patogenicidad, se podría generar una planta susceptible de *A. thaliana* mediante la introducción de los factores de inicio de la traducción del hospedero susceptible, en este caso: los genes eIF4E y el eIF(iso)4E de *Carica papaya*, por medio de la generación de líneas transgénicas.

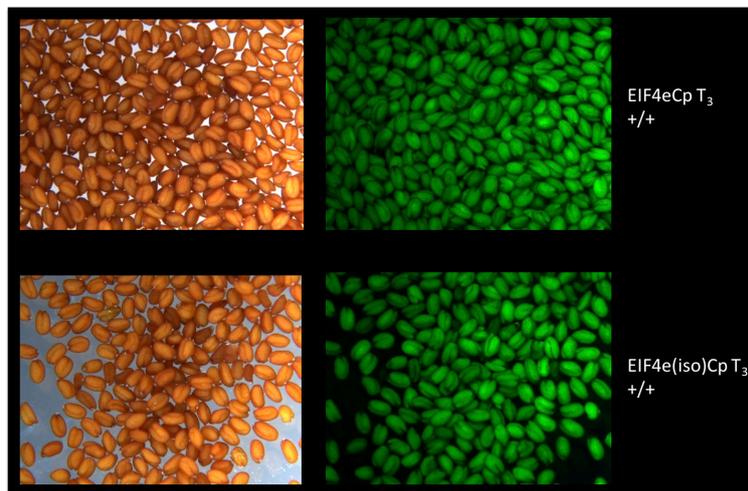
Se realizaron inoculaciones en *A. thaliana* ecotipo Col-0 para determinar si era posible usar este organismo como modelo experimental para las infecciones por PapMV-PRSV. Sin embargo, se encontró que los ecotipos silvestres eran resistentes a la infección por ambos virus.

Los factores de inicio de la traducción de la familia de los 4Es son elementos clave para la infección de virus de RNA y se utilizan como elementos de resistencia (Lellis et al., 2002; Contreras-Paredes et al., 2013; Duprat et al., 2002). Estos factores se unen a la estructura del 5' 7-metilguanilato ( $m^7G$ ) del RNAm (o la VPg) y reclutan los componentes necesarios para el complejo de iniciación de la traducción (Moury et al., 2014). Los resultados mostrados en esta sección resaltan la importancia del eIF(iso)4E, como un elemento clave para el establecimiento de la infección PapMV en *A. thaliana*.

Por ello, se generaron las líneas homocigotas T<sub>3</sub> de *A. thaliana* (ver figuras 5.20 y 5.21) sobre-expresantes (ver figura 5.21), en las cuales se confirmó por RT-PCR la sobreexpresión de los genes codificantes de papaya: eIF4E y el eIF(iso)4E. Estas plantas se usaron posteriormente para realizar los experimentos de infección con los



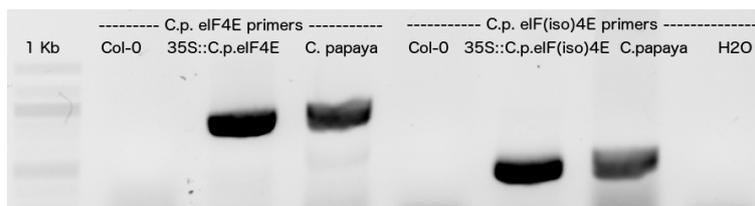
**Figura 5.20:** Semillas  $T_1$  de las plantas de *A. thaliana* agroinfiltradas, observadas por medio de un microscopio estereoscópico, a la izquierda bajo luz visible, a la derecha con un filtro para detectar GFP.



**Figura 5.21:** Semillas  $T_3$  de las plantas *A. thaliana* observadas por medio de un microscopio estereoscópico, a la izquierda bajo luz visible, a la derecha con un filtro para detectar GFP. Como puede observarse para ambas líneas ya no existe segregación, lo que confirma que las líneas son homocigotas.

virus PapMV y PRSV tanto en inoculación simple como mixta.

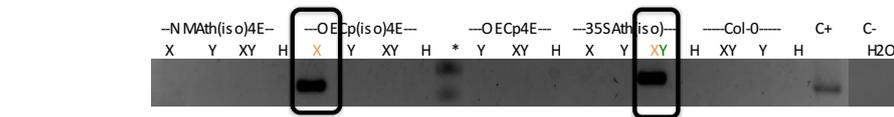
No se observaron síntomas en ninguna línea de *A. thaliana* tras la inoculación mecánica para cada una de las infecciones simples o mixtas por PapMV y/o PRSV. Sin embargo, se detectaron cistrones virales (ver figura 5.23), por RT-PCR, de PapMV en las líneas transgénicas que sobreexpresan la eIF(iso)4E tanto de *A. thaliana* como de papaya. En el caso de las plantas inoculadas con PRSV, no se detectó la presencia de la infección por este virus en ninguna de las líneas utilizadas. Para determinar si se produjo síntesis de proteínas virales se llevó a cabo la detección de las proteínas de cápside de los virus por medio de anticuerpos con la técnica de inmunodetección. Los resultados fueron acordes a los obtenidos por RT-PCR, ya que solamente se



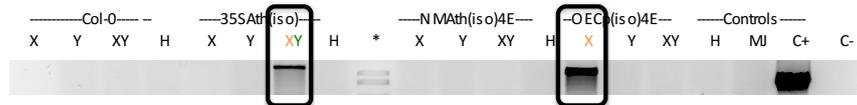
**Figura 5.22:** RT-PCR con primers para amplificar el transgen insertado *C. papaya* eIF4E o eIF(iso)4E en las líneas transgénicas de *A. thaliana*. Los cDNAs utilizados fueron obtenidos a partir de la extracción de RNA de plantas Col-0 (*A. thaliana* "silvestres"), 35S::C.p.eIF4E (*A. thaliana* sobreexpresantes del *C. papaya* eIF4E o del eIF(iso)4E), y plantas de papaya (*C. papaya*). Una reacción sin cDNA fue utilizada como control negativo (H2O).

detectó la presencia de proteína de la cápside de PapMV en las líneas transgénicas de *A. thaliana* capaces de sobreexpresar el gen endógeno eIF(iso)4E o su homólogo en papaya (*C. papaya* eIF(iso)4E).

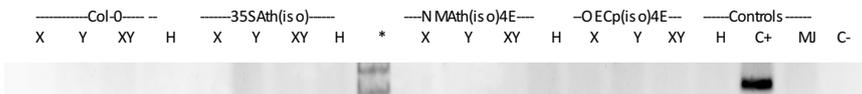
Estos resultados demostraron que la proteína transgénica es funcional y permite la infección por PapMV. De modo que las plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del eIF(iso)4E de papaya y de su propio eIF(iso)4E endógeno, son susceptibles a la infección sistémica 33 dpi con PapMV en contraste con su fondo silvestre, el ecotipo Col-0 que es resistente a PapMV. El papel de eIF(iso)4E es importante para la susceptibilidad por PapMV en *A. thaliana*. Estos resultados sugieren que la resistencia natural de *A. thaliana* a PapMV se puede romper y por lo tanto la línea transgénica puede ser utilizada como su huésped experimental. Además, las plantas de *A. thaliana* que expresan altos niveles de *C. papaya* eIF(iso)4E presentaron desarrollo de floración temprana. Sin embargo, más experimentos son necesarios para corroborar esta información.



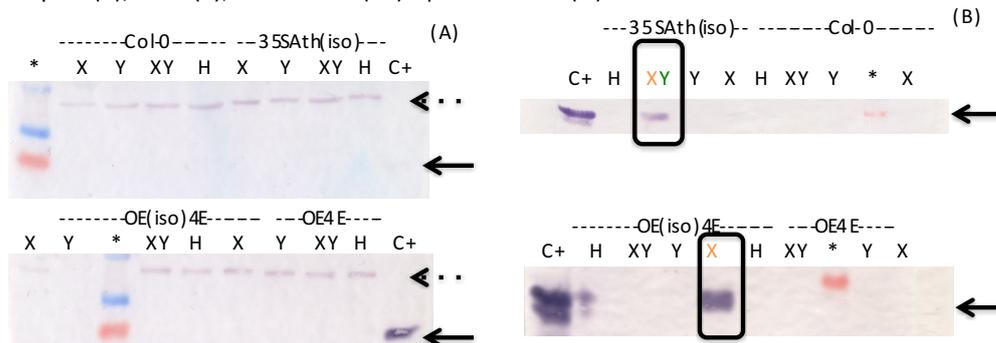
RT-PCR para detectar un fragmento de la RdRP de PapMV en las líneas de arabidopsis inoculadas con PapMV(X), PRSV(Y), ambos virus (XY) o plantas sanas (H) inoculadas con buffer.



RT-PCR para detectar un fragmento de la CP de PapMV en las líneas de arabidopsis inoculadas con PapMV(X), PRSV(Y), ambos virus (XY) o plantas sanas (H) inoculadas con buffer.



RT-PCR para detectar un fragmento de la CP de PRSV en las líneas de arabidopsis inoculadas con PapMV(X), PRSV(Y), ambos virus (XY) o plantas sanas (H) inoculadas con buffer.



WB que muestra los la detección de CP de PapMV en plantas de arabidopsis sobreexpresantes de su propio eIF(iso)4E y del eIF(iso)4E de papaya. Proteínas totales (5µg) se utilizaron para cargar el SDS-PAGE, así como anticuerpos policlonales dirigidos a la proteína de la cubierta del PRSV ~ 30 kDa (A) y PapMV ~ 26 kDa (B). Las flechas negras marcan la posición de la CP. Las flechas discontinuas muestran una proteína sin especificar (~ 46 kDa) detectada en arabidopsis.

**Figura 5.23:** RT-PCRs e inmuno detecciones (o westernblots) realizadas para identificar la presencia de los RNAs genómicos y la proteína de la cápside de PapMV y/o PRSV en las líneas transgénicas homocigotas de *A. thaliana* sobreexpresantes del eIF4E y eIF(iso)4E de papaya inoculadas con PapMV y/o PRSV. Se tomaron hojas sistémicas asintomáticas a los 33 dpi.



# 6

## Discusión

Los resultados presentados en este trabajo fueron obtenidos en la fase aguda de la enfermedad y sugieren que el orden de la inoculación de los virus PapMV y PRSV en *C. papaya* es determinante para establecer o bien una relación antagónica que resulta benéfica para su hospedero, o bien una relación sinérgica que resulta dañina para la planta. Así mismo, se encontró que la magnitud del incremento de la acumulación viral de un potexvirus (PapMV) en plantas coinoculadas con un potyvirus (PRSV), depende de la fase de la infección y del intervalo de tiempo después de la inoculación.

### 6.1. Sinergismo

Se encontraron interacciones sinérgicas entre PapMV y PRSV en plantas coinoculadas simultáneamente y en plantas inoculadas de la forma PRSV→PapMV. Estas interacciones se caracterizan por generar un aumento dramático en la gravedad de los síntomas pero sin causar cambios significativos en la acumulación de RNA de ninguno de los virus.

El sinergismo viral en plantas ha sido estudiado ampliamente, particularmente las infecciones con PVX y PVY en *Nicotiana tabacum*, en donde la coinoculación PVX-PVY produce necrosis y muerte de la planta y estos síntomas parecen estar asociados con el incremento de 3 a 10 veces en la replicación del RNA de PVX en comparación a la infección de PVX solamente. Las hojas no inoculadas que desarrollan síntomas sistémicos son las primeras hojas distales al punto de la infección (fase aguda de la enfermedad) (Rochow and Ross, 1955; Vance, 1991). Se ha sugerido que algunos elementos PVY podrían aumentar la replicación del PVX a través de una proteína potyviral que tiene actividad de supresor de silenciamiento: HC-Pro (Damirdagh and Ross, 1967), aunque algunos otros autores proponen que es la maquinaria de regulación de la respuesta del hospedero hacia el sistema inmune innato de la planta (Valli et al., 2011), o incluso que otros genes implicados en el desarrollo de la planta o en otro tipo de respuesta sistémica puedan estar involucrados (Pacheco et al., 2012). Sin embargo, en estudios realizados con *N. benthamiana* no se observó ningún cambio en los títulos virales (González-Jara et al., 2004; Sáenz et al., 2001). Por ello,

estos autores proponen que las interacciones sinérgicas están más relacionadas con la respuesta del hospedero. Por otra parte, un análisis transcripcional de *N. benthamiana* identificó diferencias en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo inducidos por la coinoculación PVX-PVY, entre los cuales se encontró el gen que codifica para la  $\alpha$ -dioxigenasa-1 durante las interacciones sinérgicas (García-Marcos et al., 2013, 2009), lo que apoyó su hipótesis.

En *Brachypodium distachyon*, la infección mixta del virus del mosaico Panicum con su virus satélite provoca síntomas más severos que en una infección con un sólo virus, aunado a la regulación positiva, de genes dependientes de SA, tales como genes PR y factores de transcripción tipo WRKY, sin un aumento en la acumulación viral (Mandadi and Scholthof, 2012).

Los hallazgos sobre sinergismo obtenidos en este trabajo, fueron similares a estos estudios previos, ya que no se observó un aumento en la acumulación del RNA del potyvirus, pero difirieron de los observados en las infecciones mixtas con potyvirus tales como el virus del moteado del tabaco, (TEV, por sus siglas en inglés *Tobacco etch virus*), el virus del moteado de la pimienta (PPMV, por sus siglas en inglés *Pepper Mild Mottle Virus*) (Vance et al., 1995), virus del mosaico del pepino (CMV, por sus siglas en inglés *Cucumber Mosaic Virus*), y el virus del mosaico del tabaco (TMV, por *Tobacco Mosaic Virus*) (Pruss et al., 1997) en *N. tabacum*, y el virus de la sharka (PPV, *Plum Pox Virus*) *N. benthamiana* y *N. clevelandii* (Yang and Ravelonandro, 2002), donde un aumento en la acumulación del RNA potexviral es evidente. En el sinergismo observado en este estudio, los niveles de PapMV CP disminuyeron durante la interacción sinérgica. Experimentos anteriores realizados en el Laboratorio de Interacciones Planta-Virus del Cinvestav, que coordina la Dra. Laura Silva (comunicación personal) con datos aún no publicados, en donde realizaron inoculaciones con PapMV y PRSV en infecciones mixtas y secuenciales en diferentes variedades de papaya, en donde no encontraron diferencias en la severidad de los síntomas producidos por las infecciones PRSV→PapMV o PapMV→PRSV aunados a los resultados encontrados en este trabajo, sugieren que es posible que esta interacción pueda implicar mecanismos más complejos con el hospedero que no pueden atribuirse solamente a los cambios en los títulos virales.

## 6.2. Antagonismo

Los análisis fenotípicos sugieren que una interacción antagónica ocurre cuando las plantas se inoculan con PapMV y 30 días después con PRSV (PapMV → PRSV). Si bien este tipo de interacciones entre planta-virus no han sido descritas ampliamente, si hay algunas observaciones publicadas en los años 1950 y 1960, en artículos que se centran en describir el fenómeno de sinergismo viral, e indirectamente sugieren que la infección secuencial (en donde inoculan primero un virus y días posteriores realizan la segunda inoculación) con virus no relacionados reduce los síntomas de la enfermedad en el hospedero (Damirdagh and Ross, 1967; Ross, 1950). Pero al parecer hasta

nuestro entendimiento, desde ese entonces no se ha explorado más esa interacción. La primera mención explícita de antagonismo en las plantas se refiere al desarrollo más lento de síntomas de la enfermedad (es decir, el número de lesiones) y la prevención de la replicación entre los virus no relacionados (Bennett, 1953; McKinney, 1941).

Los estudios de las infecciones por dos virus estrechamente relacionados reportan interacciones antagónicas y protección cruzada mediada por siRNA (Gal-On and Shibolet, 2006). PapMV y PRSV son muy poco similares, es decir comparten menos del 20 % de su secuencia, siendo la más alta similitud de secuencia entre ellas un tramo que no excede los 11 nt. Por lo tanto, es poco probable que la defensa antiviral mediada por siRNA-pueda explicar la interacción antagonista que se observó en este estudio. De hecho, no fue posible detectar ningún cambio en siRNA derivados de PapMV por análisis de secuenciación profunda. Sin embargo, no se puede descartar una diafonía entre PTGS y la defensa inmune innata SA-dependiente o SA-independiente (Kung et al., 2014).

Los datos obtenidos en este estudio demostraron que en las infecciones simples el RNA genómico de PapMV es más abundante que el de PRSV, además, en la inoculación de tipo PapMV→PRSV, que desarrolla antagonismo, la acumulación del (+) RNA de PapMV incrementó 1.54 veces con respecto a la infección simple, aunque el nivel de (-) RNA no se vio afectado. Suponiendo que todas las proteínas virales (excepto PN3-PIPO, el cual es un pequeño marco de lectura abierto que traslapa la región de P3 del potyvirus, (Chung et al., 2008)) se acumulan en forma equimolar, se podría especular que la presencia de HC-Pro pudo reprimir ligeramente el PTGS, lo que podría explicar el aumento de 1.54 veces en el RNA de PapMV. También se determinó que la acumulación del RNA de PRSV se redujo 9 veces cuando PapMV ya estaba presente. Sorprendentemente, a pesar de dicha reducción, la pequeña cantidad de RNA fue suficiente para traducir activamente proteínas virales (lo cual fue estimado a través de la medición de la acumulación de CP y la detección del RNA en las fracciones poliribosomales) con sólo un 29 % de disminución ligera en comparación a la infección simple por PRSV.

### 6.3. PRSV, el maestro de la traducción

En la interacción antagónica, el RNA de PRSV se redujo drásticamente. Sin embargo, las pocas moléculas de RNA que apenas fueron detectadas por el *northern blot* y pobremente amplificadas por RT-PCR, se localizaron en las fracciones poliribosomales altamente activas, lo que sugiere que el RNA de PRSV tiene algún elemento que permite una traducción muy eficiente. Existen reportes previos de que los potyvirus han desarrollado estrategias para explotar los recursos celulares que implican el secuestro de factores eucarióticos de inicio de la traducción (eIFs) hacia la región 5' del RNA genómico, en donde se han identificado estructuras secundarias de sitios de entrada internos de los ribosomas, IRES (por sus siglas en inglés *Internal Ribosome Entry Site*) (Duprat et al., 2002; Leonard, 2004), así como las interacciones directas

con la proteína VPg que se encuentra uridilada en el extremo 5' del genoma del virus y que se sabe que interactúa con miembros de la familia eIF4E para dar lugar a la traducción de la poliproteína potyviral (Eskelin et al., 2011; Rantalainen et al., 2011; Ivanov et al., 2014). Estas interacciones dan lugar a la inhibición de la traducción por el secuestro de los factores de inicio de la traducción del hospedero que son esenciales para completar el ciclo de vida del virus (Eskelin et al., 2011). La misma hipótesis podría explicar en parte la disminución de la traducción tanto del RNA, como de la CP de PapMV y el ligero desplazamiento del eEF1 $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina hacia la fracción no poliribosomal. Sobre la base de este comportamiento, es posible sugerir que la VPg pueda estar forzando el reclutamiento de la maquinaria de inicio de la traducción hacia el RNA genómico de PRSV inclusive a costa del RNAm celular y del RNA genómico potexviral, debido a que tanto el RNAm celular como el RNAm de PapMV tienen una modificación en su extremo 5' la cual está involucrada en la interacción con proteínas iniciadoras de la traducción. Posiblemente, en la competencia entre PRSV VPg y el cap celular y de PapMV hacia los factores de inicio de la traducción en las células infectadas, la VPg pudiera estar secuestrando de manera más eficiente estas proteínas, lo cual ha sido propuesto anteriormente por otros grupos de investigación (Eskelin et al., 2011; Hafrén et al., 2013).

### 6.4. PapMV desencadena una respuesta de defensa en la planta

Los altos títulos de PapMV correlacionan con la activación de una respuesta generalizada de defensa del hospedero, incluyendo a PR-1 un elemento elemento de la respuesta sistémica adquirida (SAR). Esta resistencia podría ser la responsable de la disminución del RNA de PRSV. La producción de ROS es necesaria para inducir PR-1 en la mutante de *A. thaliana lsd1* (del inglés *lesion-simulating disease resistance response* o respuesta simulada de resistencia a las lesiones causadas por enfermedades) como parte de un mecanismo de respuesta al estrés (Mühlenbock et al., 2008). El incremento en la producción de ROS activa la señalización del sistema inmune en otras especies de plantas (Cao et al., 1994; Zhu et al., 2003; Durrant and Dong, 2004). En este trabajo se encontró una gran acumulación de especies reactivas de oxígeno, específicamente del ion superóxido, en las plantas infectadas con PapMV, así como inducción de un marcador molecular de respuesta sistémica adquirida, al analizar la acumulación transcrito que codifica a la proteína PR-1. En contraste, las plantas infectadas con PRSV no produjeron ROS y los niveles de expresión de PR-1 fueron muy bajos.

Se ha propuesto que la respuesta antiviral mediada por proteínas NB-LRR es capaz de inhibir la traducción de los transcritos virales en un mecanismo que implica la intervención de AGO4 (Bhattacharjee et al., 2009) o AGO1 (Ghoshal and Sanfaçon, 2015, 2014). Una vez encendido este mecanismo, la respuesta antiviral es activada hacia el RNA viral indiscriminadamente. Parece que este mecanismo, no corta ni

degrada las moléculas de RNA; en cambio, inhibe la síntesis de proteínas virales. Se ha propuesto que este tipo de resistencia viral puede estar actuando a través del reclutamiento de RNA viral sin prescindir de la vía de RNAs pequeños (Bhattacharjee et al., 2009). Los resultados de este trabajo sugieren que la infección por PapMV podría desencadenar algunos elementos de resistencia de este tipo en el hospedero que pudieran interferir con la infección subsiguiente por PRSV, específicamente a nivel de traducción del RNA.

A partir de los resultados que surgen del análisis de las plantas que presentan fenotipos benéficos para el hospedero, y que involucran una interacción antagónica, se sugiere que el aumento de los títulos de PapMV no necesariamente produce sinergismo en las infecciones mixtas producidas por PapMV y PRSV en papaya. PapMV presentó niveles de acumulación de RNA más altos y una infección sistémica más rápida que PRSV desde a los 5 dpi y hasta los 60 dpi. Por su parte, la infección sistémica por PapMV no generó un daño severo a su hospedero. La interacción antagónica entre PapMV y PRSV en *C. papaya* se había descrito indirectamente en un trabajo exploratorio a cerca de los cultivos de papaya y virus asociados, realizado en diferentes estados de México (Noa-Carrazana et al., 2006). En ese trabajo, se tomaron 267 muestras de plantas con síntomas virales, de las cuales 157 plantas resultaron positivas para PRSV, mientras que 48 plantas fueron positivas para PapMV, y 22 plantas fueron positivas para ambos. De esas 22, 16 plantas presentaban sinergismo y 6 presentaban solamente síntomas típicos de infección por PapMV (Noa-Carrazana et al., 2006).

La alta prevalencia de PRSV mostrada en el trabajo previamente publicado por Juan Carlos Noa en 2006 (Noa-Carrazana et al., 2006) se puede deber a su transmisibilidad de manera no persistente por medio de áfidos que funcionan como vectores de la enfermedad o a la manipulación de plantas enfermas por los trabajadores que realizan labores en el campo. Se plantea la posibilidad de que al inocular PapMV en su hospedero antes que PRSV, este pueda interferir con la infección natural de PRSV, o incluso posiblemente hacia otros virus (una vez que los mecanismos de defensa de la planta están encendidos), posiblemente como coevolución entre la virulencia y la defensa del hospedero. Este mecanismo daría como resultando un incremento de la progenie viral de PapMV, que es benéfico para la planta, provocando a su vez que la planta permita la coexistencia del patógeno.

El análisis comparativo de la gravedad de los síntomas sugiere que PapMV podría actuar como un virus protectoro durante el antagonismo viral, o al menos previene daños severos generados por PRSV. PapMV es un parásito biotrófico dependiente de su hospedero que tiene la capacidad de activar los mecanismos de defensa de la planta previniendo la acumulación de PRSV sin perjudicar su propia acumulación viral.

Los resultados de esta investigación junto con los publicados anteriormente (Noa-Carrazana et al., 2006), apoyan la hipótesis, propuesta por otros autores (Roossinck, 2011), que las interacciones antagónicas entre los virus y sus hospederos juegan un

papel importante en el curso de la enfermedad. Bajo ciertas condiciones, es posible que los virus pueden funcionar como controles biológicos en contra de otros patógenos que producen daños perjudiciales a su hospedero (Jiu et al., 2007; Werner et al., 2014; Roossinck, 2013). Tales relaciones son benéficas tanto para el hospedero como para el virus *protectivo* debido a que activa mecanismos de resistencia de la planta, lo que protege a la planta de futuras infecciones, mientras que poblaciones de virus *protectoras* son seleccionadas. Estos resultados también permiten suponer que esta relación mutualista virus-hospedero provee una estrategia ecológica de sobrevivencia a través de una asociación a largo plazo, brindando al hospedero inmunidad contra otros patógenos, mientras que el virus *protector* adquiere un hábitat para seguir produciendo progenie (King et al., 2006; Roossinck, 2011; Syller, 2012).

Durante las interacciones PapMV-PRSV que producen sinergismo o antagonismo en papaya (Chávez-Calvillo et al., 2016), se observan también cambios histológicos que serán reportados en un manuscrito subsecuente (M.A. et al., 2016). A partir de la obtención de las relaciones de dimensión fractal y lagunaridad, se pueden obtener valores paramétricos acordes a los descritos por la escala de  $\delta$  (ver ecuación no. 4.1) que son más altos en las infecciones mezcladas, en comparación a las infecciones sencillas, que producen con valores más cercanos entre ellos (M.A. et al., 2016).

El trabajo relacionado a la obtención de un cDNA autoreplicativo completo con el genoma del PapMV bajo el control de un promotor que se expresa en plantas es una herramienta indispensable para el estudio funcional y genético de este virus, pues a partir del icDNA es posible hacer modificaciones genéticas en el virus para producir variantes, quimeras, deleciones o incorporar proteínas reporteras para llevar a cabo estudios más detallados a nivel molecular.

Por otro lado, el establecimiento del sistema de infección de *A. thaliana* expresando eIF(iso)4E de papaya abre un campo de estudio interesante sobre los mecanismos particulares de selección de los mensajeros para el reclutamiento de la maquinaria traduccional.

Los estudios recién iniciados con la secuenciación masiva de los RNAs pequeños están generando mejores evidencias sobre la respuesta de la planta, y se planea publicar estos resultados cuando estén concluidos.

# 7

## Conclusiones

La infección sistémica por PapMV confiere a las plantas de papaya la habilidad para tolerar la infección severa producida por PRSV-VrPO por medio de una interacción ecológica antagonista que resulta benéfica para el hospedero.

- La infección mixta por PRSV y PapMV puede desarrollar sinergismo en papaya cuando ambos virus son inoculados al mismo tiempo y cuando PRSV es inoculado antes que PapMV.
- Este trabajo apoya la hipótesis de que el sinergismo depende en gran medida de la respuesta del hospedero, además del conocido efecto de los supresores de RNAi virales, al menos para el caso de PRSV-PapMV-papaya.
- La infección sistémica por PapMV parece activar una respuesta de defensa generalizada que está relacionada con el sistema de defensa innato de la planta, lo cual previene la infección severa contra PRSV.
- No se encontraron diferencias entre las poblaciones de vsRNAs que estuviesen relacionadas con las interacciones antagonistas o sinérgicas.
- Se propone que PapMV podría estar estableciendo una relación de mutualismo condicional con su hospedero bajo ciertas condiciones. Esta interacción podría utilizarse a futuro por medio de una herramienta biotecnológica capaz de conferir tolerancia o resistencia a la infección por PRSV.



# 8

## Perspectivas

Este trabajo **no** propone el uso de PapMV como un virus protector para ser utilizado en campo, debido a algunos riesgos por ejemplo: efectos impredecibles de la infección al cambio de temperaturas, el desarrollo de poblaciones virales mutantes que puedan producir efectos adversos, la asociación de la infección por PapMV con otros patógenos, la pérdida de control de la propagación del virus en el campo, los efectos sinérgicos con PRSV o con otros virus, lo que finalmente provocaría un fracaso en la protección del cultivo contra PRSV.

Este trabajo propone que es posible producir una interacción antagónica en plantas infectadas con PapMV y generar una especie de *tolerancia* hacia PRSV en plantas de papaya al menos bajo condiciones de invernadero. Por ello, este trabajo representa una oportunidad de como poder utilizar a los virus para producir una relación de mutualismo condicional en su hospedero (particularmente PapMV) para, de este modo, generar nuevas tecnologías u organismos modificados que puedan producir organismos resistentes al ataque de patógenos (al menos contra PRSV).

En base a los resultados aquí generados, algunas perspectivas deben ser consideradas para futuros estudios:

- Es necesario identificar qué parte de PapMV desencadena el mecanismo de defensa en el hospedero.
- La identificación de los elementos que participan en el mecanismo de defensa de la planta.
- Analizar qué tan *generalizada* es la respuesta de defensa que parece activarse en la infección sistémica por PapMV al retar las plantas contra otros patógenos.
- Probar si la aplicación de ácido salicílico es capaz de encender la respuesta de defensa de la planta sin la infección por PapMV y si genera reducción de la severidad de la enfermedad por PRSV o contra otros patógenos.
- La generación de una herramienta biotecnológica ecológicamente sustentable basada en el uso de esta interacción antagónica.



# Bibliografía

- Abouhaidar, M. G. (1988). Nucleotide sequence of the capsid protein gene and 3' non-coding region of papaya mosaic virus RNA. *The Journal of general virology*, 69 ( Pt 1):219–226.
- Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B. N., Canto, T., and Tenllado, F. (2015). The P25 protein of potato virus X (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *Journal of virology*, 89(4):2090–103.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, C., Smith, T. H., and Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22):13079–84.
- Angly, F. E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R. a., Carlson, C., Chan, A. M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J. M., Mueller, J. E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk, S., Suttle, C. a., and Rohwer, F. (2006). The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS biology*, 4(11):e368.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6(10):973–979.
- Aziz, R. K., Breitbart, M., and Edwards, R. (2010). Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Research*, 38(13):4207–17.
- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. a., Engle, M., Diamond, M. S., Miller, V. L., and Virgin, H. W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, 447(7142):326–9.
- Barton, E. S., White, D. W., and Virgin, H. W. (2009). Herpesvirus Latency and Symbiotic Protection from Bacterial Infection. *Viral Immunology*, 22(1):3–4.
- Bateson, M. F., Lines, R. E., Revill, P., Chaleeprom, W., Ha, C. V., Gibbs, A. J., and Dale, J. L. (2002). On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ringspot virus. *The Journal of general virology*, 83:2575–2585.
- Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell*, 8:1833–1844.

- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5):1229–40.
- Beachy, R. N. (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 354(1383):659–664.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4):391–399.
- Bennett, C. W. (1953). Interactions between viruses and virus strains. *Advances in virus research*, 1:39–67.
- Bhattacharjee, S., Zamora, A., Azhar, M. T., Sacco, M. A., Lambert, L. H., and Mofkett, P. (2009). Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 58(6):940–51.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO journal*, 17(22):6739–46.
- Cao, H., Bowling, S. a., Gordon, a. S., and Dong, X. (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant cell*, 6(11):1583–1592.
- Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*, 2(4):549–557.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., and Caranta, C. (2008). Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal*, 54(1):56–68.
- Chávez-Calvillo, G., Contreras-Paredes, C. A., Mora-Macias, J., Noa-Carrazana, J. C., Serrano-Rubio, A. A., Dinkova, T. D., Carrillo-Tripp, M., and Silva-Rosales, L. (2016). Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology*, 489:179–191.
- Chmielowska, J., Veloso, J., Gutiérrez, J., Silvar, C., and Díaz, J. (2010). Cross-protection of pepper plants stressed by copper against a vascular pathogen is accompanied by the induction of a defence response. *Plant Science*, 178(2):176–182.
- Chung, B. Y.-W., Miller, W. A., Atkins, J. F., and Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15):5897–902.

- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 16(6):735–43.
- Colina, J. G., Kosky, R. G., Reyes, M., Díaz, B. O., and Herrera, I. (2004). Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en híbrido de papaya a partir de ápices de plantas in vitro. *Bioteconología Vegetal*, 4(1):37–42.
- Contreras-Paredes, C. A., Silva-Rosales, L., Daròs, J.-A., Alejandri-Ramírez, N. D., and Dinkova, T. D. (2013). The absence of eukaryotic initiation factor eIF(iso)4E affects the systemic spread of a Tobacco etch virus isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 26(4):461–70.
- Csorba, T., Pantaleo, V., and Burgyán, J. (2009). RNA silencing: an antiviral mechanism. *Advances in virus research*, 75(09):35–71.
- Culley, A. I., Lang, A. S., and Suttle, C. a. (2006). Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities. *Science*, 312(5781):1795–8.
- Damirdagh, I. and Ross, F. (1967). A Marked Synergistic Interaction of Potato Viruses X and Y in Inoculated Leaves of Tobacco. *Virology*, 307:296–307.
- Davies, E. and Abe, S. (1995). Methods for isolation and analysis of polyribosomes. In *Methods in cell biology*, volume 50, chapter 15, pages 209–22.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3):413–26.
- Dougherty, W. G. and Parks, T. D. (1995). Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Current opinion in cell biology*, 7(3):399–405.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. (2002). The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 32(6):927–34.
- Durrant, W. E. and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42(4):185–209.
- Edwards, R. A. and Rohwer, F. (2005). Viral metagenomics. *Nature*, 3(3):504–510.
- Elena, S. F. (2008). The degree of plant resilience to infection correlates with virus virulence and host-range. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(Special issue):160–169.
- Elena, S. F., Fraile, A., and García-Arenal, F. (2014). Evolution and emergence of plant viruses. *Advances in virus research*, 88:161–91.
- Erickson, J. W., Abouhaidar, M., and Bancroft, J. (1978). The specificity of Papaya Mosaic Virus assembly. *Virology*, 66:60–66.

- Eskelin, K., Hafrén, A., Rantalainen, K. I., and Mäkinen, K. (2011). Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *Journal of virology*, 85(17):9210–21.
- Eskelin, K., Suntio, T., Hyvärinen, S., Hafren, a., and Mäkinen, K. (2010). Renilla luciferase-based quantitation of Potato virus A infection initiated with Agrobacterium infiltration of *N. benthamiana* leaves. *Journal of virological methods*, 164(1-2):101–10.
- Fahlgren, N., Sullivan, C. M., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Cumbie, J. S., Montgomery, T. A., Gilbert, S. D., Dasenko, M., Backman, T. W. H., Givan, S. A., and Carrington, J. C. (2009). Computational and analytical framework for small RNA profiling by high-throughput sequencing. *RNA*, 15(5):992–1002.
- Faurobert, M., Pelpoir, E., and Chaïb, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 355(2):9–14.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1):275–296.
- Fulton, R. W. (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology*, (24):67–81.
- Gal-On, A. and Shibolet, Y. M. (2006). Cross-Protection. In *Natural Resistance Mechanism of Plant to Viruses*, chapter Chapter A1, pages 261–288. Springer, Netherlands.
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Manzano, A., Aguilar, E., and Tenllado, F. (2013). Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair potato virus X-potato virus Y and Tomato spotted wilt virus. *Journal of virology*, 87(10):5769–83.
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Martiáñez, J., González-Jara, P., Díaz-Ruíz, J. R., and Tenllado, F. (2009). Transcriptional changes and oxidative stress associated with the synergistic interaction between Potato virus X and Potato virus Y and their relationship with symptom expression. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(11):1431–44.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., and Carrington, J. C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *The Plant cell*, 22(2):481–96.
- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2014). Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology*, 456-457:188–197.

- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, 479-480:167–79.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. a., and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5):343–345.
- Gonsalves, D. and Ishii, M. (1980). Purification and Serology of Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, pages 1028–1032.
- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. a., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Ruiz, J., and Díaz-Ruiz, J. R. (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology*, 5(1):29–35.
- Goodman, R. M. and Ross, A. F. (1974). Enhancement of potato virus X synthesis in doubly infected tobacco occurs in doubly infected cells. *Virology*, 58(1):16–24.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M., and Berkhout, B. (2007). RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature biotechnology*, 25(12):1435–43.
- Hafrén, A., Eskelin, K., and Mäkinen, K. (2013). Ribosomal protein P0 promotes Potato virus A infection and functions in viral translation together with VPg and eIF(iso)4E. *Journal of virology*, 87(8):4302–12.
- Ivanov, K. I., Eskelin, K., Lõhmus, A., and Mäkinen, K. (2014). Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Potyvirus Infection. *The Journal of general virology*, 95(Pt 7):1415–1429.
- Jiu, M., Zhou, X.-P., Tong, L., Xu, J., Yang, X., Wan, F.-H., and Liu, S.-S. (2007). Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PloS one*, 2(1):e182.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117):323–329.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95(4):461–70.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B. J., and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47):18002–7.
- King, C. a., Baillie, J., and Sinclair, J. H. (2006). Human cytomegalovirus modulation of CCR5 expression on myeloid cells affects susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of general virology*, 87(Pt 8):2171–80.

- Kovalchuk, A., Keriö, S., Oghenekaro, A. O., Jaber, E., Raffaello, T., and Asiegbu, F. O. (2013). Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: challenges and perspectives in a genomic era. *Annual review of phytopathology*, 51:221–44.
- Kristensen, D. M., Mushegian, A. R., Dolja, V. V., and Koonin, E. V. (2010). New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends in microbiology*, 18(1):11–9.
- Kung, Y.-J., Lin, P.-C., Yeh, S.-D., Hong, S.-F., Chua, N.-H., Liu, L.-Y., Lin, C.-P., Huang, Y.-H., Wu, H.-W., Chen, C.-C., and Lin, S.-S. (2014). Genetic Analyses of the FRNK Motif Function of Turnip Mosaic Virus Uncover Multiple and Potentially Interactive Pathways of Cross-Protection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, pages 1–41.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. a., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current biology : CB*, 12(12):1046–51.
- Leonard, S. (2004). Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *Journal of General Virology*, 85(4):1055–1063.
- Lindbo, J. and Dougherty, W. (2005). Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1):191–204.
- Lindbo, J., Silva-Rosales, L., Proebsting, W., and Dougherty, W. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant Cell*, 5(12):1749–1759.
- M.A., G.-V., L., S.-S., D., J.-R., G., C.-C., and L., S.-R. (2016). *Biologia Plantarum*, Enviado ID de Manuscrito: 2016-01-4490.
- Malamy, J. E. and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 124:33–44.
- Maliogka, V. I., Calvo, M., Carbonell, A., García, J. A., and Valli, A. (2012). Heterologous RNA-silencing suppressors from both plant- and animal-infecting viruses support plum pox virus infection. *The Journal of general virology*, 93(Pt 7):1601–11.
- Mandadi, K. K. and Scholthof, K.-B. G. (2012). Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. *Plant physiology*, 160(3):1432–52.
- Mangrauthia, S. K., Parameswari, B., Jain, R. K., and Praveen, S. (2008). Role of genetic recombination in the molecular architecture of Papaya ringspot virus. *Biochemical genetics*, 46:835–846.
- McKinney, H. H. (1941). Virus-Antagonism Tests and Their Limitations for Establishing Relationship between Mutants, and Non-Relationship between Distinct Viruses. *American Journal of Botany*, 28(9):770–778.

- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., Senin, P., Wang, W., Ly, B. V., Lewis, K. L. T., Salzberg, S. L., Feng, L., Jones, M. R., Skelton, R. L., Murray, J. E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R. E., Michael, T. P., Wall, K., Rice, D. W., Albert, H., Wang, M.-L., Zhu, Y. J., Schatz, M., Nagarajan, N., Acob, R. a., Guan, P., Blas, A., Wai, C. M., Ackerman, C. M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J.-K., Shakirov, E. V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J. E., Gschwend, A. R., Delcher, A. L., Singh, R., Suzuki, J. Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Pérez, R., Torres, M. J., Feltus, F. A., Porter, B., Li, Y., Burroughs, a. M., Luo, M.-C., Liu, L., Christopher, D. a., Mount, S. M., Moore, P. H., Sugimura, T., Jiang, J., Schuler, M. a., Friedman, V., Mitchell-Olds, T., Shippen, D. E., DePamphilis, C. W., Palmer, J. D., Freeling, M., Paterson, A. H., Gonsalves, D., Wang, L., and Alam, M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190):991–996.
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J., and Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends in plant science*, 13(7):375–82.
- Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J. L., Palloix, a., and Caranta, C. (2014). Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirus genome-linked protein (VPg): a game of mirrors impacting resistance spectrum and durability. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 27:472–80.
- Mühlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P. M., Parker, J. E., Karpinska, B., and Karpinski, S. (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20:2339–2356.
- Noa-Carrazana, J., González-de León, D., Ruiz-Castro, B., Piñero, D., and Silva-Rosales, L. (2006). Distribution of Papaya ringspot virus and Papaya mosaic virus in Papaya Plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*, 90(8):1004–1011.
- Noa-Carrazana, J. C., González-de León, D., and Silva-Rosales, L. (2007). Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus genes*, 35:109–117.
- Noa-Carrazana, J. C. and Silva-Rosales, L. (2001). First Report of a Mexican Isolate of Papaya mosaic virus in Papaya (*Carica papaya*) and Pumpkin (*Cucurbita pepo*). *Plant Disease*, 85(5):558.
- Pacheco, R., García-Marcos, A., Barajas, D., Martiáñez, J., and Tenllado, F. (2012). PVX-potyvirus synergistic infections differentially alter microRNA accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Virus research*, 165(2):231–5.
- Porter, B. W., Aizawa, K. S., Zhu, Y. J., and Christopher, D. A. (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a carica papaya root transcriptome survey. *Plant Science*, 174(1):38 – 50.

- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., and Bowman Vance, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant cell*, 9(6):859–68.
- Pumplin, N. and Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11):745–60.
- Rantalainen, K. I., Eskelin, K., Tompa, P., and Mäkinen, K. (2011). Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg. *Journal of virology*, 85(5):2449–57.
- Rao, M. V. and Davis, K. R. (1999). Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 17:603–614.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. (1997). A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science*, 276(5318):1558–1560.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S., and Baulcombe, D. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant Cell*, 11(7):1207–1216.
- Rochow, W. F. and Ross, A. F. (1955). Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y. *Virology*, 1(1):10–27.
- Rodrigo, G., Carrera, J., Ruiz-Ferrer, V., del Toro, F. J., Llave, C., Voinnet, O., and Elena, S. F. (2012). A meta-analysis reveals the commonalities and differences in Arabidopsis thaliana response to different viral pathogens. *PloS one*, 7(7):e40526.
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2):99–108.
- Roossinck, M. J. (2013). Plant virus ecology. *PLoS pathogens*, 9(5):e1003304.
- Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y. W., Ruan, Y., and Breitbart, M. (2009). Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental microbiology*, 11(11):2806–20.
- Ross, F. (1950). Local lesion formation and virus production following simultaneous inoculation with Potato virus-X and virus-Y. *Phytopathology*, 40:24.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *The Journal of general virology*, 88:1029–1033.
- Sáenz, P., Quiot, L., Quiot, J. B., Candresse, T., and García, J. A. (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 14(3):278–87.

- Siddiqui, S. A., Sarmiento, C., Kiisma, M., Koivumäki, S., Lemmetty, A., Truve, E., and Lehto, K. (2008). Effects of viral silencing suppressors on tobacco ringspot virus infection in two *Nicotiana* species. *The Journal of general virology*, 89(Pt 6):1502–8.
- Sit, T. L., Abouhaidar, M. G., and Holy, S. (1989). Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA. *The Journal of general virology*, 70:2325–2331.
- Stahl, E., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M., and Bergelson, J. (1999). Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature*, 400(6745):667–671.
- Suttle, C. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews. Microbiology*, 5(10):801–12.
- Syller, J. (2000). Heterologous encapsidation in transmission of plant viral particles by aphid vectors. *Acta microbiologica Polonica*, 49(1):5–18.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2):204–216.
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K. M., Bell, K., Roberts, A. G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., and Oparka, K. J. (2012). The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant physiology*, 158(3):1359–70.
- Tripathi, S., Suzuki, J., and Gonsalves, D. (2007). Development of genetically engineered resistant papaya for papaya ringspot virus in a timely manner. In *Methods In Molecular Biology*, volume 354, pages 197–240.
- Tripathi, S., Suzuki, J. Y., Ferreira, S. a., and Gonsalves, D. (2008). Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology*, 9(3):269–280.
- Valli, A., Oliveros, J. C., Molnar, A., Baulcombe, D., and García, J. A. (2011). The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of Cucumber vein yellowing virus P1b and perturbs endogenous small RNA populations. *RNA journal*, 17(6):1148–1158.
- Vance, V. B. (1991). Replication of Potato Virus X RNA Is Altered in Coinfections with Potato Virus Y. *Virology*, 182:486–494.
- Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., Ming Shi, X., Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., and Shi, X. M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, 206(1):583–590.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.-M., and Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *The Journal of general virology*, 88:1643–1655.

- Wen, Y., Lim, G. X.-Y., and Wong, S.-M. (2013). Profiling of genes related to cross protection and competition for NbTOM1 by HLSV and TMV. *PloS one*, 8(9):e73725.
- Werner, G. D., Strassmann, J. E., Ivens, B. F., Engelmoer, D. J. P., Verbruggen, E., Queller, D. C., Noe, R., Johnson, N. C., Hammerstein, P., and Kiers, E. T. (2014). Evolution of microbial markets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4):1237–1244.
- Wood, D. E. and Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3):R46.
- Yang, S. and Ravelonandro, M. (2002). Molecular studies of the synergistic interactions between plum pox virus HC-Pro protein and potato virus X. *Archives of virology*, 147(12):2301–12.
- Yeh, S. D., Jan, F. J., Chiang, C. H., Doong, T. J., Chen, M. C., Chung, P. H., and Bau, H. J. (1992). Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *The Journal of general virology*, 73 ( Pt 10:2531–2541.
- Zamore, P. D. (2001). RNA interference: Listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology*, 8(9):746–750.
- Zhang, J.-Y., Qiao, Y.-S., Lv, D., Gao, Z.-H., Qu, S.-C., and Zhang, Z. (2012). Malus hupehensis NPR1 induces pathogenesis-related protein gene expression in transgenic tobacco. *Plant biology*, 14 Suppl 1:46–56.
- Zhang, Y., Yu, N., Huang, Q., Yin, G., Guo, A., Wang, X., Xiong, Z., and Liu, Z. (2014). Complete genome of Hainan papaya ringspot virus using small RNA deep sequencing. *Virus genes*, 48(3):502–8.
- Zhu, Y. J., Qiu, X., Moore, P. H., Borth, W., Hu, J., Ferreira, S., and Albert, H. H. (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(5):237–248.
- Ziebell, H. and Carr, J. P. (2009). Effects of dicer-like endoribonucleases 2 and 4 on infection of Arabidopsis thaliana by cucumber mosaic virus and a mutant virus lacking the 2b counter-defence protein gene. *The Journal of general virology*, 90:2288–2292.