



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD IRAPUATO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA
LABORATORIO DE VIROLOGÍA**

**Resistencia a PepGMV (*Virus del mosaico dorado del chile*) en *Capsicum annuum*
mediada por RNAs pequeños”**

Tesis que presenta:

ROCÍO HERNÁNDEZ CÁRDENAS

**Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS**

Director de Tesis:

DR. RAFAEL F. RIVERA BUSTAMANTE

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Virología del Departamento de Ingeniería Genética en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Rafael F. Rivera Bustamante, investigador titular de esta institución y bajo la asesoría de las Dras. June Simpson Williamson y Laura Silva Rosales y el Dr. Ariel Álvarez Morales.

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca No. 371196 otorgada para llevar a cabo mi estancia durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Rafael F. Rivera Bustamante por aceptarme en su laboratorio para formar parte de su equipo de trabajo en el cual aprendí muchas cosas y por sus asesorías.

A las Dras. June Simpson Williamson y Laura Silva Rosales y el Dr. Ariel Álvarez Morales por aportar sugerencias al trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme siempre que lo necesité.

Al personal de la institución por la asistencia brindada.

A Natzul por ayudarme siempre y compartir conmigo durante todo este tiempo.

A mi familia por todo su apoyo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCIÓN.....	14
I.1 Geminivirus.....	14
I.1.1 Organización del genoma de los geminivirus	16
I.1.2 Replicación y transcripción de los geminivirus	17
I.2 Silenciamiento inducido por RNA	18
I.3 Iniciación, amplificación y mantenimiento de la señal de silenciamiento	20
I.4 Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)	21
I.5 RNA pequeños de origen viral	21
I.6 RNA pequeños y mecanismos de respuesta a virus.....	23
II. ANTECEDENTES	25
II.1 Métodos convencionales de control contra patógenos de plantas	25
II.2 Un ejemplo de resistencia natural contra virus: Remisión.....	25
II.3 Estrategia de resistencia inducida contra virus: Silenciamiento génico mediado por RNA.....	28
II.4 Promotor: <i>rbcS2</i> de tomate	30
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. OBJETIVOS.....	35
V.1 Objetivo general	35
V.2 Objetivos específicos	35
VI. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	36
VI.1 Diseño y construcción de vectores de expresión	36
VI.1.1 Amplificación de fragmentos de interés	36
VI.1.2 Clonación en pJET1.2/blunt.....	37

VI.1.3 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH10B.....	38
VI.1.4 Extracción de DNA plasmídico	38
VI.1.5 Secuenciación.....	38
VI.1.6 Construcción en pFGC5941 con los fragmentos TrAP-REn, Rep, CP-IR y AC4-IR.....	39
VI.1.7 Construcciones 35S::GFP y prbcS2::GFP	39
VI.2 Expresión Transitoria	40
VI.2.1 Transformación de células electrocompetentes de la cepa GV2260 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
VI.2.2 Agroinfiltración en plantas de chile	41
VI.2.3 Síntesis de cDNA	42
VI.2.4 Amplificación de fragmentos de interés	43
VI.2.5 Evaluación de la eficacia de las construcciones: Infección con PepGMV.....	43
VI.3 Severidad de síntomas.....	44
VI.4 Incidencia	45
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
VII. 1 Análisis de los RNA pequeños (sRNA).....	46
VII.1.1 Tamaño de los RNA pequeños	47
VII.1.2 Distribución de las poblaciones de sRNA en el genoma de PepGMV	51
VII.2 Selección del promotor	55
VII.3 Selección de los fragmentos de PepGMV.....	56
VII.4 Obtención de las construcciones 35S::Rep, 35S::TrAP-REn, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR	58
VII.4.1 Amplificación de fragmentos de interés	58
VII.4.2 Generación de construcciones 35S con los fragmentos de interés.....	59
VII.4.3 Construcciones de los fragmentos seleccionados con el promotor prbcS2 de tomate...	60
VII.4.4 Generación de construcciones con GFP bajo los promotores 35S y prbcS2	61
VII.5 Ensayos de expresión transitoria: GFP	62
VII.5.1 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones prbcS2::GFP y 35S::GFP	62
VII. 6 Evaluación de la eficiencia de las construcciones	63
VII.6.1 Expresión de los fragmentos de interés	63
VII.6.2 Expresión estable de las construcciones 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR en plantas de tabaco	65
VII. 7 Evaluación de la eficiencia de las construcciones sobre el proceso infectivo: Severidad de síntomas	67
VII. 8 Funcionalidad de las construcciones	74

VII. 9 Incidencia	77
VIII. CONCLUSIONES	78
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del genoma del Virus del mosaico dorado del Chile PepGMV. Se presentan los componentes A (DNA-A) y B (DNA-B) del virus. En color naranja se señala la región intergénica (IR) en ambos componentes. Las flechas indican los marcos de lectura abiertos: Rep, proteína de replicación; REn, proteína potenciadora de la replicación; CP, proteína de la cápside; TrAP, proteína activadora de la transcripción; AC4, posible gen sin caracterizar; MP, proteína de movimiento célula-célula y NSP, proteína de movimiento nuclear. También se muestra la estructura asa/horquilla necesaria para la replicación.	15
Figura 2. RNAs pequeños virales. A) Mecanismo de biogénesis de RNA pequeños virales. (Imagen modificada de Vanitharani R. et al., 2005). B) Representación gráfica de la transcripción bidireccional de transcritos virales para la generación de vsRNA. RdRP, RNA polimerasa dependiente de RNA. Las flechas indican el sentido de la transcripción del virión y el recuadro indica la región de traslape.	22
Figura 3. Representación gráfica de la progresión de síntomas en PepGMV. La letra I representa la hoja inoculada, 1 y 2 corresponden a las hojas sintomáticas, 3 y 4 son pre-remisión, 5 y 6 muestran las hojas en remisión (Carrillo-Tripp J. et al., 2006).....	26
Figura 4. Representación gráfica del fragmento del genoma viral utilizado para generar las construcciones de PepGMV y ToChLPV. (Modificada de Medina-Hernández D., 2014)	30
Figura 5. Acumulación de mRNA de rbcS en hojas maduras e inmaduras de tomate. (Tomado de Wanner L. A. et al., 1991).....	32
Figura 6. Transcritos de rbcS en condiciones de luz/oscuridad en plantas de tomate. En el círculo rojo se señala el gen prbcS2, el cual muestra presencia de transcritos de manera continua en condiciones de luz/oscuridad (Tomado de Manzara T. et al., 1988).....	32
Figura 7. Análisis de la actividad del promotor rbcS2 en diferentes estadios de desarrollo del fruto de tomate. A) Tamaño de promotores evaluados, en verde se muestra el tamaño del promotor seleccionado. B) Grafico que presenta la actividad de los promotores fusionados a GUS (Modificada de Baum K. et al., 1999).	33
Figura 8. Fenotipos mostrados por plantas sintomáticas infectadas con PepGMV. La escala utilizada es la siguiente: 0) Planta sana, 1) Mosaicos amarillos apenas visibles, 2) Red de mosaicos visibles y leve rugosidad detectada en las primeras hojas mostrando síntomas, 3) Todas las hojas sintomáticas muestran mosaicos amarillos, enchinamiento y rugosidad y 4) Hojas sintomáticas son más pequeñas, plantas sintomáticas muestran distorsión general con retraso severo del crecimiento de la planta con mosaicos amarillos, enchinamiento y rugosidad.....	44
Figura 9. Número total de sRNA para los componentes A y B de PepGMV detectados en plantas de Chile infectadas. En azul se muestra el total de svRNA de cadena positiva obtenidos en el análisis de los 6, 10 y 20 dpi. En gris se muestra los RNA pequeños de cadena negativa en las mismas condiciones.	46
Figura 10. Comparación del total de sRNA en las etapas evaluadas. En el eje de las “x” se representa el tamaño de los sRNA y en el eje de las “y” el número de lecturas correspondientes a cada clase. El número de sRNA obtenidos en las muestras de 6 dpi es muy pequeño y no alcanza a destacar por las escalas. Ver figura 11.....	47
Figura 11. RNA pequeños relacionados con PepGMV obtenidos de plantas infectadas con Chile a los 6, 10 y 20 dpi.	48
Figura 12. Porcentaje de RNA pequeños en PepGMV 10 dpi. El grafico representa la proporción de RNA pequeño de 20-25 nt, en los componentes A y B del genoma de PepGMV, cadena positiva y negativa.	49
Figura 13. Distribución de sRNA de 21-22 y 24 nt (cadena positiva) en PepGMV-B. En el eje de las “x” se encuentra representado el componente PepGMV-B y en el eje de las “y” el número de lecturas distribuidas. .	50
Figura 14. Gráficos que muestran el número de sRNA detectados en el proceso infectivo de PepGMV-A en plantas de Chile. A) 6 dpi, B) 10 dpi y C) 20 dpi. En el eje de las “x” está representado el genoma de PepGMV, el eje de las “y” muestra el número de sRNA alineados en los sectores del genoma viral.....	52

Figura 15. Gráficos que muestran el número de RNA pequeños generados en el proceso infectivo de PepGMV-B en plantas de Chile. A) 6 dpi, B) 10 dpi y C) 20 dpi. En el eje de las “x” está representado el genoma de PepGMV, el eje de las “y” muestra el número de RNA pequeños alineados en el genoma viral. ...	54
Figura 16. Localización de los fragmentos del genoma de PepGMV seleccionados para la generación de construcciones. En el gráfico se muestra la ubicación de los fragmentos seleccionados en el genoma de PepGMV-A. 1) TrAP-REn, 2) Rep, 3) AC4-IR y 4) CP-IR.....	57
Figura 17. Amplificación de fragmentos de interés. A la izquierda, fotografía de gel de agarosa 2% de los productos de PCR de TrAP-REn carril 1, AC4-IR carril 2 y CP-IR carril 3. A la derecha, fotografía gel de agarosa 2% de la amplificación de Rep.	59
Figura 18. Representación esquemática de las construcciones generadas.....	60
Figura 19.- Mapa de la construcción pReps. En verde, promotor de la ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa (prbcS2) de tomate, en rojo el terminador del gen que responde a ABA (tRab17).	61
Figura 20. Construcciones 35S::GFP y prbcS2::GFP.	62
Figura 21. Análisis por PCR de cepas de A. tumefaciens positivas para la transformación con 35S::GFP y prbcS2::GFP. A) Los carriles 1-7 corresponden a la construcción con 35S y los carriles 8-10 corresponden a las que contienen prbcS2. B) RT-PCR de 35S::GFP y prbcS2::GFP. Fotografía de gel de agarosa al 1,5% de PCR de la expresión de los fragmentos de interés. Los carriles 1, 3 y 5, corresponden a las muestras tomadas de plantas de Chile 2, 5 y 8 días después de realizar la agroinfiltración con prbcS2::GFP, respectivamente. El carril 7 corresponde a la expresión de la construcción 35S::GFP después de 4 días de la infección. Como control endógeno, se utilizó el gen actina (ACT2).	63
Figura 22. RT-PCR de fragmentos de interés. Cada una de las construcciones evaluadas con controles positivos y negativos, mock corresponde a la planta infiltrada con pFGC5941 vacío, CMI es la planta tratada solo con medio de infiltración, PS es la planta sana. Como control endógeno ACT2.....	64
Figura 23. Prueba de amplificación de RNA total extraído. Los carriles del 1 al 8 muestran réplicas de cada fragmento de interés, mock corresponde a la planta infiltrada con pFGC5941 vacío, CMI es la planta tratada solo con medio de infiltración, PS es la planta sana.	65
Figura 24.- Mapa de la construcción 35S::AC4. En color morado se encuentran marcados los sitios correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para realizar la detección del fragmento AC4-IR.	66
Figura 25. Análisis de PCR de las líneas transgénicas 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR. La parte superior corresponde a las líneas 35S::AC4-IR y la parte inferior a las líneas 35S::CP-IR. Los carriles muestran el número de la línea evaluada. C+ corresponde al control positivo, CT- corresponde a tejido de planta no transformada y C- es el control negativo con agua.....	67
Figura 26.- Diagrama de proceso en ensayos transitorios para la evaluación de las construcciones sobre el proceso infectivo.	68
Figura 27.- Severidad de síntomas de plantas de Chile. En el eje de las “x” están los días después de la infección con PepGMV y en el eje de las “y” se representa el porcentaje de severidad de síntomas de las construcciones evaluadas y sus controles.	69
Figura 28.- Plantas de Chile después de 10 días de la infección con PepGMV. En la parte superior de la imagen se muestran los controles del experimento y en la parte inferior se encuentran imágenes de plantas de las construcciones evaluadas.	70
Figura 29.- Fenotipo de plantas de Chile después de 18 días de la infección con PepGMV. La fotografía muestra 10 plantas por tratamiento.....	71
Figura 30.- Severidad de síntomas en controles de experimento. P.S. corresponde a la planta sana; CMI, plantas tratadas con medio de infiltración, pFGC5941 corresponde a las plantas agroinfiltradas con el vector vacío y PepGMV es el control de la infección (plantas infectadas con el virus PepGMV).....	72
Figura 31.- Porcentaje de plantas en remisión por tratamiento. En el eje de las “x” se indica el día de conteo de plantas con hojas en remisión por tratamiento, y en el eje de la “y” muestra el porcentaje de plantas en remisión de un total de 10 plantas evaluadas por tratamiento.....	74
Figura 32.- Verificación de la presencia del virus en plantas 35S::Rep por PCR. Los carriles 1-10 corresponden a las 10 plantas analizadas 35S::Rep. C+ es el control positivo, plantas infectadas con PepGMV. C- corresponde a plantas sanas.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de rbcS en diferentes tejidos de tomate. (Tomado de Manzara T. et al., 1988).....	31
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados. El total de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran descritos.	37
Tabla 3. - Tratamiento aplicado en agroinfiltración. En la columna izquierda está el tratamiento aplicado para la agroinfiltración y en la columna derecha el número de plantas de chile para cada tratamiento.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico, abscisic acid
ACMV	<i>Virus africano del mosaico de la yuca, African cassava mosaic virus</i>
ACT2	Gen actina 2, actin 2 gene
AGO	Argonauta, argonaute
amiRNA	micro RNA artificial, artificial micro RNA
ASGV	<i>Virus de la madera asurcada del manzano, Apple stem grooving virus</i>
ATP	Adenosín trifosfato, adenosine triphosphate
bZIP	Cremallera básica de leucinas, Basic Leucine Zipper
CaMV	<i>Virus del mosaico de la coliflor, Cauliflower mosaic virus</i>
CBP	Proteína de unión al “cap”, cap binding protein
cDNA	DNA complementario, complementary DNA
chsA	Chalcona sintasa A, chalcone synthase A
CMI	Plantas tratadas solo con medio de infiltración
CP	Proteína de la cápside, Coat Protein
DCL	Dicer-like
DIR	Directo
dpa	Día o días post agroinfiltración.
dpi	Día o días post infección
DRB	Proteína de unión a dsRNA, double-stranded RNA binding protein
dsDNA	DNA de doble cadena, double-stranded DNA
dsRNA	RNA de doble cadena, double-stranded RNA
GBF	Factores de unión a cajas G, G-box binding factor
GFP	Proteína verde fluorescente, green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidasa. β -glucuronidase
HEN1	ENHANCER 1
IR	Región intergénica, intergenic region
kb	Kilobases
MP	Proteína de movimiento, Movement Protein
mRNA	RNA mensajero, Messenger RNA
miRNA	micro RNA
NCBI	Centro nacional para información biotecnológica, National Center for Biothechnology Information
NSP	Proteína de transporte nuclear, Nuclear Shuttle Protein
OCS	Octopina sintasa, octopine synthase
OGM	Organismo genéticamente modificado
ORF	Open Reading Frame, marco de lectura abierto
PABP	Proteína de unión poliA, Poly(A)-binding Protein

pb	Pares de bases
PDS	Fitoeno desaturasa, phytoene desaturase
PepGMV	<i>Virus del mosaico dorado del chile, Pepper golden mosaic virus</i>
PHYVV	<i>Virus huasteco de la vena amarilla del chile, Pepper huasteco yellow vein virus</i>
PS	Planta sana
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional, posttranscriptional gene silencing
PVX	<i>Virus X de la papa, Potato virus X</i>
REV	Reverso
Rep	Proteína asociada a replicación, Replication-associated Protein
RDR o RdRP	RNA polimerasas dependientes de RNA, RNA-dependent RNA polymerase.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, reverse transcription polymerase chain reaction
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA, RNA-induced silencing complex
REn	Proteína potenciadora de la replicación, Replication Enhancer
rbcS	Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
siRNA	Small interfering RNA, RNA pequeño interferente
sRNA	RNA pequeño, small RNA
svRNA	RNA pequeños virales
TGS	Silenciamiento genético transcripcional, transcriptional gene silencing
RAB	Gen de respuesta a ácido abscísico, responsive to abscisic acid
TrAP	Proteína activadora de la transcripción, Transcriptional Activator Protein
TRSV	<i>Virus de la mancha anillada del tabaco, Tobacco ringspot virus</i>
ToChLPV	<i>Virus del tomate chino La Paz, Tomato chino La Paz virus</i>
TYLCSV	<i>Virus del rizado amarillo del tomate Sardinia, Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
vsiRNA	RNA interferente pequeño viral, viral small interfering RNA

RESUMEN

El *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) es un virus que pertenece a la familia Geminiviridae; su genoma está constituido por dos componentes de DNA de cadena sencilla y circular denominados A y B; ambos son esenciales para el proceso infectivo. El PepGMV es un patógeno de plantas transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* y está ampliamente distribuido en Mesoamérica, causando pérdidas en cultivos de solanáceas como jitomate, chile y tomatillo. La enfermedad inducida por este virus presenta varios síntomas característicos: mosaicos amarillos, enchinamiento y reducción del área foliar, deformación de las hojas y reducción del tamaño del fruto y de la planta en general, lo cual generalmente merma la producción de dichos cultivos. Es por ello, que ha surgido la necesidad de encontrar estrategias que ayuden a combatir esta problemática. En plantas, se ha estudiado el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) como una forma de defensa antiviral natural, la cual actúa de manera específica a nivel RNA. Se han encontrado dsRNA virales en el citoplasma de células infectadas que pueden ser generados por intermediarios de replicación viral, RNA aberrantes o RNA de cadenas sencillas estructuradas que luego son usados como molde por la RNA polimerasa dependiente de RNA para sintetizar la segunda cadena viral. Se han reportado resultados positivos en cuanto a la resistencia mediada por dsRNA ante virus en varias plantas. Las ventajas que ofrece este tipo de estrategias de resistencia a virus incluyen: mayor especificidad hacia las secuencias de RNA que se quieren silenciar y no generan proteínas que puedan alterar el metabolismo de la planta, entre otras.

En el 2012, se realizó la secuenciación masiva de RNAs pequeños (sRNA) de plantas de chile de la variedad Sonora Anaheim infectadas con PepGMV en diferentes etapas del ciclo infectivo. El análisis de estas bibliotecas reveló variaciones en cuanto a la distribución, el tamaño y la cantidad de sRNA generados y asociados a los componentes A y B del genoma viral. Se seleccionaron 4 regiones del genoma viral con los valores más altos de la cuantificación de sRNA. La expresión transitoria de estos fragmentos reveló que una de las construcciones generadas confiere un nivel de resistencia importante a plantas de chile infectadas con PepGMV, por lo que se convierte en un buen candidato para generar líneas transgénicas para tratar de disminuir la severidad de síntomas o provocar un retraso en la

aparición de los mismos como una estrategia para combatir la problemática antes mencionada.

ABSTRACT

Pepper golden mosaic virus (PepGMV) is a member of the *Geminiviridae* family. Its genome is organized into two single-stranded, circular DNA molecules named components A and B. Both molecules are essential for the infective process. PepGMV is a plant pathogen transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* and it is widely distributed in Mesoamerica, causing losses in solanaceous crop such as tomato, pepper and tomatillo. The disease induced by this virus presents the following symptoms yellow mosaic, wrinkling of the leaf and stunting of both the plant and fruit, which generally decrease crop production. Due to its economical importance, a need to find strategies to combat this problem has emerged. In plants, posttranscriptional gene silencing (PTGS) has been considered as a natural antiviral defense acting at the RNA level. It has been found that viral dsRNA in the cytoplasm of infected cells can be generated as viral replication intermediates (RNA viruses), or as aberrant RNA molecules (single-stranded RNA structures) that are used as a template by the RNA-dependent RNA polymerase to synthesize the second viral strand. RNA-mediated resistance strategies against plant viruses have reported promising results. The advantages of this type of strategies include the high specificity for the target and the fact that no protein is required to be expressed. The last point is quite important from the regulatory point of view of a biotechnological process. In 2012, a sequencing effort was performed to analyze the small RNA (sRNA) populations present in pepper plants (Var. Sonora Anaheim) infected with PepGMV at different stages of the infection. The analysis of these libraries revealed variations in the distribution, size and amount of PepGMV-related sRNA. Four regions with the highest values for the sRNA quantification were selected in PepGMV genome. Transient expression of these fragments revealed that one of the constructions induces an important level of resistance in pepper plants infected with PepGMV. These regions are therefore, good candidates to generate transgenic lines to evaluate its effectiveness against PepGMV infection.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Geminivirus

Los geminivirus son una familia de virus que infectan plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas causando una gran cantidad de pérdidas en cultivos de todo el mundo. La familia Geminiviridae está conformada por siete géneros: *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Turncurtovirus*, *Mastrevirus*, *Curtoovirus*, *Begomovirus* y *Topocuvirus* (Varsani A. *et al.*, 2014). Los geminivirus tienen genomas de DNA de cadena sencilla circular que pueden ser monopartitas o bipartitas, los cuales se encuentran empaquetados en dos partículas icosaédricas geminadas. Esta familia de virus poseen regiones codificantes en ambas hebras, en la positiva y en la complementaria o negativa y el tamaño de su genoma va de 2.5 a 3.0 kilobases (Kb) (Raja P. *et al.* 2014).

Los geminivirus están ampliamente distribuidos en el mundo e infectan varias solanáceas causando pérdidas en cultivos como tomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*) y tomatillo (*Physalis ixocarpa*). Los síntomas característicos de plantas infectadas con este virus son: mosaicos amarillos, enchinamiento, deformación y reducción del área foliar, reducción del tamaño de la planta y el fruto.

Las principales áreas productoras de hortalizas del país presentan infecciones por geminivirus, y entre estos, uno de los más importantes es el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV). Este virus es un patógeno de plantas, transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) que está ampliamente distribuido en Mesoamérica. El PepGMV es un virus que pertenece a la familia Geminiviridae y al género *Begomovirus*. El nombre de esta familia de virus deriva de su cápside en forma de estructura icosaédrica geminada. Su genoma está constituido por dos componentes de DNA de cadena sencilla circular denominados A y B, los cuales son esenciales para el proceso infectivo.

En el componente A, se encuentran los marcos de lectura abiertos para las proteínas que participan en la replicación (Rep y REN), en la transcripción (TrAP) y en la encapsidación del virus (CP). En el componente B, se encuentra la información necesaria para el

movimiento del virus y la distribución sistémica a través del tejido vascular de la planta infectada. Los marcos de lectura abiertos localizados en el componente B son: la proteína NSP, que es transportador nuclear y la proteína MP que transporta el DNA viral de célula a célula.

Los geminivirus bipartitas poseen una región conservada entre ambos componentes. El tamaño varía entre 180 a 200 pb. Esta región conservada le proporciona “identidad” para que los dos componentes de un virus sean replicados adecuada y específicamente. La región conservada se localiza en la llamada región intergénica (IR) que contiene las regiones promotoras de los genes virales para la transcripción bidireccional y una región que forma una estructura de asa y horquilla necesaria para el proceso de replicación (Raja P. *et al.*, 2010; Góngora-Castillo E. *et al.*, 2012).

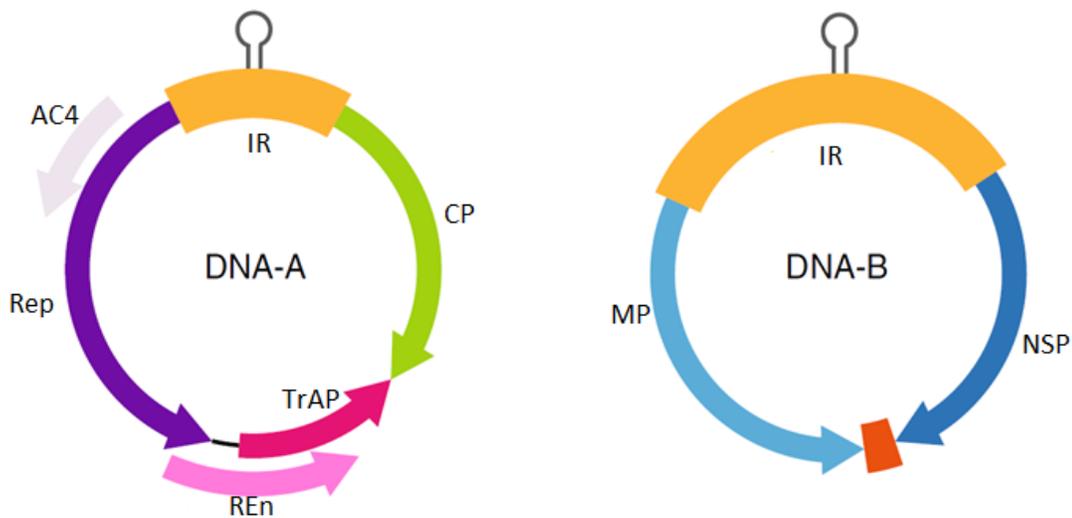


Figura 1. Representación gráfica del genoma del Virus del mosaico dorado del Chile PepGMV.

Se presentan los componentes A (DNA-A) y B (DNA-B) del virus. En color naranja se señala la región intergénica (IR) en ambos componentes. Las flechas indican los marcos de lectura abiertos: Rep, proteína de replicación; REn, proteína potenciadora de la replicación; CP, proteína de la cápside; TrAP, proteína activadora de la transcripción; AC4, posible gen sin caracterizar; MP, proteína de movimiento célula-célula y NSP, proteína de movimiento nuclear. También se muestra la estructura asa/horquilla necesaria para la replicación.

I.1.1 Organización del genoma de los geminivirus

La proteína Rep (Replication-associated protein) se localiza en el núcleo de las células infectadas y es la encargada de iniciar y terminar la amplificación por círculo rodante. Esta proteína está altamente conservada entre los *Begomovirus* y contiene un sitio de reconocimiento de iniciación de la replicación donde se forma la horquilla durante la replicación por círculo rodante. Rep es una proteína de unión específica a DNA, que actúa como una nucleasa y ligasa para iniciar y terminar la replicación (Raja P. *et al.*, 2014).

La proteína REn (Replication Enhancer) presenta una actividad potenciadora de la replicación que permite que la replicación viral se lleve de manera adecuada. REn aumenta la afinidad de Rep por el inicio de replicación mediante la acumulación de DNA viral ya que posiblemente reconoce el origen de replicación. Asimismo, se ha reportado que plantas infectadas con un virus que no puede expresar adecuadamente este gen no muestran síntomas o éstos son más atenuados (Hanley-Bowdoin L. *et al.*, 1999).

La proteína TrAP (Transcriptional Activator Protein) es la proteína activadora de la transcripción necesaria para la expresión de genes tardíos, como la proteína de la cápside y la proteína de transporte nuclear. También ha sido reportada como supresora del silenciamiento de la maquinaria de la planta hospedera. No está claro si esta última actividad es importante para llevar a cabo su función de activadora de la transcripción (Trinks D. *et al.*, 2005).

La proteína de la cápside CP (Coat Protein) corresponde a la cubierta del virión; confiere la especificidad del insecto vector y en algunos hospederos es necesaria para la infección sistémica. La proteína CP está involucrada en el transporte de DNA viral hacia dentro y fuera del núcleo en geminivirus monopartitas. Se ha reportado que puede participar en la replicación por la unión del DNA viral de cadena sencilla durante la replicación por círculo rodante. Algunos reportes indican que la CP de algunos *Begomovirus* pueden reemplazar a la proteína de movimiento nuclear o NSP (Fondong V. N., 2013).

La proteína de movimiento MP (Movement Protein) es la responsable del transporte célula-célula, se localiza en membrana plasmática y pared celular de las células infectadas.

La proteína de transporte nuclear NSP (Nuclear Shuttle Protein) se acumula en el núcleo de las células infectadas y se encarga de transportar el DNA viral a través de los poros nucleares.

Además de estas proteínas, se ha reportado que algunos virus poseen un quinto marco de lectura abierta en el componente A que se ha denominado AC4. Este ORF se encuentra dentro del gen Rep. Ensayos realizados en *N. benthamiana* con diferentes virus que infectan yuca (*Manihot esculentum*) indican actividad supresora de AC4 con acumulación de mRNA e inhibición de RNA pequeños interferentes (siRNA) (Vanitharani R. *et al.*, 2004).

Aunado a esto, se ha reportado que la proteína AC4 codificada por geminivirus, disminuye la acumulación de micro RNA (miRNA) de la planta hospedera y al mismo tiempo, aumenta la cantidad de anomalías presentes en la misma, esto en *Arabidopsis thaliana*, mediante la unión a miRNA maduros, lo que bloquea la unión al mRNA blanco (Chellappan P. *et al.*, 2005). Sin embargo, para PepGMV no se ha reportado la existencia de una proteína tipo AC4, aun cuando su genoma posee un posible marco de lectura abierto.

I.1.2 Replicación y transcripción de los geminivirus

Los geminivirus se replican en el núcleo de la célula hospedera a partir de un mecanismo conocido como círculo rodante. El DNA viral de cadena sencilla circular es liberado del virión en el núcleo, entonces la DNA polimerasa de la célula hospedera sintetiza la cadena complementaria para formar el DNA de doble cadena circular covalentemente cerrada. Esta molécula sirve como molde para la transcripción bidireccional.

Una vez sintetizado el mRNA viral, éste es transportado al citoplasma para ser traducido. Después, la proteína Rep se mueve al núcleo para iniciar la replicación viral mediante círculo rodante a partir de dsDNA. Rep corta la cadena del virión en el origen de replicación y recluta la DNA polimerasa del hospedero para elongar el 3´terminal de la cadena del virión sobre la cadena complementaria. Después de una o varias vueltas de replicación, Rep corta y liga la cadena del virión recientemente sintetizada. El nuevo DNA de cadena sencilla circular puede entrar nuevamente a la replicación o puede ser empaquetado (Pooggin M. M.

et al., 2013). Los virus bipartitas encapsulan cada uno de sus componentes de manera separada y necesitan de ambos para su infectividad (Laufs J. *et al.*, 1995).

Los genes que son expresados primero son aquellos que están involucrados en la replicación y la transactivación de genes virales. En PHYVV, los genes que se expresan primero son Rep, TrAP y REn del componente A y subsecuentemente el gen MP del componente B. Los genes CP y NSP son clasificados como tardíos y son expresados después debido a que necesitan la presencia de TrAP para su expresión (Shimada-Beltrán H. *et al.*, 2007).

La transcripción ocurre de manera bidireccional desde una región intergénica, donde también se encuentra el origen de replicación. Los RNA virales son poliadenilados y son transcritos por la RNA polimerasa II de la planta hospedera. En la transcripción, cada uno de los componentes funciona como templado para generar RNA en el sentido de virión (Hanley-Bowdoin L. *et al.*, 2010).

I.2 Silenciamiento inducido por RNA

El silenciamiento inducido por RNA es un mecanismo de defensa natural que protege a las plantas contra los virus y la acción de los transposones, además de regular la expresión de genes (Baulcombe D., 2004). Se ha visto que esta señal de silenciamiento se puede amplificar y mover por medio de señales en rutas de silenciamiento.

El silenciamiento por RNA esta mediado por RNA pequeños (sRNAs) de 18 a 25 nucleótidos por dos vías principales: RNA pequeños interferentes o siRNA y los miRNA (Hamilton A. *et al.*, 1999). Estos RNAs son procesados a partir de un precursor de doble cadena (dsRNA), el cual es hidrolizado por la proteína tipo Dicer (Dicer-like, DCL) y proteínas de unión a dsRNA (DRB). Los RNA pequeños dúplex son metilados en el nucleótido terminal 2'-O, por la proteína ENHANCER 1 (HEN1). La metilación de un extremo de estos RNAs permite estabilizarlo y protegerlo de la degradación (Yu B. *et al.*, 2005). Después, la hebra guía del sRNA es reconocida por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual está en el núcleo de la célula e incluye la proteína

Argonauta (AGO). Una vez unido el RNA a este complejo enzimático, recluta la hebra complementaria de RNA blanco (Xie Z. *et al.*, 2004).

La ruta de silenciamiento por miRNA involucra nucleótidos ~22 que son generados a partir de un precursor más grande en el núcleo por la enzima Dicer y dependen de la proteína argonauta para hidrolizar el blanco (Bartel D. P., 2004).

Además de estas dos vías que actúan a nivel citoplasmático, se ha reportado una tercera vía asociada a la metilación de DNA y la supresión de la transcripción. Se ha visto que RISCs nucleares llevan a cabo a la metilación de los residuos de histidinas y citosinas desencadenando silenciamiento genético transcripcional y la formación de heterocromatina.

La proteína AGO es un componente del complejo de unión a miRNA y siRNA (RISC). En *A. thaliana*, las mutantes de ago1 no pueden llevar a cabo el silenciamiento por miRNA y sRNA en citoplasma, en cambio las mutantes en ago4 no realizan silenciamiento a nivel transcripcional (Zilberman D. *et al.*, 2003).

En *A. thaliana* se han reportado cuatro miembros de la familia de proteínas tipo Dicer, las cuales tienen diferentes funciones. DCL1 es requerida para la biogénesis de miRNA, DCL3 produce siRNA y es requerida en silenciamiento transcripcional (Xie Z. *et al.*, 2004; Papp I. *et al.*, 2003). En adición, DCL3 produce RNAs más grandes (24 nt); en cambio DCL1 produce siRNA más cortos de 21 nt (Tang G., *et al.*, 2002). En la producción de siRNA virales interviene DCL2, sin embargo, la pérdida de función de DCL2 se refleja solo en la disminución de la producción de estos RNA pequeños, por lo que se cree que hay otras proteínas que intervienen en su síntesis (Xie, Z. *et al.*, 2004).

Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs o RdRPs) son necesarias para las rutas de silenciamiento en citoplasma y a nivel cromatina. En *A. thaliana*, la RDR1 y la RDR6 intervienen en el silenciamiento de transgenes y virus. Las mutantes RDR2 pierden la capacidad de producir siRNA endógenos (Xie Z. *et al.*, 2004).

I.3 Iniciación, amplificación y mantenimiento de la señal de silenciamiento

El mecanismo de silenciamiento génico actúa de manera secuencia específica. Los mRNA normales, no son hidrolizados debido a que tienen en sus extremos 5' cap una proteína CBP (proteína de unión al cap) y en su cola de poly-A extremo 3', una PABP (proteína de unión poliA); estas proteínas impiden el acceso de la RDR para la síntesis de la doble cadena de RNA. Cuando los mensajeros carecen de una o de ambas proteínas de unión mencionadas anteriormente, la RDR puede unirse y empezar a sintetizar en sentido 3'-5' la cadena complementaria, que después es hidrolizada en pequeños fragmentos por Dicer.

Para la amplificación de la señal, los siRNA pequeños sintetizados se unen al mRNA y actúan como cebadores para el reconocimiento de la RDR. Después de la síntesis de dsRNA que es hidrolizado por Dicer en pequeños siRNA, estos dirigen la hidrolisis de mRNA blanco.

El proceso de amplificación de la señal de silenciamiento es clave para la defensa antiviral, debido a que esta amplificación debe darse al mismo ritmo de la replicación y la acumulación del RNA viral (Schiebel W. *et al.*, 1993; Tang G. *et al.*, 2002).

La movilidad de la señal es otro factor de suma importancia para el sistema de defensa antiviral en las plantas. El movimiento de la señal de silenciamiento se puede dar antes de que el virus infecte la planta hospedera para silenciar el RNA viral en cuanto este llegue a la célula o moverse al mismo tiempo (Voinnet O. *et al.*, 2000). Se ha visto que los efectos del silenciamiento se observan en tejidos alejados del punto inicial de la señal y que se puede diseminar de manera sistémica en la planta (Voinnet O. & Baulcombe O., 1997).

Las vías de diseminación del silenciamiento no son bien conocidas en plantas. Aunque se sabe que se da célula-célula a través de plasmodesmas y de manera sistémica en floema a través de las células acompañantes (Fagard M. *et al.*, 2000). Sin embargo no se sabe cuál es el precursor de sRNA que se mueve.

I.4 Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)

En plantas, se ha estudiado el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) como una forma de defensa antiviral natural, la cual actúa de manera específica a nivel RNA. Se ha visto que en el PTGS intervienen miRNAs. Los miRNA son RNAs de cadena sencilla, de 20-24 nt de longitud generados del procesamiento de precursores de miRNA más largos por DCL1 en *Arabidopsis thaliana*. En un desenrollamiento de la molécula de dsRNA que es dependiente de ATP, una cadena del miRNA es incorporada en el complejo RISC (RNA-induced silencing complex). Ahí, el miRNA guía al complejo para degradar moléculas de RNA que son idénticas en secuencia al miRNA. Lo anterior sucede por medio del apareamiento de bases RNA:RNA, que son hidrolizadas por la enzima Argonauta, lo que resulta en una represión de la traducción por la degradación del transcrito. Estos miRNA son conocidos en plantas por regular importantes procesos de desarrollo y algunos mecanismos de respuesta a estrés (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

I.5 RNA pequeños de origen viral

Para contrarrestar las defensas de la planta basadas en silenciamiento génico, los virus han “reclutado ayuda” al codificar al menos un supresor de silenciamiento. Se han encontrado sRNA virales en el citoplasma de células infectadas que pueden ser generados por intermediarios de replicación viral, RNA aberrantes o RNA de cadenas sencillas. Estos RNAs son usados como molde por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) para sintetizar la segunda cadena viral y funcionan como reguladores de la expresión génica, mediante unión a secuencias específicas. Otra alternativa que se propone es la generación de dsRNA por medio de intermediarios de replicación viral en estructura secundaria. Estudios sugieren que DCL2 y DCL4 están involucrados en la biogénesis de vsiRNA begomovirales.

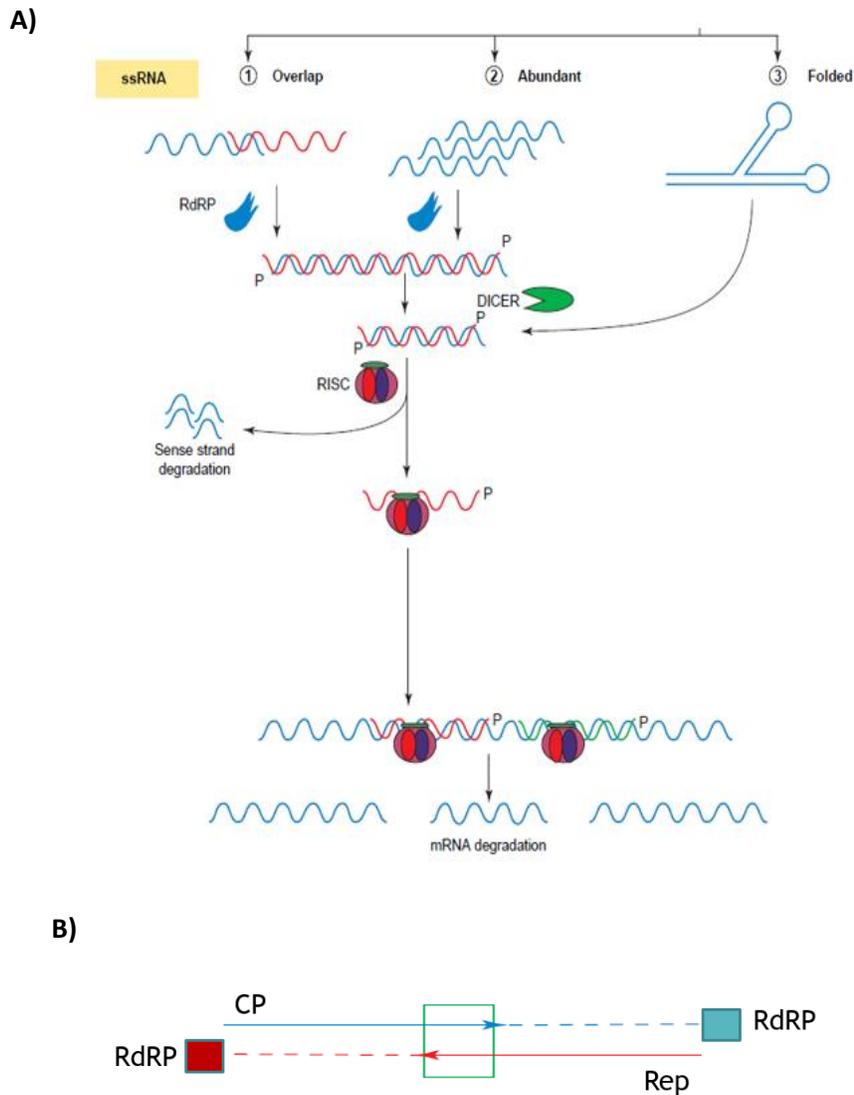


Figura 2. RNAs pequeños virales. A) Mecanismo de biogénesis de RNA pequeños virales. (Imagen modificada de Vanitharani R. *et al.*, 2005). B) Representación gráfica de la transcripción bidireccional de transcritos virales para la generación de vsiRNA. RdRP, RNA polimerasa dependiente de RNA. Las flechas indican el sentido de la transcripción del virión y el recuadro indica la región de traslape.

I.6 RNA pequeños y mecanismos de respuesta a virus

Los RNA pequeños son importantes reguladores de la expresión genética que controla varios procesos biológicos. Se ha visto en diferentes estudios que éstos están involucrados en algunos tipos de resistencia contra diferentes *Begomovirus*. En plantas infectadas con virus, el silenciamiento se induce para controlar la replicación viral y la infección sistémica. Este silenciamiento comienza con la generación de dsRNA que pueden ser un intermediario de la replicación viral o el traslape de cadenas sencillas de RNA complementarias, o que se convierten en dsRNA por enzimas RDR del hospedero. También se ha visto que algunos RNA interferentes pequeños virales (vsiRNA) tienen como blancos genes del hospedero que pueden estar involucrados en la respuesta de defensa de la planta y que plantas infectadas muestran varios cambios en la acumulación de miRNA endógenos.

Los sRNA también pueden afectar la metilación mediada por la proteína HEN1 provocando que genes silenciados y transposones se activen afectando la maquinaria de silenciamiento de la planta. Además se ha reportado que al aumentar el siRNA de origen viral, disminuye el DNA y el mRNA virales (Rodríguez-Negrete E. *et al.*, 2009).

Utilizar miRNA para generar silenciamiento presenta grandes ventajas en comparación con otras estrategias, algunas de las cuales se exponen a continuación. Los miRNA no requieren ser fragmentos grandes de DNA viral para inducir el silenciamiento, entonces se evade la posibilidad de que otros genes se silencien por grandes fragmentos de RNA insertados. Además, se puede realizar silenciamiento tejido y célula específico y silenciar a la vez varios genes con secuencias cortas conservadas.

Una vez realizados los ensayos de silenciamiento según la estrategia seleccionada, existen variantes en los resultados obtenidos según las condiciones evaluadas en experimentos relacionados con silenciamiento génico. Se ha visto que las rutas de silenciamiento basados en RNA funcionan mejor a temperaturas alrededor de los 24°C. Un análisis masivo de miRNA de brotes *in-vitro* de pera (*Pyrus pyrifolia*) infectados con *Virus de la madera asurcada del manzano* (ASGV), reflejaron que eran más los obtenidos a temperatura de 24°C, a diferencia de 37°C. Se encontraron 77 miRNA expresados de manera diferencial en las temperaturas evaluadas (Liu J. *et al.*, 2005).

Asimismo, otro factor que puede introducir variantes en los resultados obtenidos es el mantenimiento de la señal de silenciamiento. Se ha reportado que el mantenimiento del silenciamiento en plantas depende del estadio de desarrollo en el que se encuentre y a cambios por respuesta a estrés. Además, el mantenimiento de la señal de silenciamiento necesita de la integración del transgen o parte de él, en un locus competente, al fin de que esta región del genoma no interfiera con su expresión, debido a la presencia de secuencias regulatorias, metilación e impedimentos estéricos, entre otros (Fagard M. *et al.*, 2000).

II. ANTECEDENTES

II.1 Métodos convencionales de control contra patógenos de plantas

Los virus de plantas son parte de una gran problemática que afecta diversos cultivos en todo el mundo y que causa pérdidas importantes en los mismos. Se han usado diferentes estrategias para tratar de contrarrestar esta problemática. Entre las acciones que se han tomado se encuentran: rotación de cultivos, detección temprana y destrucción de plantas infectadas, protección cruzada y control químico de sus vectores (Hull R., 2002).

Sin embargo, aunque las estrategias anteriormente mencionadas han logrado disminuir la problemática no han conseguido erradicarla por completo. Por lo que ha surgido la necesidad de encontrar nuevas estrategias que ayuden a controlar mejor los virus en los cultivos. Es por esto que se ha abordado experimentar con otras estrategias de control como lo son: selección de plantas naturalmente resistentes y empleo de herramientas moleculares para la obtención de resistencia mediada principalmente por RNA.

II.2 Un ejemplo de resistencia natural contra virus: Remisión

Se le conoce como remisión a la recuperación o reducción de síntomas en plantas infectadas con virus. Después de emerger la segunda o tercera hoja sintomática, emergen hojas con marcada reducción de síntomas o una total desaparición de los mismos.

La remisión ha sido explicada de la siguiente manera. La presencia del RNA viral durante la infección llega a concentraciones importantes que probablemente exceden ciertos umbrales. Al exceder dichos umbrales, la presencia viral provoca que las defensas de las plantas se desencadenen en toda la planta, incluyendo el tejido sintomático. Esta respuesta general de defensa, que incluye el silenciamiento génico, produce una disminución en los niveles de material genético de origen viral, lo cual se ve reflejado un poco más tarde con la aparición de nuevas hojas asintomáticas, o comúnmente llamado tejido en remisión (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006).

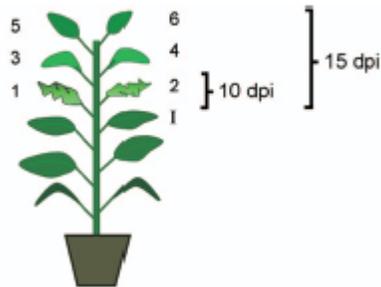


Figura 3. Representación gráfica de la progresión de síntomas en PepGMV. La letra I representa la hoja inoculada, 1 y 2 corresponden a las hojas sintomáticas, 3 y 4 son pre-remisión, 5 y 6 muestran las hojas en remisión (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006).

La resistencia natural de plantas contra virus ha sido reportada desde hace muchos años. En 1928, Wingard reporta remisión en plantas de tabaco infectadas con *Virus de la mancha anillada del tabaco* (TRSV), en este experimento él observa que solo las hojas inicialmente infectadas presentan los síntomas característicos del virus y que las hojas que emergen subsecuentemente no los presentan. Además, observó que estas plantas presentan una mayor resistencia a infecciones secundarias por el mismo virus (Baulcombe D., 2004).

En el modelo de estudio del laboratorio (PepGMV-chile) también se ha visto remisión de síntomas. Experimentos en plantas de Chile infectadas con PepGMV muestran que la cantidad de DNA y RNA viral de tejido en remisión es considerablemente más bajo que el tejido sintomático. Adicionalmente se mostró que las plantas en remisión, al ser re-inoculadas con el mismo virus, no se re-infectaban ni presentaban síntomas en hojas nuevas. También se observó que el DNA viral extraído de cada una de los tejidos evaluados (síntomas y remisión) fue capaz de producir síntomas cuando fueron bombardeados en plantas de Chile (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006).

Un reporte posterior sugirió que PepGMV es un blanco de los dos tipos de silenciamiento génico, postranscripcional y transcripcional, debido a que se encontraron siRNA de 21-22 nt relacionados con las regiones codificantes, así como también de 24 nt, en este caso relacionados con la región intergénica del virus, donde se encuentran los promotores virales.

Esto último se correlacionó con una alta tasa de metilación de la región intergénica viral en DNA extraído de tejido en remisión. En comparación, un análisis similar llevado a cabo con DNA viral obtenido en tejido sintomático mostró niveles de metilación más bajos. En ambos casos, la región codificante analizada (gen CP) mostró niveles menores al compararse con la región intergénica correspondiente (Rodríguez-Negrete E. *et al.*, 2008).

Además se ha visto que la concentración de DNA viral de tejido sintomático disminuye conforme se desarrolla la infección. Esto se puede deber a la migración de partículas virales hacia otros tejidos y la degradación de DNA viral (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006).

Siguiendo con la misma línea, existen reportes de resistencia natural en Colinabo (*Brassica oleracea gongylodes*) cuando es infectada con *Virus del mosaico de la coliflor*, la cual fue atribuida a silenciamiento genético postranscripcional (Covey S. N. *et al.*, 1997).

Por otra parte, se ha reportado que plantas de yuca infectadas con *Virus del mosaico africano de la yuca* (ACMV) presentan una cantidad más alta de RNA pequeños en tejidos con síntomas en comparación con los obtenidos de tejido en remisión que plantas infectadas con el virus, las cuales no tienen remisión (Chellappan P. *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta los ensayos mencionados relacionados a silenciamiento génico, la correlación entre la cantidad de DNA-RNA-sRNA viral y resistencia no está determinada de manera general para las interacciones virus-planta. Se ha reportado que plantas que presentan altos niveles de expresión de RNA transgénico presentan bajos niveles de resistencia. En cambio, plantas que acumulan bajos niveles de RNA transgénico, exhiben altos niveles de resistencia (Goldbach R. *et al.*, 2003).

Finalmente se puede decir que el fenómeno de remisión en el cual se ve involucrado un aumento de los sRNA virales respalda la idea de que PTGS es una estrategia para controlar la infección por geminivirus.

II.3 Estrategia de resistencia inducida contra virus: Silenciamiento génico mediado por RNA

Además de la resistencia contra virus que existe de manera natural, también se ha logrado inducir ese tipo de resistencia usando ingeniería genética. Se han reportado resultados positivos en cuanto al desarrollo de estrategias para proveer resistencia a virus mediada por RNA en varias plantas. Este tipo de estrategia presenta varias ventajas, entre las cuales están:

- Mayor especificidad hacia las secuencias de RNA (o virus) que se quiere silenciar.
- Ausencia de proteínas “externas” en las plantas transgénicas, lo que podría facilitar la aprobación por los procesos regulatorios de organismos genéticamente modificados (OGMs).

Se han insertado secuencias virales en plantas y animales para generar algún tipo de resistencia contra estos patógenos, tratando de disminuir la severidad de los síntomas, así como de la incidencia y el tiempo al cual estos síntomas se empiezan a presentar. Se ha reportado que la resistencia generada se da por silenciamiento génico a nivel postrancricional. Este proceso es mediado a nivel de RNA, en el cual tanto el RNA viral como el mRNA del transgen son degradados de manera específica de secuencia (Dalmay T. *et al.*, 2000).

En 1998, Ruiz T. y colaboradores observaron que al infectar plantas con una construcción que contenía el gen fitoeno desaturasa (PDS) en un vector basado en el *Virus X de la papa* (PVX), los niveles del vector PVX-PDS no se vieron afectados a diferencia de los niveles del mRNA del gen PDS, el cual fue degradado en el tejido verde de dichas plantas. Por ello se consideró que el mecanismo por el cual se lleva a cabo el silenciamiento es a nivel postrancricional. En otro ensayo evaluaron construcciones con secuencias de intrones y exones y observaron que la construcción que contenía un intrón no generaba silenciamiento mientras que la que contenía exones si lo hizo. Con esos experimentos, ellos sugirieron que el silenciamiento ocurría a nivel citoplásmico. Finalmente, cuantificaron los niveles de mRNA en plantas con tejido infectado con el vector PVX-PDS y plantas mock. El análisis

mostró una disminución de 85 a 95% del mensajero en plantas con la construcción con PVX-PDS en comparación con el control (Ruiz T. *et al.*, 1998).

Pooggin y colaboradores estudiaron el silenciamiento génico mediante el bombardeo de una construcción tipo horquilla dsRNA dirigida a la región promotora del gen Rep. Ellos observaron la disminución de los niveles de DNA viral en plantas que mostraban remisión en comparación con aquellas que no tenían la construcción. En este reporte, primero se infectó las semillas de frijol negro con el virus y después se bombardeó con la construcción dsRNA obteniendo resultados prometedores (Pooggin M. *et al.*, 2003).

En 2007 se realizó la evaluación de plantas de tomate transformadas con diferentes tipos de construcciones para generar silenciamiento. Estos contenían fragmentos de Rep y AC4 del *Virus del enchinamiento de la hoja de tomate*. Aquí observaron que las plantas presentaron remisión de síntomas y que las construcciones más eficientes fueron Rep-antisentido, repetidos invertidos-Rep y la construcción tipo horquilla (Ramesh S. V. *et al.*, 2007).

Por otra parte, se realizó la expresión antisentido del mRNA completo de Rep, TrAP o REn del *Virus Africano del mosaico de la yuca*. Las plantas de tomate fueron infectadas con el virus por biobalística observando posteriormente una remisión de los síntomas. Además, fueron detectados sRNA de 21-24 nt derivados del virus, por lo que la resistencia se relacionó un proceso tipo PTGS y TGS (Vanderschuren H. *et al.*, 2007).

Más recientemente, en 2012, se realizaron construcciones tipo intrón-horquilla de PepGMV y de ToChLPV (*Virus del tomate chino La Paz*) para evaluar su capacidad y eficiencia en inducir resistencia a la infección por PepGMV. Las plantas fueron primero agroinfiltradas con las construcciones que contenían los fragmentos de PepGMV y ToChLPV. Se observó que con la presencia de los fragmentos los síntomas disminuyeron en un 80% mientras que la acumulación viral se reducía en un 99.56%. Paralelamente se realizó el análisis del transcriptoma y se encontraron genes sobrerregulados que participan en rutas de silenciamiento génico, por lo que la resistencia observada se asoció a silenciamiento génico inducido por RNA (Medina-Hernández D., 2012).

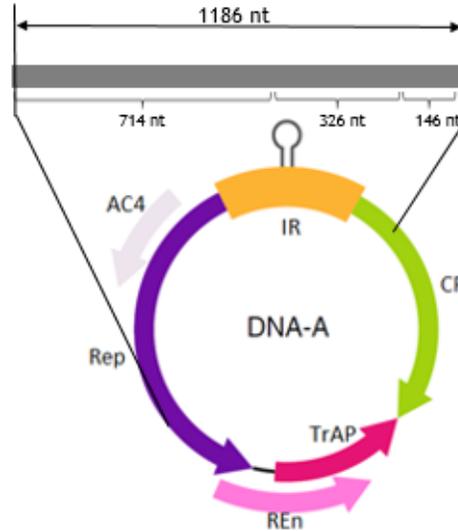


Figura 4. Representación gráfica del fragmento del genoma viral utilizado para generar las construcciones de PepGMV y ToChLPV. (Modificada de Medina-Hernández D., 2014)

II.4 Promotor: *rbcS2* de tomate

Para la generación de construcciones que tengan como objetivo inducir resistencia a virus mediante silenciamiento génico es necesario la selección de buen promotor que cumpla con las características necesarias, y deseadas, de expresión tejido-específica. Esto es doblemente importante si lo que se busca es generar plantas transgénicas como producto o desarrollo biotecnológico que pueda ser liberado bajo los lineamientos de bioseguridad y protección intelectual.

Es por esto, que en el presente trabajo se busca utilizar un promotor con expresión específica en hoja, debido a que esta parte de la planta es donde el virus infecta primero. De los posibles promotores candidatos que cumplen con las características deseadas se seleccionó un promotor de tomate, el cual se describe a continuación.

En tomate, existen cinco genes que codifican para la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, el *rbcS1*, *rbcS2*, *rbcS3A*, *rbcS3B* y *rbcS3C* (Meier I. *et al.*, 1995). Estos genes son expresados en hojas principalmente. Los genes que pertenecen a esta familia

presentan expresión específica en hojas, tallo y poca expresión en fruto, además, de nula expresión en pétalos, pericarpio, semillas, sépalos y raíz.

En 1988, Manzara y colaboradores realizaron el análisis de la expresión de genes pertenecientes a esta familia y observaron que en tomate principalmente se expresan en hoja, seguido por plántulas etioladas y tallo, y que su expresión en fruto disminuye considerablemente conforme el fruto madura (**Tabla 1**).

Tabla 1. Expresión de *rbcS* en diferentes tejidos de tomate. (Tomado de Manzara T. *et al.*, 1988).

Tissue	Tomato	Petunia	Pea
Leaves	100	100	100
Stem	3.2	2.3	2.7
Root	ND	0.2	0.7
Petals	–	3.0	8.5
Fruit			
immature green	6.5	–	–
mature green	1.6	–	–
red	ND	–	–
Etiolated seedlings	4.6	–	–
Sepals	–	11.2	–
Stigmas/anthers	–	0.25	–
Pericarp	–	–	50
Seeds	–	–	8.0

ND = not detected

En 1991 se evaluó la acumulación de mRNA de *rbcS* en hojas maduras e inmaduras de tomate y observaron que en el gen *rbcS2* se mantiene la expresión sin importar el estadio de la hoja (**Figura 5**).

Por otra parte se ha reportado que el promotor que lleva la expresión del gen *rbcS2* presenta una expresión independiente de la luz, a diferencia del resto de los genes que pertenecen a esta familia (**Figura 6**).

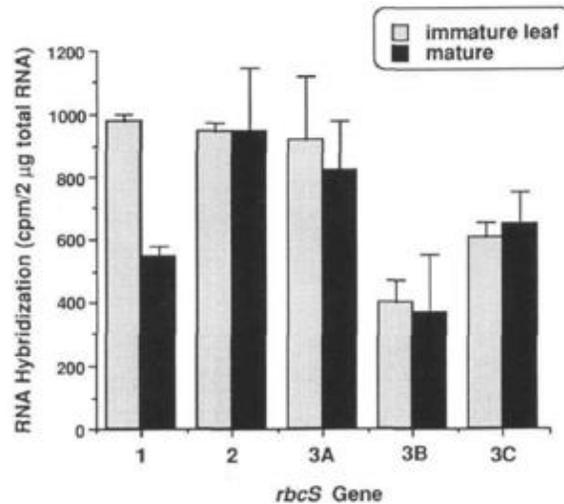


Figura 5. Acumulación de mRNA de *rbcS* en hojas maduras e inmaduras de tomate. (Tomado de Wanner L. A. *et al.*, 1991).

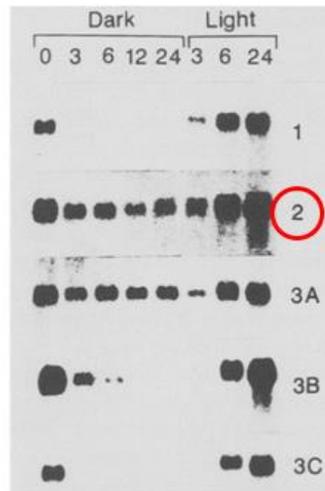


Figura 6. Transcritos de *rbcS* en condiciones de luz/oscuridad en plantas de tomate. En el círculo rojo se señala el gen *prbcS2*, el cual muestra presencia de transcritos de manera continua en condiciones de luz/oscuridad (Tomado de Manzara T. *et al.*, 1988).

En 1999 se realizó el análisis de la actividad del promotor *rbcS2* en diferentes estadios de desarrollo del fruto de tomate. Se observó que el *rbcS2* presenta baja expresión durante el

desarrollo del fruto y antes del comienzo de la maduración del mismo. Estos niveles de expresión pueden relacionarse con la pérdida de actividad fotosintética del fruto durante el inicio de su maduración.

El análisis de elementos *cis* de la región promotora del gen *rbcS2* mostró que un elemento G-box a -156 es responsable del 80% de actividad en fruto de tomate joven (**Figura 7**). A diferencia de la actividad en hoja, la cual se debe en conjunto a dos cajas: G-box y I-box. Esta activación se debe a la unión de proteínas GBF (factores de unión a G-box), las cuales son proteínas bZIP que reconocen el motivo CACGTG de la G-box (Baum K. *et al.*, 1999).

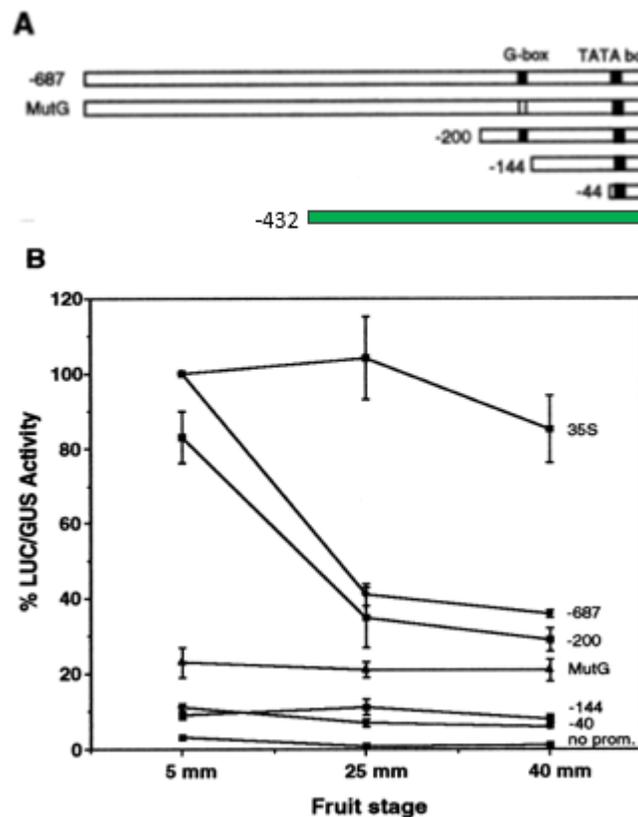


Figura 7. Análisis de la actividad del promotor *rbcS2* en diferentes estadios de desarrollo del fruto de tomate. A) Tamaño de promotores evaluados, en verde se muestra el tamaño del promotor seleccionado. B) Grafico que presenta la actividad de los promotores fusionados a GUS (Modificada de Baum K. *et al.*, 1999).

III. JUSTIFICACIÓN

Los geminivirus están ampliamente distribuidos en Mesoamérica y causan grandes pérdidas en cultivos de solanáceas como los son tomate, chile y tomatillo. Entre estos, uno de los más importantes es el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV). Los síntomas que presenta la enfermedad llegan a ser tan severos que pueden mermar la producción de dichos cultivos. Es por ello que ha surgido la necesidad de encontrar estrategias para resolver o al menos tratar de combatir esta problemática con el fin de disminuir las pérdidas en cultivos causadas por este virus. A la fecha no existen variedades de chile resistentes a geminivirus.

En plantas, se ha descrito el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) como una de las principales estrategias de defensa contra un gran número de patógenos, entre los que se encuentran los virus.

Recientemente en el laboratorio se realizó una secuenciación masiva de RNA pequeños en plantas de chile de la variedad Sonora Anaheim infectadas con PepGMV. El tejido se colectó a tres diferentes tiempos. El análisis de estos RNA pequeños revela una variación en la cantidad y en la distribución de la regiones codificantes en el genoma del virus, presentando picos muy marcados en algunas regiones. Esto podría sugerir que estos RNA pequeños tienen una función específica durante el ciclo infectivo del virus. Debido a que ya se ha visto que las plantas utilizan rutas de silenciamiento inducidos por RNA como estrategias de defensa, creemos que la expresión de dichos RNAs en plantas de chile podría inducir algún tipo de resistencia contra PepGMV.

IV. HIPÓTESIS

La expresión de RNAs pequeños de origen viral en plantas de Chile inducirá resistencia contra la infección del *Virus del mosaico dorado del Chile* (PepGMV).

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Realizar expresión transitoria en plantas de *Capsicum annuum* con construcciones que contengan RNAs pequeños de origen viral y evaluar su respuesta a la infección con *Virus del mosaico dorado del Chile* (PepGMV).

V.2 Objetivos específicos

- A. Analizar bibliotecas de RNA pequeños de origen viral y seleccionar aquellos que se encuentren inducidos durante el proceso infeccioso de PepGMV.
- B. Seleccionar el promotor tejido-específico para la expresión de los RNAs pequeños seleccionados.
- C. Obtener construcciones que contengan las regiones asociadas a la producción de niveles altos de los RNAs pequeños seleccionados para ser expresados en plantas de *Capsicum annuum*.
- D. Realizar ensayos de expresión transitoria en plantas de *C. annuum* con las construcciones obtenidas y evaluar su respuesta a la infección.

VI. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

VI.1 Diseño y construcción de vectores de expresión

VI.1.1 Amplificación de fragmentos de interés

Para generar las construcciones que llevan los fragmentos de interés seleccionados y el promotor, se realizó la amplificación de cada una de las secuencias. Los fragmentos TrAP-REn, CP-IR, Rep y AC4-IR corresponden a cuatro fragmentos del componente A del genoma de PepGMV. Las secuencias GFP de la proteína verde fluorescente, el promotor del gen de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa de tomate (*rbcS2*) y el terminador tRab17, fueron amplificados con los oligonucleótidos de la tabla 2.

Para generar las construcciones se utilizó el vector de silenciamiento pFGC5941. Las secuencias en sentido se clonaron en los sitios de clonación múltiple AscI y SwaI. Las secuencias en antisentido, se clonaron en los sitios PacI y XbaI. Para realizar la clonación se adicionaron los sitios de restricción en los oligonucleótidos diseñados.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador Applied Biosystems Veriti®96 con los siguientes parámetros: 94°C por 4 min, 30 ciclos de 94°C por 20 s, 57°C por 20 s y 40 s a 72°C, además de 4 min a 72°C. Se corrió un gel de agarosa al 1.5 % para verificar que los tamaños de los productos de PCR fueran los adecuados.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados. El total de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran descritos.

Nombre Oligonucleótido	Secuencia
PrbcS-DIR	5'-GAGCTCATCGATCATAAAGTTGAGGACAATATAAGC-3'
PrbcS-REV	5'-CCATGGGCCATATTGCTTCTTCTCTCT-3'
GFP-DIR	5'-GGCGCGCCGACTCTAGAGGATCCAAGGAGAT-3'
GFP-REV	5'-CCCGGGGGAAATTCGAGCTCTTATTTGT-3'
TrAP-REn-DIR	5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCCGTCCCAGAAGCTGTCATCGAAG-3'
TrAP-REn-REV	5'-GCTCTAGAATTTAAATGATTCACGCACCGGGGAGAG-3'
Rep-DIR	5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCCGTGCCACATTGTCTTGC-3'
Rep-REV	5'-GCTCTAGAATTTAAATAACGTAAAGGCCAACATCGAGC-3'
AC4-IR-DIR	5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCGAATGCTCCTCTCGTGAAACAC-3'
AC4-IR-REV	5'-GCTCTAGAATTTAAATGAGTCCCAAGAGGCTTTATGT-3'
tRab17-DIR	5'- CCCGGGCTCGAGGCTTTACTTGTGTGCAC -3'
tRab17-REV	5'- CGATCGCGACTCACTATAGGGCGAATTG -3'
chsA-DIR	5'-GTTTATGTTTTAGTGTTTTCT-3'
chsA-REV	5'-TAAGATAAAACGTTGAATGTA-3'
CP-IR-DIR	5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCACATCCCGCCTGTCAAGTCTA-3'
CP-IR-REV	5'-GCTCTAGAATTTAAATCCTGTTAACCCAAGCAGCGG-3'
PepGMV-B-DIR	5'-TTTTAGATATGGAAGCGGGG-3'
PepGMV-B-REV	5'-AATGTATTTATTGCAAAGACTTCG-3'

VI.1.2 Clonación en pJET1.2/blunt

La clonación de los fragmentos de interés en el vector pJET1.2/blunt, se realizó con el kit de Thermo Scientific CloneJET Cloning #K1231, en el cual se agregaron 10 µL de buffer de reacción 2x, 5 µL de DNA producto del PCR sin purificar, 1 µL del vector de clonación pJET1.2, 19 µL de H₂O libre de nucleasas y 1 µL de DNA ligasa T4, lo anterior se mezcló en vórtex, se centrifugó y se dejó incubar a 22°C toda la noche.

VI.1.3 Transformación de células competentes de *E. coli* DH10B

Se colocaron 10 μL del producto dializado de la clonación en tubos Eppendorf con 40 μL de células competentes de *E. coli* DH10B, se mezcló ligeramente y la mezcla se pasó a celdas para hacerles pasar un pulso de 300 V. Luego, se pasó esta mezcla a 500 μL de medio SOC y se dejó incubar a 37°C durante 1 h con agitación constante. Después, se agregó este cultivo a placas con medio LB y carbenicilina 100 mg/ μL (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo) y se dejó incubando toda la noche a 37°C.

VI.1.4 Extracción de DNA plasmídico

Se seleccionaron 5 clonas para cada uno de los fragmentos clonados y se inocularon en medio LB líquido con carbenicilina 100 mg/ μL (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo), y se dejaron incubar a 37°C toda la noche en agitación constante. Luego, se realizó la extracción de DNA plasmídico de las células de los cultivos con el siguiente protocolo: se concentraron las células centrifugando el medio de cultivo a 12000 rpm durante 10 min. Una vez obtenida la pastilla, se adicionó 100 μL de Buffer P1 y se diluyó en él la pastilla con el vórtex, se agregó 100 μL de Buffer P2 y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se agregaron 120 μL del Buffer P3 y se mezcló. Después de incubar durante 3 min, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min, se colectó el sobrenadante y se le adicionó 1 volumen de etanol absoluto a -20°C, se agitó y desechó el sobrenadante. Luego, se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se agitó. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla durante 30 min y se resuspendió en 50 μL de H₂O.

VI.1.5 Secuenciación

Los fragmentos TrAP, AC4-IR, Rep, CP-IR, GPF y prbcS2 clonados en el vector pJET1.2/blunt fueron secuenciados por el método Sanger (Servicios Genómicos Langebio),

y los resultados fueron analizados con el programa SnapGene para verificar que la secuencia estuviera correcta.

VI.1.6 Construcción en pFGC5941 con los fragmentos TrAP-REn, Rep, CP-IR y AC4-IR

Los fragmentos amplificados con los oligos de la tabla 2 y ligados en pJET1.2/blunt, se digirieron con las enzimas AscI y SwaI para crear el fragmento que se ligaría en sentido al vector pFGC5941. Para la digestión con la enzima AscI se agregaron 0.5 µL de dicha enzima, 5 µL de buffer, 500 ng de DNA obtenido de la extracción de DNA plasmídico y 500 ng del vector pFGC5941, se agregó agua hasta un volumen final de 50 µL. La reacción se incubó toda la noche a 37°C, después se dializó por 20 min y se ligó a 22°C durante 1 h. Se repitió el procedimiento, pero ahora cortando con la enzima SwaI y religando. La mezcla de la ligación se limpió con cloroformo y se precipitó con isopropanol. Este DNA se resuspendió y se utilizó para transformar cepas electrocompetentes de *E.coli* DH10B.

Para realizar la selección de las clonas en sentido, se realizó PCR de colonia utilizando los mismos pares de oligos usados para amplificar cada fragmento.

Para clonar el fragmento en antisentido, se repitió el protocolo anteriormente descrito, usando los sitios de restricción PacI y XbaI. Para seleccionar las clonas positivas se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos directos de cada uno de los fragmentos y el chsA-DIR de la tabla 2.

VI.1.7 Construcciones 35S::GFP y prbcS2::GFP

La proteína verde fluorescente (GFP), fue amplificada del plásmido psmGFP (www.arabidopsis.org, CD3-326) usando los oligos de la tabla 2, GFP DIR 5'-GGCGCGCCGACTCTAGAGGATCCAAGGAGAT-3' y GFP REV 5'-GGCGCGCCGACTCTAGAGGATCCAAGGAGAT-3', que contienen las secuencias para

las enzimas de restricción AscI y SmaI, respectivamente. El producto fue clonado en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, K1231).

Para obtener la construcción 35S::GFP se sustituyó el intrón de la chalcona sintasa A (*chsA*) por el GFP, por medio de digestiones con las enzimas de restricción AscI y SmaI. En el caso de la construcción *prbcS2::GFP-tRAB17*, una vez que se obtuvieron las construcciones con el promotor *prbcS2* y el terminador *tRAB17*, se sustituyó el intrón *chsA* por el GFP. La clonación se realizó con las enzimas de restricción AscI y SmaI. La comprobación de la clonación se realizó por PCR con los oligos para GFP de la tabla 2.

VI.2 Expresión Transitoria

VI.2.1 Transformación de células electrocompetentes de la cepa GV2260

Agrobacterium tumefaciens

Se agregó 1 μL de DNA plasmídico de cada una de las construcciones obtenidas (50 ng/ μL) a 50 μL de células electrocompetentes de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* y se agitó suavemente. Esta mezcla se pasó a una celda de 1 mm dándole un pulso en el electroporador Cell Porator. Inmediatamente después se incubó en 500 μL de medio YEB a 28 °C durante 2 h. Después se sembraron 100 μL del cultivo en medio YEB con kanamicina, carbenicilina y rifampicina (100 mg/mL cada uno). Se incubaron a 28 °C durante 48 horas, que es el tiempo en el que las colonias son visibles. De las colonias resistentes, se seleccionaron 4 de cada construcción, se pusieron a crecer en medio líquido YEB con kanamicina, carbenicilina y rifampicina (100 mg/mL cada uno), se incubaron a 28 °C en agitación a 200 rpm, durante 48 horas. Se extrajo DNA de cada una de las colonias de *Agrobacterium* y se realizó PCR para saber si la cepa fue transformada con la construcción que contiene los fragmentos de interés de PepGMV.

VI.2. 2 Agroinfiltración en plantas de chile

Se germinaron semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) var. Sonora Anaheim con un fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad, a una temperatura de 28°C. Para evaluar la eficiencia de las construcciones obtenidas se realizó la agroinfiltración de 10 plantas por tratamiento de chile en estadio de cuatro hojas como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. - Tratamiento aplicado en agroinfiltración. En la columna izquierda está el tratamiento aplicado para la agroinfiltración y en la columna derecha el número de plantas de chile para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	# PLANTAS
35S::TrAP-REn	10
35S::CP-IR	10
35S::Rep	10
35S::AC4-IR	10
pFGC5941	10
Medio de infiltración	10

Se picaron colonias positivas de *Agrobacterium tumefaciens* en medio líquido YEB con kanamicina, carbenicilina y rifampicina (100 mg/mL), de cada una de las construcciones obtenidas y se incubaron a 28 °C en agitación a 200 rpm durante 48 horas. Se diluyó este cultivo hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 600 nm en medio de infiltración que contiene 1 mL de MgCl₂, 1 mL de MES 1M y 100µL de acetosiringona, incubando en la oscuridad a 28°C toda la noche. Se infiltraron 2 hojas de cada planta, 10 plantas por tratamiento, el medio se infiltró en el envés de las hojas de chile con una jeringa de 3 mL.

Cuatro días después de la agroinfiltración de las plantas de Chile en la tercera y cuarta hoja verdadera, se cortó la hoja y se procedió a realizar la extracción de RNA. Se homogeneizaron 150 mg de tejido molido en 1 mL de Trizol, se agitó en Vórtex 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 200 μ L de cloroformo a 4 °C, se mezcló por inversión e incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 12000 rpm a 4 °C. Se transfirieron 600 μ L del sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL; se agregaron 600 μ L de etanol al 70 % preparado con agua DEPC y se mezcló. Se transfirieron 600 μ L de la mezcla anterior a una columna del Kit de Life Technologies PureLink™ RNA Mini Kit AMBION y se centrifugó 15 min a temperatura ambiente a 12000 rpm descartando el líquido drenado. Se realizaron lavados del RNA agregando Wash Buffer I y II, 700 μ L de cada uno, centrifugando 15 s cada vez a temperatura ambiente a 12000 rpm, luego se secó el paquete celular centrifugando durante 1 minuto a temperatura ambiente a 12000 rpm. Después se agregaron 100 μ L agua libre de RNasa para disolver el ARN incubando durante 1 min. Se midió la concentración en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific.

Para eliminar una posible contaminación con DNA en la extracción, se trató 1 μ g de RNA total con 1 μ L de buffer+MgCl₂ y 1 μ L de DNasa, se llevó a un volumen final de 10 μ L y se incubó a 37°C durante 30 min. Después se adicionó 2 μ L de EDTA 25mM a 65°C durante 10 min. Finalmente se corrió una alícuota de 300 ng en gel en agarosa al 1.2 % a 70 V durante 30 min para comprobar la integridad del ARN extraído. Las bandas de RNA ribosomal de 18 y 28S deben ser visibles e íntegras.

VI.2.3 Síntesis de cDNA

A 500 μ g de RNA total extraído de las hojas agroinfiltradas con las construcciones obtenidas se agregaron 2 μ L de una mezcla de oligonucleótidos reversos, uno de ellos para la actina que se utilizó como gen constitutivo o normalizador de la amplificación y el otro para los fragmentos de interés Rep, AC4-IR, TrAP y CP-IR a 5 μ M. Los cuales se colocaron en el termociclador Applied Biosystems Veriti®96 a 65 °C durante 5 min.

Posteriormente, se agregaron 4 μL de regulador RT, 2 μL de dNTPs 10 mM y 1 μL de enzima transcriptasa reversa (Fermentas). Se amplificó en un termociclador Applied Biosystems Veriti®96 en un programa con un ciclo de 90 min a 45 °C y otro a 70 °C durante 10 min. Se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla 2 para llevar a cabo la amplificación por PCR semicuantitativo.

VI.2.4 Amplificación de fragmentos de interés

Para verificar si la agroinfiltración estaba funcionando y si las construcciones se estaban expresando, se realizó el RT-PCR con los pares de oligonucleótidos de la tabla 2 para cada fragmento de interés: TrAP-REn, Rep, CP-IR y AC4-IR. Las condiciones con las que se realizó la amplificación fueron: 1 ciclo de 5 min a 90 °C; 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 57 °C y 30s a 72 °C, y un ciclo de 4 min a 72 °C. La reacción resultante se corrió en un gel de agarosa al 1.5% por 45 min a 90 V.

VI.2.5 Evaluación de la eficacia de las construcciones: Infección con PepGMV

Cuatro días después de realizar la agroinfiltración se procedió a infectar las plantas con *Virus del mosaico dorado del chile* PepGMV. Se utilizaron clonas diméricas de los componentes A y B del virus.

VI.2.5.1 Preparación de partículas para bombardeo

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno, se lavaron con 2 mL ácido nítrico 0.1N, luego se sonicaron por 20 min en un baño de agua con hielo. La muestra total se alicuotó en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 10000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y se le agregó 1 mL de etanol absoluto, se sonicó y centrifugó 15 segundos a 12000 rpm. Después de desechar el sobrenadante se agregó 1 mL de agua. Luego se realizó una dilución con 250 μL de partículas/750 μL de agua. Estas partículas se sonicaron y se pasaron 60 μL a un

tubo, al cual se le adicionaron 50 μL de cloruro de calcio al 2.5 M, 20 μL de espermidina 0.1 M y 1 ng de cada componente A y B de PepGMV. Después se mezcló en vórtex, se sonicó y se centrifugó a 10000 rpm por 20 s. Luego se hicieron dos lavados con etanol. Finalmente se tiró el sobrenadante y adicionó 60 μL de etanol absoluto.

VI.2.5.2 Bombardeo de PepGMV

Se bombardeó la tercera o cuarta hoja agroinfiltradas con 10 μL de las partículas anteriormente preparadas con una pistola de baja presión modificada a 120 psi.

VI.3 Severidad de síntomas

Para evaluar la severidad de los síntomas de las plantas infectadas, se utilizó la escala de síntomas de 0 al 4 (**Figura 8**). Para determinar el porcentaje de severidad de los síntomas se utilizó la formula $S = (\sum i/N [VM]) * 100$, donde S, es el porcentaje de severidad, $\sum i$, es la sumatoria de los valores observados, N es el número de plantas observadas y VM es el valor de escala completa.



Figura 8. Fenotipos mostrados por plantas sintomáticas infectadas con PepGMV. La escala utilizada es la siguiente: 0) Planta sana, 1) Mosaicos amarillos apenas visibles, 2) Red de mosaicos visibles y leve rugosidad detectada en las primeras hojas mostrando síntomas, 3) Todas las hojas sintomáticas muestran mosaicos amarillos, enchinamiento y rugosidad y 4) Hojas sintomáticas son más pequeñas, plantas sintomáticas muestran distorsión general con retraso severo del crecimiento de la planta con mosaicos amarillos, enchinamiento y rugosidad.

VI.4 Incidencia

Para determinar la incidencia de DNA viral en plantas infectadas se utilizaron como factor las plantas que amplificaron un fragmento de 650 pb del componente A de PepGMV, usando los oligonucleótidos que siguen: AC4-DIR 5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCGAATGCTCCTCTCGTGAAACAC-3' y CP-IR-REV 5'-GCTCTAGAATTTAAATCCTGTTAACCCAAGCAGCGG-3'. El porcentaje de incidencia fue calculado con la siguiente formula: $I = (\text{plantas PCR positivo} / \text{total de plantas inoculadas}) * 100$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. 1 Análisis de los RNA pequeños (sRNA).

Las lecturas generadas a partir de la secuenciación masiva de RNA pequeños de origen viral (svRNA) obtenidas de muestras de plantas infectadas con PepGMV y colectadas a los 6, 10 y 20 días (pre-síntomas, síntomas y remisión, respectivamente) después de la inoculación, fueron alineadas con el genoma de dicho virus. Los sRNA que se obtuvieron se analizaron por tamaño y orientación, respecto a las cadenas positivas y negativas de ambos componentes de PepGMV.

La cantidad total de sRNA relacionados con ambos componentes y orientaciones de PepGMV se muestra en la figura 9. Para el componente A se obtuvieron 32963 y 32994 lecturas, en cadena positiva y negativa, respectivamente. Para PepGMV-B, se obtuvieron 32964 lecturas para la cadena sentido y 32933 lecturas para la antisentido. La cantidad de RNA pequeños totales obtenidos de la infección con PepGMV se mantiene consistente entre los componentes A y B y en ambos sentidos de las cadenas.

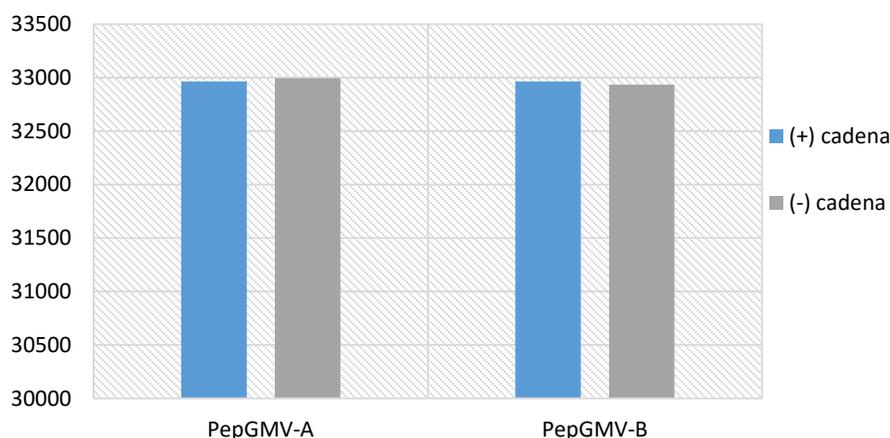


Figura 9. Número total de sRNA para los componentes A y B de PepGMV detectados en plantas de Chile infectadas. En azul se muestra el total de svRNA de cadena positiva obtenidos en el análisis de los 6, 10 y 20 dpi. En gris se muestra los RNA pequeños de cadena negativa en las mismas condiciones.

VII.1.1 Tamaño de los RNA pequeños

Se analizó la cantidad de RNA pequeños mapeados en PepGMV durante la infección de plantas de Chile. El análisis incluye los RNA pequeños de 20-25 nt. Los gráficos obtenidos de las muestras colectadas a los 6 dpi mostraron que predominan los sRNA de 21-22 nt. La cantidad de RNA pequeños totales encontrados osciló entre 44-190 lecturas para PepGMV.

Después de los 10 días de realizarse la infección, cuando se presentan los síntomas, los patrones de distribución de RNA pequeños varían considerablemente. La cantidad de sRNA de 21-22 nt es la que predomina con 20243 y 22155 lecturas, respectivamente. En contraste, los RNAs de 23-25 nt resultan con un menor número de lecturas que van desde los 1156 hasta 3511.

Conforme se desarrolla la infección, después de 20 días, cuando se ha reportado que las plantas infectadas con PepGMV presentan remisión de síntomas, la cantidad de RNA pequeños mapeados para este virus, se dispara para la clase de 20-21 nt, con 18161 y 18887 lecturas, respectivamente. De manera interesante, los sRNA de 22-25 nt no se encontraron representados en esta etapa. Esta característica podría sugerir que los RNA pequeños de 20-21 nt son los que están implicados en mecanismos de silenciamiento que ayudan a la remisión de síntomas en la planta.

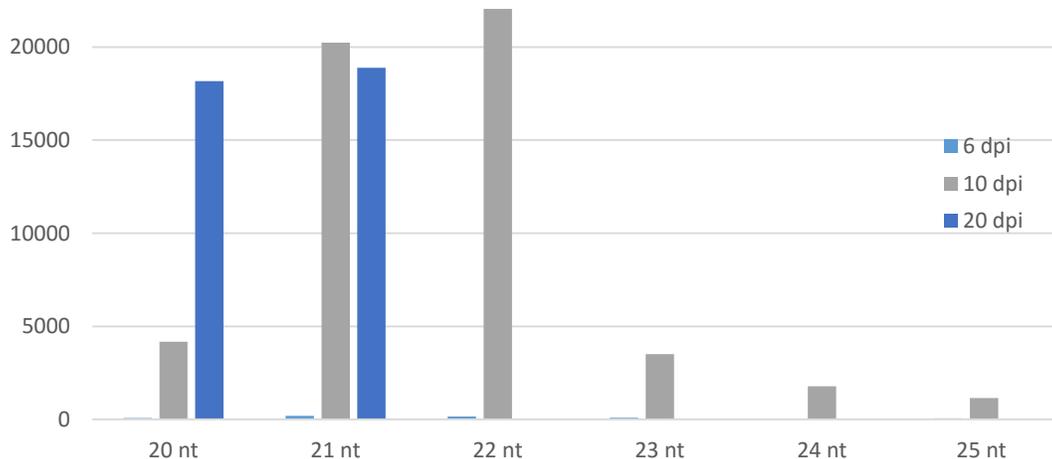


Figura 10. Comparación del total de sRNA en las etapas evaluadas. En el eje de las “x” se representa el tamaño de los sRNA y en el eje de las “y” el número de lecturas correspondientes a cada clase. El número de sRNA obtenidos en las muestras de 6 dpi es muy pequeño y no alcanza a destacar por las escalas. Ver figura 11.

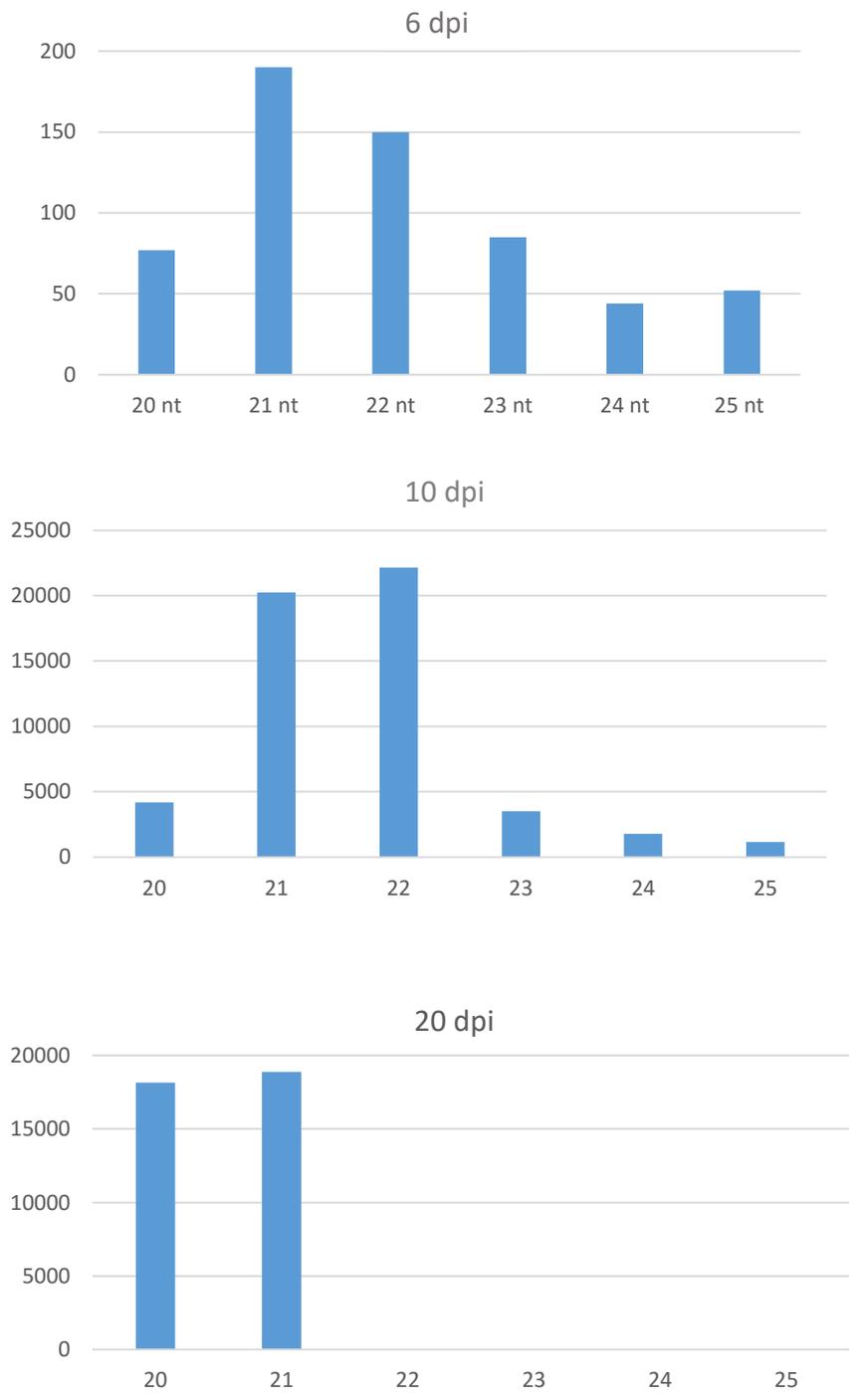


Figura 11. RNA pequeños relacionados con PepGMV obtenidos de plantas infectadas con chile a los 6, 10 y 20 dpi.

Lo anterior podría sugerir que las proteínas tipo Dicer que intervienen en el mecanismo de silenciamiento podrían ser diferentes. En *Arabidopsis thaliana*, las proteínas DCL24, DCL2 y DCL3 generan los RNA pequeños virales de 21, 22 y 24 nt, respectivamente (Ruiz-Ferrer V. *et al.*, 2009). Debido a que los sRNA más representados en el análisis son los de 21 y 22 nt, se podría sugerir que las proteínas tipo Dicer que principalmente participan en el mecanismo de defensa antiviral de Chile contra PepGMV son la DCL4 y la DCL2. De manera similar, plantas de yuca infectadas con potyvirus mostraron una mayor población de sRNA virales de 21-22 nt (Ogwok E. *et al.*, 2016). Los sRNA de 21-22 nt están asociados a PTGS, por lo que el silenciamiento a nivel postranscripcional podría ser la ruta de silenciamiento predominante en la defensa de Chile contra PepGMV.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado con análisis Northern blot en el área de Rep y CP de PepGMV. Esto reveló que los RNA pequeños que principalmente son sintetizados son los de 21-22 nt, los cuales están relacionados con PTGS. Aunque también se encuentran representados los de 24 nt relacionados con TGS, pero en menor proporción. (Rodríguez-Negrete E. *et al.*, 2008).

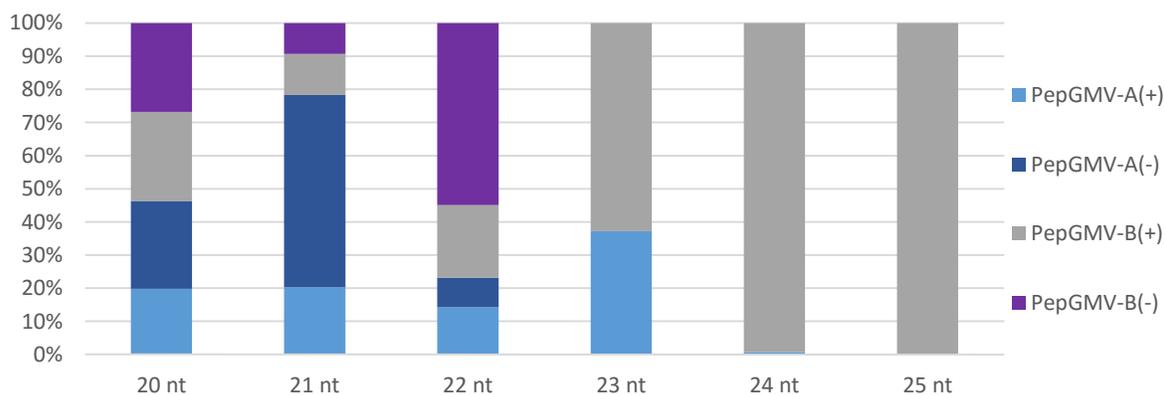


Figura 12. Porcentaje de RNA pequeños en PepGMV 10 dpi. El gráfico representa la proporción de RNA pequeño de 20-25 nt, en los componentes A y B del genoma de PepGMV, cadena positiva y negativa.

En las plantas con síntomas, el mayor porcentaje de sRNA de 24-25 nt detectados se encuentra relacionado con la cadena positiva del componente B de PepGMV. Debido a que estos sRNA están asociados a efectos epigenéticos de metilación de DNA, se esperaría que se encontraran principalmente distribuidos en zonas promotoras o aledañas. Sin embargo, no muestran un patrón claro de distribución restringido a estas zonas. En cambio, muestran picos importantes en regiones codificantes. Además, se comparó la distribución de sRNA de 21-22 nt, la cual mostró una distribución similar a la de 24 nt. Teniendo un mayor número de lecturas alineadas al marco de lectura abierto correspondiente al gen MP.

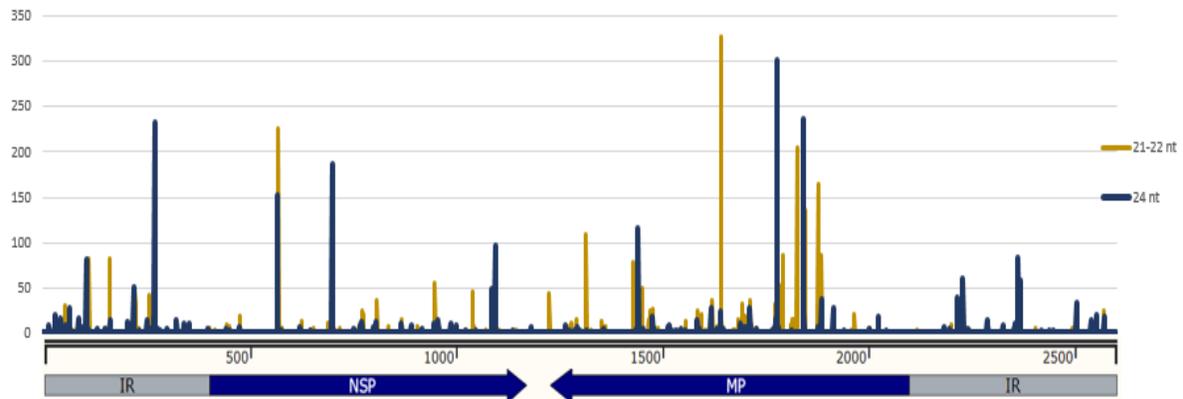


Figura 13. Distribución de sRNA de 21-22 y 24 nt (cadena positiva) en PepGMV-B. En el eje de las “x” se encuentra representado el componente PepGMV-B y en el eje de las “y” el número de lecturas distribuidas.

Lo anterior sugiere que DCL3, proteína asociada a sRNA de 24 nt, tiene actividad limitada en chile infectado con PepGMV y que la presencia de sRNA en el genoma de PepGMV-B se favorece en ciertas regiones, principalmente en el marco de lectura de MP.

VII.1.2 Distribución de las poblaciones de sRNA en el genoma de PepGMV

El mapeo de los sRNA de origen viral mostró variaciones en cuanto a su distribución, tamaño y número. El mayor pico encontrado fue en la zona de traslape de los genes TrAP-REn y se mantuvo en las tres etapas de infección evaluadas. No así, la cantidad de sRNA, ya que ésta varía en las tres etapas. Como ya se ha mencionado, TrAP es una proteína asociada a transcripción y transactiva los genes tardíos relacionados el movimiento, por lo que la regulación de este gen podría disminuir los niveles de mRNA y de movimiento del propio virus. Ambas características de la remisión de síntomas (Ribeiro S. G. *et al.*, 2007). Además, hay reportes que muestran que la proteína TrAP de algunos *Begomovirus* es un supresor de silenciamiento, por lo que la planta podría estar tratando de apagar este gen o disminuir su expresión, con el fin de reducir la supresión del silenciamiento.

Por otra parte, la desregulación de Rep resulta en la potenciación de la expresión de TrAP y REEn, debido a que TrAP es necesaria para la expresión de CP y NSP (Shimada-Beltrán H. *et al.*, 2007). La cantidad de RNAs pequeños presentes en la región correspondiente a TrAP-REEn podría deberse a la alta cantidad de mRNA de estos dos genes, los cuales son necesarios para la expresión de los genes tardíos CP y NSP. Estos genes juegan un papel esencial en el proceso infectivo del virus.

La menor cantidad de sRNA se encuentra a los 6 días después de infectar las plantas con el virus, luego se encuentran las lecturas correspondientes a los 20 días y en mayor grado las correspondientes a los 10 días después de la infección. Esto podría estar relacionado con la poca cantidad de células infectadas en los primeros días después de la infección (6 dpi), por lo que la cantidad total de sRNA encontradas en esta etapa infectiva es menor que en las etapas posteriores.

Como ya se había mencionado, reportes del mismo sistema (chile infectado con PepGMV), indican que la cantidad de DNA y transcritos virales son mayores en síntomas que en plantas con remisión (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006). Por lo que se podría sugerir que la cantidad de sRNA obtenidos en plantas con síntomas (10 dpi) y en plantas con remisión (20 dpi) está mayormente atribuida a la cantidad de DNA viral y los transcritos presentes en estas etapas, los cuales son la “materia prima” para la generación de sRNAs.

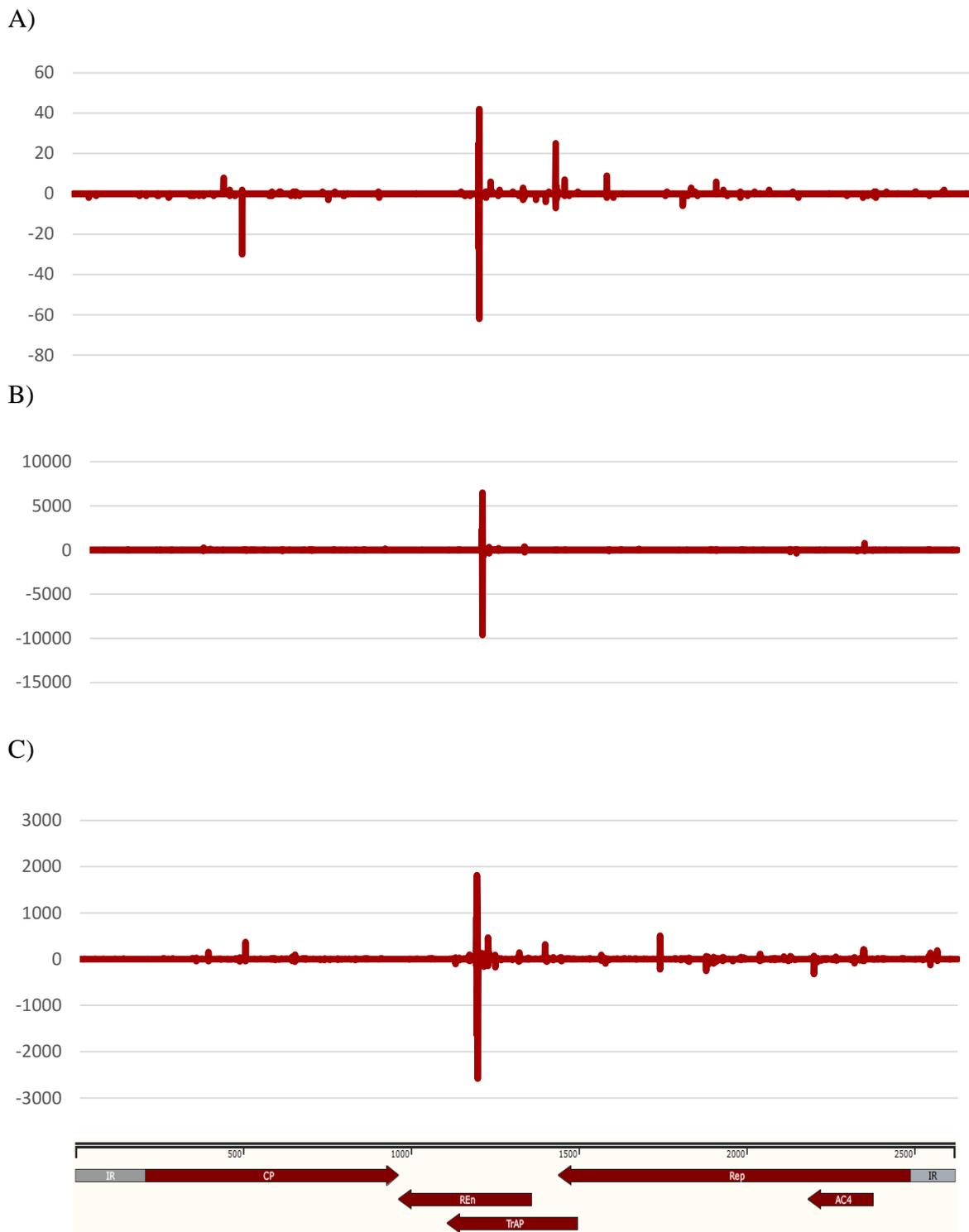


Figura 14. Gráficos que muestran el número de sRNA detectados en el proceso infeccioso de **PepGMV-A** en plantas de Chile. A) 6 dpi, B) 10 dpi y C) 20 dpi. En el eje de las “x” está representado el genoma de PepGMV, el eje de las “y” muestra el número de sRNA alineados en los sectores del genoma viral.

La cantidad de sRNA de origen viral mapeados en la region correspondiente a Rep aumenta a los 20 dpi, lo cual podría estar relacionado con la disminucion de DNA/RNA viral en plantas que muestran remision. Esta observacion concuerda con la funcion de Rep en replicacion del virus como un gen de expresi3n temprana durante el ciclo infectivo de PepGMV (Shimada-Beltr3n H. *et al.*, 2007).

De igual manera, la cantidad de sRNA virales mapeados en CP aumenta a los 20 dpi, y debido a que se ha reportado CP como una proteina relacionada tambi3n a la acumulaci3n de DNA viral, esto podria indicar que es un factor que tambi3n influye en la disminuci3n de DNA viral en remisi3n.

Por otro lado, los sRNA mapeados en el componente B de PepGMV (**Figura 15**) est3n mayormente localizados en la regi3n correspondiente al gen que codifica para la MP, prote3na responsable del movimiento c3lula-c3lula del virus. Esto concuerda con lo visto en otros virus de la misma familia. Por ejemplo, en plantas de yuca infectadas con *Virus africano oriental del mosaico de la yuca* se observ3 un patr3n similar de acumulaci3n de sRNA en MP (Chellappan P. *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de estas similitudes entre virus de la misma familia, tambi3n se han reportado marcadas diferencias de distribuci3n de sRNA en plantas infectadas con ACMV, las cuales presentan una mayor distribuci3n de RNA peque1os en la regi3n correspondiente al C'-terminal de Rep y el N'-terminal de TrAP (Chellappan P. *et al.*, 2004). Adem3s, se ha visto que en plantas de chile infectadas con PHYVVV, la distribuci3n de RNA peque1os se localiza mayormente en la regi3n interg3nica (Datos no publicados Trejo-Saavedra D. 2016).

Por otra parte, reportes de perfil de sRNA en la secuencia codificante de GFP generada a partir del silenciamiento por una construcci3n tipo tallo-asa, muestran la presencia de "hotspots", tanto en cadena positiva como en cadena negativa (Molnar A. *et al.*, 2010). Las similitudes entre los patrones de distribuci3n analizados aqu3 y los encontrados en la secuencia codificante GFP, sugiere que los picos encontrados se deben m3s a regiones favorecidas para la formaci3n de sRNA en las secuencias analizadas.

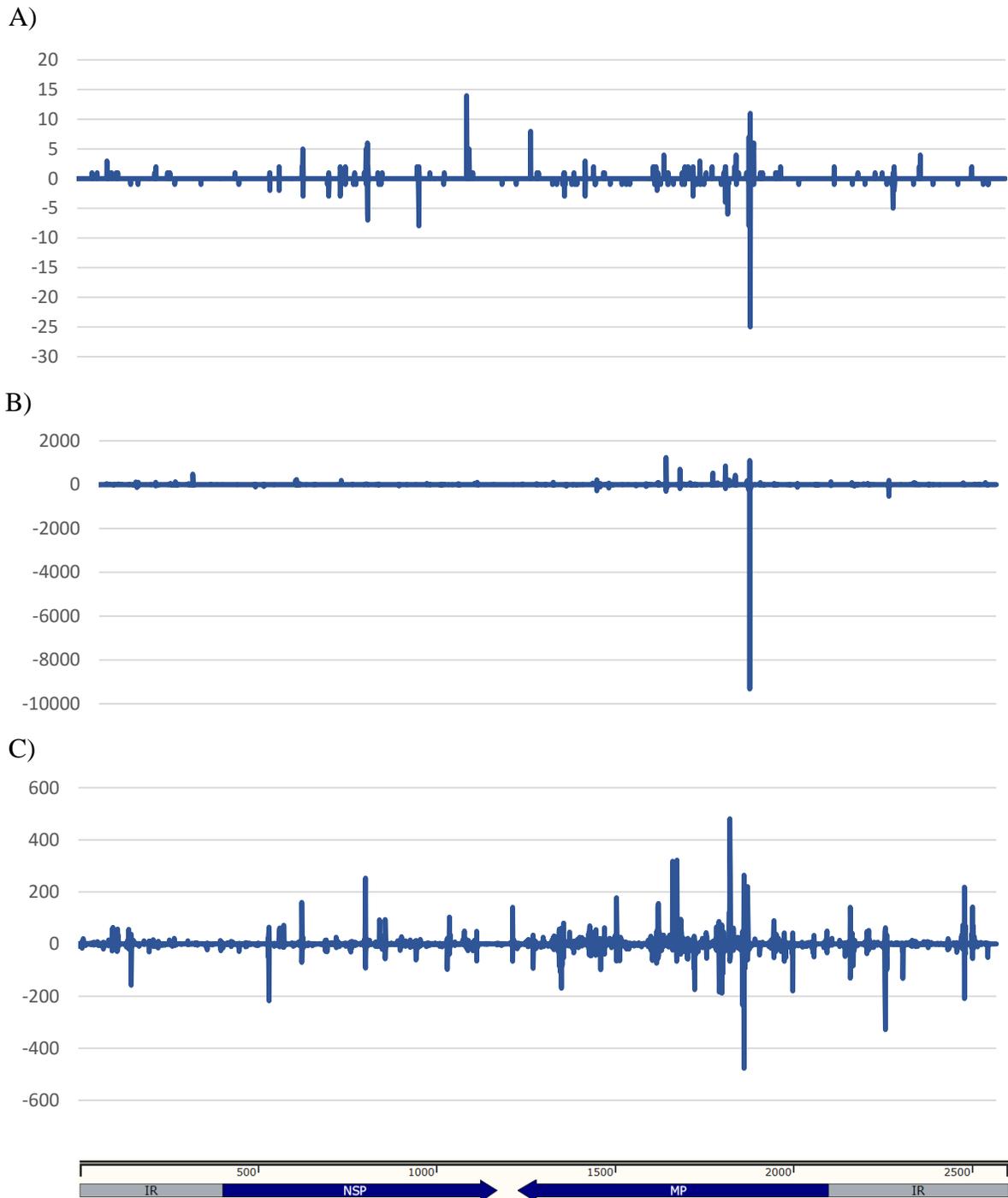


Figura 15. Gráficos que muestran el número de RNA pequeños generados en el proceso infectivo de PepGMV-B en plantas de Chile. A) 6 dpi, B) 10 dpi y C) 20 dpi. En el eje de las “x” está representado el genoma de PepGMV, el eje de las “y” muestra el número de RNA pequeños alineados en el genoma viral.

Por lo tanto, la distribución no aleatoria de los sRNA podrían deberse a las diferencias en cuanto a procesamiento y estabilidad de los RNA pequeños de diferentes regiones del genoma de PepGMV. Esto es, que zonas específicas del genoma pueden favorecer la formación de RNA pequeños, ya sea por la formación de estructuras secundarias o por la secuencia misma de nucleótidos. Además, podrían estar representados sRNA primarios y secundarios generados a partir de secuencias completas de mRNA viral con la ayuda de las RNA polimerasas dependientes de RNA (Schwach F. *et al.*, 2005).

Se han reportado diferencias en los patrones de mapeo de sRNA del mismo virus en diferentes hospederos. Por ejemplo, el *Virus del moteado clorótico del tomate* en plantas de *N. benthamiana* respecto a lo encontrado en plantas de yuca. Las discrepancias encontradas fueron asociadas a las diferencias en la maquinaria de silenciamiento de las plantas, lo que generaba diferentes interacciones, transcripción diferencial o acumulación de RNA en sentido complementario (Ribeiro S. G. *et al.*, 2007).

Finalmente, además de las explicaciones anteriormente citadas, la disparidad en los números de sRNA encontrados durante la infección con PepGMV puede deberse a la cantidad misma de mRNA sintetizado para cada gen viral. Esto, debido a la expresión bidireccional que presentan los *Begomovirus* (Hanley-Bowdoin L. *et al.*, 2010).

VII.2 Selección del promotor

El gen *rbcS2* de tomate codifica para la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Para realizar la búsqueda del promotor *prbcS2* de tomate, se introdujo en la base de datos NCBI las características del gen y arrojó la secuencia con número de acceso X05983.1 y GI: 19331. Esta secuencia cuenta con 2776 pb y pertenece a *Solanum lycopersicum*. Para amplificar la región promotora de este gen, se extrajo RNA total de hojas de planta de tomate y de este se obtuvo cDNA. Tomando como molde este cDNA se amplificó con los oligonucleótidos *prbcS2-DIR* 5'-GAGCTCATCGATCATAAAGTTGAGGACAATATAAGC-3' y *PrbcS2-REV* 5'-CCATGGGCCATATTGCTTCTTCTCTCT-3'. El promotor amplificado tiene 432 pb de

longitud, con la siguiente secuencia:

```
AGCAAGCAAACAAGTACTCTAGCTATCAATTTACTTTGGACTACTATATGATAAAATATTT
CAACCCCCCTCCTCCCCACCAAAAAAAAAAATTAAAATAACAAGTTGAAGGACTCAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAACTCAAAACCAACCTCAATCATACATTCATATCCTCTTCCTACC
CCCATCTTGGATGAGATAAGATTAACGAGGTGCTTACACGTGTCACCTCTATTGTGGTG
ACTTAAAAAAAAATTCCAACCTTTCATATGTAGATATTAAGTAATTGTATAATGTTATCAA
GAACCACATAACATATCAAAAACCTTATCATTTCATTATATAAAAGGATAGTGGACATC
AAAAGGTTTCATATTGAACCAAAAAAAGAGAGAAGAAGCAATATGGCTTCCTCTGTCATT
TCTTCA.
```

Este promotor presenta una característica importante ya que a diferencia del resto de los genes pertenecientes a esta familia su expresión no depende de la luz, es decir, que continuamente se va estar expresando en los tejidos específicos sin importar el fotoperíodo (Manzara T. *et al.*, 1988).

El promotor que regula la expresión de este gen presenta mayor expresión en hoja y aunque se expresa en fruto, esta expresión va desapareciendo conforme madura el fruto. Estas dos características fueron cruciales para su selección debido a que en la hoja es donde se encuentra el virus en plantas infectadas. La disminución de la expresión de prbcS2 en fruto conforme éste madura, es una característica de gran importancia ya que la actividad del transgen introducido a las plantas disminuirá de igual manera. La ventaja de contar con este patrón de expresión para las plantas transgénicas es que no habrá presencia de transcritos en frutos maduros que es el producto de consumo.

VII.3 Selección de los fragmentos de PepGMV

Se seleccionaron tres fragmentos que contienen una gran cantidad de RNA pequeños y están localizados en cuatro de los genes del componente A del genoma de PepGMV. El tamaño de los fragmentos va de los 209-261 pb. Reportes indican que se han utilizado fragmentos de 50 pb a 1 kb para generar silenciamiento de manera exitosa y que los fragmentos más pequeños son menos probables que activen un silenciamiento efectivo (Helliwell C. A. *et al.*, 2005).

El primer fragmento denominado TrAP-REn contiene dos picos importantes y se encuentra localizado en el traslape de los genes TrAP y REn en la posición 1262, el cual representa el mayor pico encontrado en el análisis de los RNA pequeños. El fragmento incluye los marcos de lectura abiertos para dos proteínas de gran importancia.

El segundo fragmento Rep, se encuentra justamente localizado en este gen del genoma viral de PepGMV y comprende 211 pb. Dicho fragmento contiene tres picos con importante número de lecturas. El fragmento comienza a los 483 pb del N-terminal del gen Rep.

El tercer fragmento AC4-IR, posee dos picos de importancia, de los cuales el mayor se encuentra situado en el marco de lectura abierto para lo que podría ser AC4 y la región intergénica (**Figura 16**). Este fragmento es de 262 pb, de los cuales 101 pb corresponden a la región intergénica, 110 pb corresponden al gen Rep y 51 pb al marco de lectura abierto para lo que podría ser el gen AC4.

Además de los tres genes seleccionados como fuertes candidatos para generar silenciamiento, se seleccionó un cuarto fragmento (CP-IR), el cual presenta muy baja cantidad de RNA pequeños mapeados en esa zona. El fragmento comprende 65 pb de la región intergénica y 126 pb del N-terminal del gen CP.

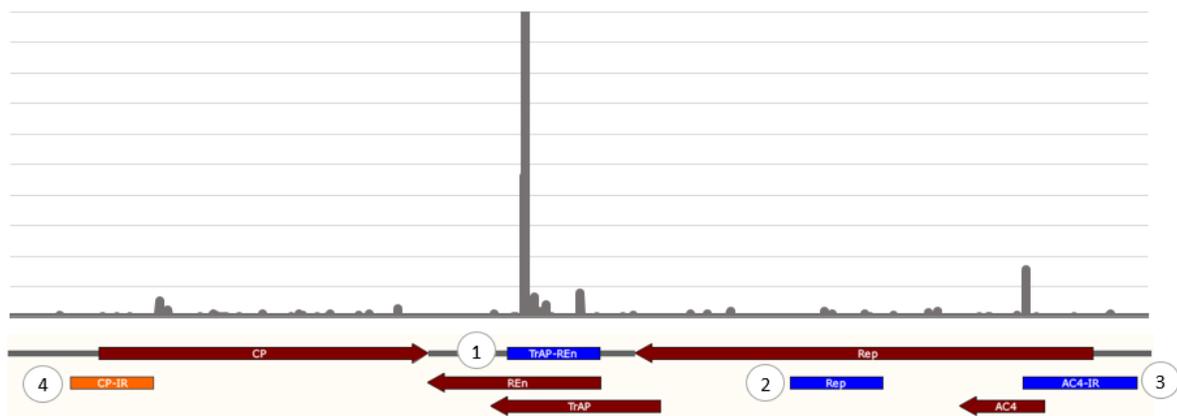


Figura 16. Localización de los fragmentos del genoma de PepGMV seleccionados para la generación de construcciones. En el grafico se muestra la ubicación de los fragmentos seleccionados en el genoma de PepGMV-A. 1) TrAP-REn, 2) Rep, 3) AC4-IR y 4) CP-IR.

Además de la clara presencia de la acumulación de RNA pequeños generados en ciertas regiones del genoma de PepGMV, estas regiones presentan un interés especial para generar silenciamiento por RNA. Se ha visto que AC4 produce una proteína supresora del silenciamiento viral, por lo que su silenciamiento podría representar para la planta una mayor oportunidad de defenderse ante la infección de este virus. La región intergénica contiene secuencias de gran importancia para la correcta replicación y transcripción. Además, se ha reportado en las estrategias basadas en silenciamiento genético transcripcional (TGS), que un dsRNA específica para la región promotora puede desencadenar RdDM del promotor para suprimir la transcripción del gen.

El fragmento número dos que corresponde al gen Rep, se espera que pueda funcionar como inductor del silenciamiento por RNA en otros virus, debido a que se ha reportado que esta región está altamente conservada entre el género *Begomovirus*.

Hay reportes que muestran que la proteína TrAP de algunos begomovirus es un supresor de silenciamiento y una proteína clave en la transcripción por lo que podría ser un buen blanco para afectar el proceso final (Trinks D. *et al.*, 2005). En adición a estas características, este fragmento incluye a la proteína REn, que es clave para la replicación. Hay reportes que indican que en ausencia de este gen las plantas no muestran síntomas o éstos son atenuados (Hanley-Bowdoin L. *et al.*, 1999).

VII.4 Obtención de las construcciones 35S::Rep, 35S::TrAP-REn, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR

VII.4.1 Amplificación de fragmentos de interés

Para la clonación de los fragmentos de interés se realizó primero la amplificación por PCR de los fragmentos usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2. Los fragmentos Rep, TrAP-REn, AC4-IR y CP-IR amplificaron correctamente a una temperatura de alineamiento de 57°C.

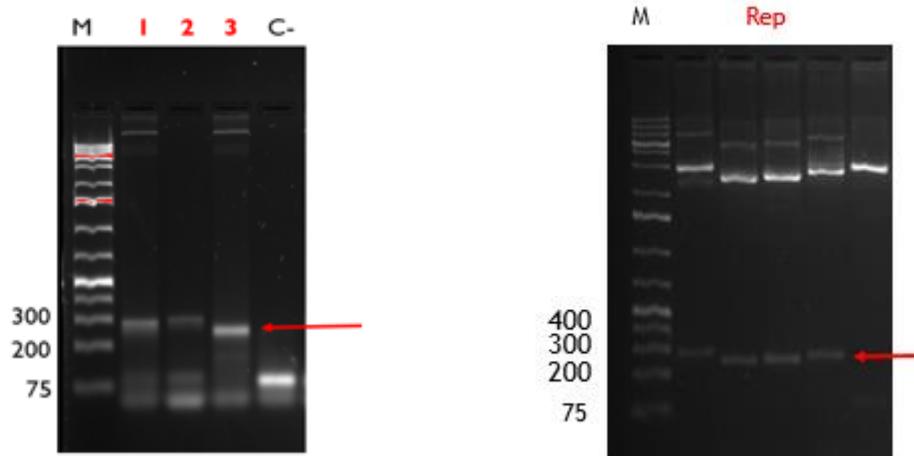


Figura 17. Amplificación de fragmentos de interés. A la izquierda, fotografía de gel de agarosa 2% de los productos de PCR de TrAP-REn carril 1, AC4-IR carril 2 y CP-IR carril 3. A la derecha, fotografía gel de agarosa 2% de la amplificación de Rep.

Una vez amplificados los fragmentos de interés se clonaron en el vector pJET/1.2 blunt. Para verificar que los fragmentos estuvieran clonados de la manera correcta y que su secuencia no se hubiese alterado en el proceso, cada uno de los fragmentos clonados en el vector pJET1.2/blunt fue secuenciado por el método Sanger. Los resultados se analizaron con los programas Snap Gene y Bio Edit y se verificó que los fragmentos contuvieran las secuencias y los sitios de restricción adicionados de manera correcta.

VII.4.2 Generación de construcciones 35S con los fragmentos de interés

Se obtuvieron 4 construcciones a partir del vector de silenciamiento pFGC5941, este vector posee sitios de clonación múltiples para clonar secuencias bajo el promotor fuerte constitutivo del *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) 35S. Los fragmentos Rep, TrAP-REn, CP-IR y AC4-IR fueron clonados en sentido y antisentido.

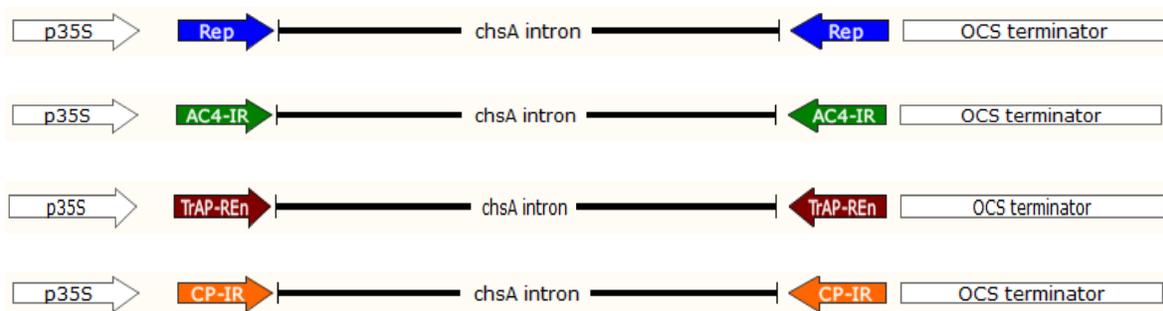


Figura 18. Representación esquemática de las construcciones generadas.

Algunos reportes indican que los transgenes con invertidos repetidos causan silenciamiento génico postranscripcional por la formación de dsRNA, sin la necesidad de la RNA polimerasa dependiente de RNA (Golbach R. *et al.*, 2002). Para generar el RNA de doble cadena tipo horquilla, el vector de silenciamiento contiene el intrón de la chalcona sintasa (chsA). Este intrón de dicotiledóneas es eliminado durante el proceso de edición.

VII.4.3 Construcciones de los fragmentos seleccionados con el promotor prbcS2 de tomate

Las cuatro construcciones evaluadas contienen el promotor 35S, el cual es un promotor fuerte constitutivo de origen viral, CaMV y como terminador el correspondiente al gen de la octopina sintasa.

Estas construcciones se generaron para evaluar la funcionalidad de los fragmentos seleccionados. Sin embargo, para la generación de plantas transgénicas como un producto biotecnológico que pueda ser liberado bajo los lineamientos de bioseguridad y protección intelectual, se diseñaron versiones en las cuales se sustituyeron el promotor patentado 35S y el terminador de la octopina sintasa.

Se realizaron otras cuatro construcciones sustituyendo este promotor por el de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (prbcS2) y el terminador de respuesta a ABA (tRab17). Las cuatro construcciones adicionales con los fragmentos evaluados bajo el promotor prbcS2 y el terminador tRab17 son: pRepds, pTrAP-REnds, pAC4-IRds y pCP-IRds. Para sustituir el

promotor se utilizaron las enzimas *SacI* y *NcoI*, el corte con estas enzimas elimina el casete de marcador se selección en planta, bialafos. Para la sustitución del terminador se utilizaron las enzimas *SmaI* y *PvuI*.

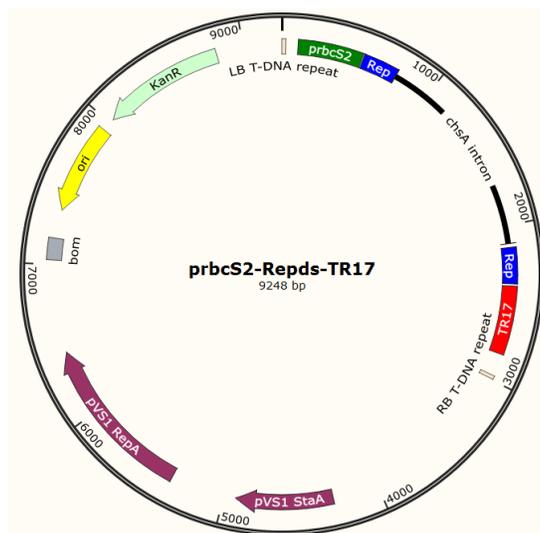


Figura 19.- Mapa de la construcción pReps. En verde, promotor de la ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa (*prbcS2*) de tomate, en rojo el terminador del gen que responde a ABA (*tRab17*).

VII.4.4 Generación de construcciones con GFP bajo los promotores 35S y *prbcS2*

La proteína verde fluorescente (GFP), fue amplificada del plásmido *psmGFP* (www.arabidopsis.org, CD3-326) usando los oligos de la tabla 2, GFP DIR 5'-GGCGCGCCGACTCTAGAGGATCCAAGGAGAT-3' y GFP REV 5'-GGCGCGCCGACTCTAGAGGATCCAAGGAGAT-3', que contienen las secuencias para las enzimas de restricción *AscI* y *SmaI*, respectivamente. El producto fue clonado en el vector *pJET1.2/blunt* (Thermo Scientific, K1231).

Para obtener la construcción 35S::GFP se sustituyó el intrón de la chalcona sintasa por el GFP, por medio de digestiones con las enzimas de restricción *AscI* y *SmaI*. En el caso de la construcción *prbcS2*::GFP-*tRAB17*, una vez que se obtuvieron las construcciones con el

promotor *prbcS2* y el terminador *tRab17*, se sustituyó el intrón de la chalcona sintasa, por el GFP. La clonación se realizó con las enzimas de restricción *AscI* y *SmaI*.

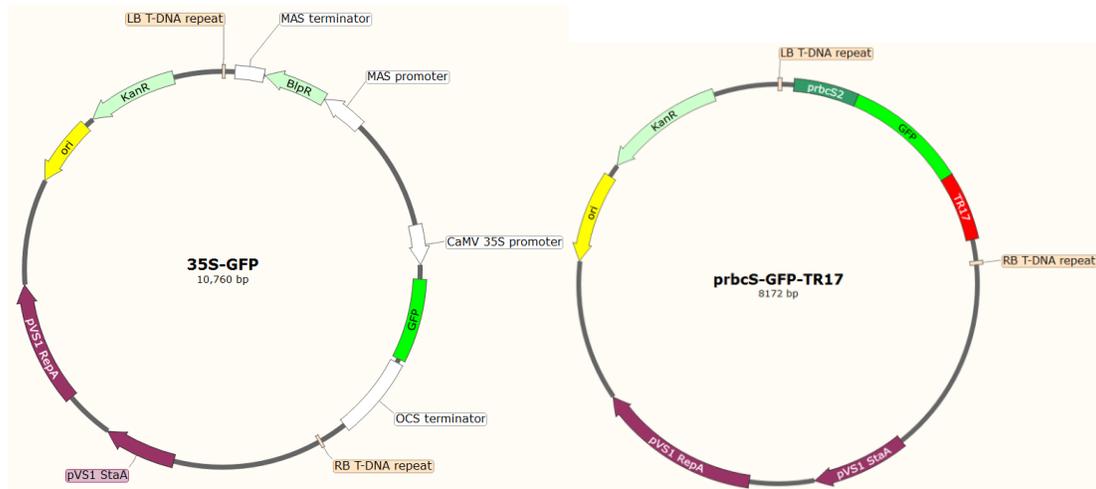


Figura 20. Construcciones 35S::GFP y *prbcS2*::GFP.

VII.5 Ensayos de expresión transitoria: GFP

VII.5.1 Transformación de *A. tumefaciens* con las construcciones *prbcS2*::GFP y 35S::GFP

Para evaluar la expresión de las construcciones que contienen el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo los promotores *prbcS2* de tomate y 35S de origen viral, se transformaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa GV2260.

Una vez que se realizó la transformación en *A. tumefaciens*, se infiltraron en plantas de Chile en estadio de 4 hojas. Después de 2, 5 y 8 días de haber realizado la infección, se recolectó tejido infiltrado y se extrajo RNA total tratado con DNasa, se sintetizó cDNA y el RT-PCR (**Figura 20**) arrojó la presencia de bandas en los 750 pb aproximadamente, lo que confirma la expresión exitosa de las construcciones.

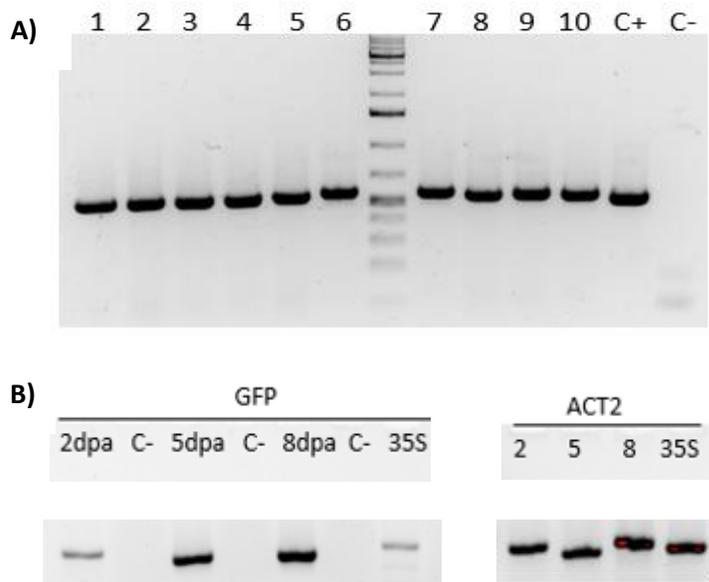


Figura 21. Análisis por PCR de cepas de *A. tumefaciens* positivas para la transformación con 35S::GFP y prbcS2::GFP. A) Los carriles 1-7 corresponden a la construcción con 35S y los carriles 8-10 corresponden a las que contienen prbcS2. **B) RT-PCR de 35S::GFP y prbcS2::GFP.** Fotografía de gel de agarosa al 1,5% de PCR de la expresión de los fragmentos de interés. Los carriles 1, 3 y 5, corresponden a las muestras tomadas de plantas de Chile 2, 5 y 8 días después de realizar la agroinfiltración con prbcS2::GFP, respectivamente. El carril 7 corresponde a la expresión de la construcción 35S::GFP después de 4 días de la infección. Como control endógeno, se utilizó el gen actina (ACT2).

VII. 6 Evaluación de la eficiencia de las construcciones

VII.6.1 Expresión de los fragmentos de interés

Para saber si los fragmentos de interés se estaban expresando y si realmente el sistema de agroinfiltración estaba funcionando, se realizó un ensayo por RT-PCR con tejido de las plantas agroinfiltradas con las construcciones 35S::TrAP-REn, 35S::Rep, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR.

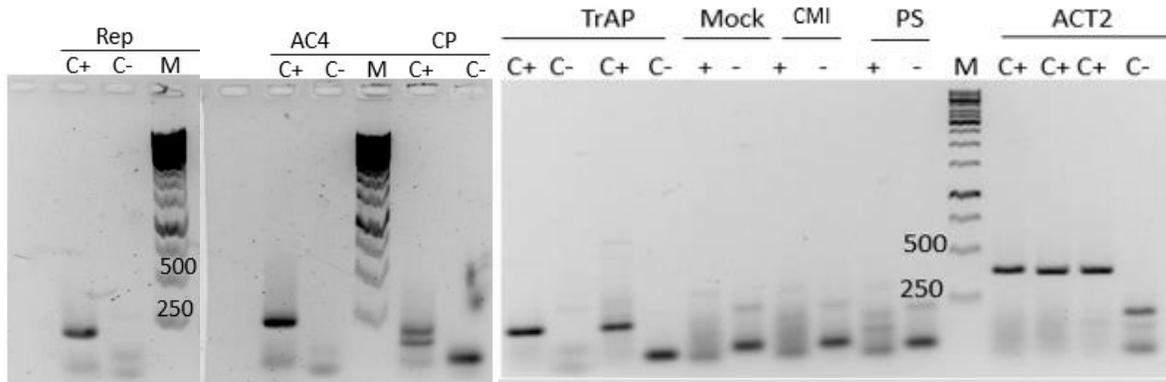


Figura 22. RT-PCR de fragmentos de interés. Cada una de las construcciones evaluadas con controles positivos y negativos, mock corresponde a la planta infiltrada con pFGC5941 vacío, CMI es la planta tratada solo con medio de infiltración, PS es la planta sana. Como control endógeno ACT2.

Se obtuvieron bandas alrededor de 250 pb en cada una de las muestras evaluadas, lo que confirma la expresión de los fragmentos de interés.

Para verificar que la amplificación corresponda solamente al cDNA sintetizado a partir del RNA total extraído, se realizó una segunda PCR tomando como templado de la reacción el RNA total directo. Para esta PCR se utilizaron oligonucleótidos que amplifican una región del promotor 35S, presente en las construcciones utilizadas, el directo 5'-GTTTATGTTTTAGTGTTTTCT-3' y el reverso 5'-TAAGATAAAACGTTGAATGTA-3.

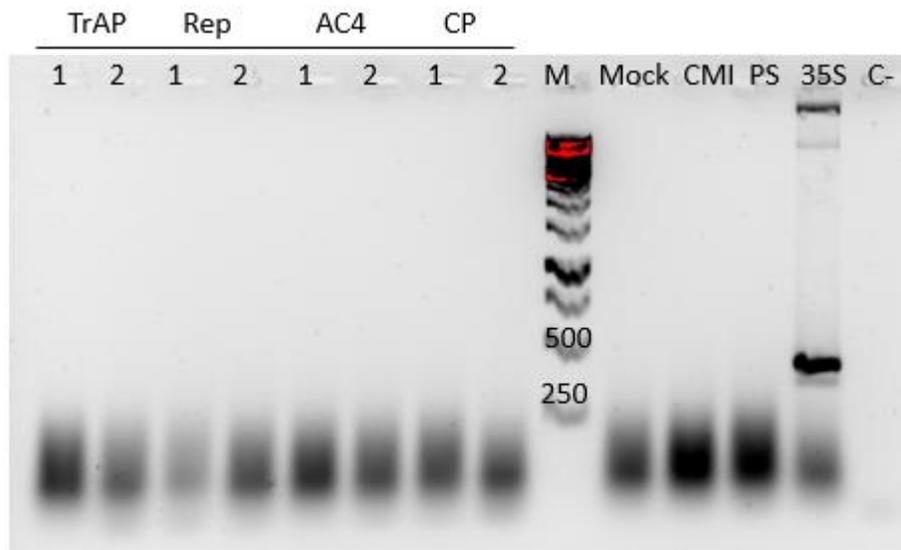


Figura 23. Prueba de amplificación de RNA total extraído. Los carriles del 1 al 8 muestran réplicas de cada fragmento de interés, mock corresponde a la planta infiltrada con pFGC5941 vacío, CMI es la planta tratada solo con medio de infiltración, PS es la planta sana.

En la figura no se observan bandas de amplificación en la PCR realizada, lo que indica que el RNA utilizado para la síntesis de cDNA, no contenía contaminación con DNA procedente de la misma infiltración.

Con base en los anteriores experimentos se comprobó que la expresión de los fragmentos TrAP-REn, Rep, CP-IR y AC4-IR se realizó de manera exitosa en los ensayos transitorios por el método de agroinfiltración.

VII.6.2 Expresión estable de las construcciones 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR en plantas de tabaco

Las plantas transgénicas de tabaco que contienen las construcciones 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR se obtuvieron en el laboratorio de transformación genética del Cinvestav por Rosa María Rangel. Para verificar que las líneas obtenidas contenían las construcciones se realizó extracción de DNA genómico y se amplificaron los fragmentos de interés por medio

de PCR con los oligos chsA-DIR 5'-GTTTATGTTTTAGTGTCTTCT-3' y AC4-DIR 5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCGAATGCTCCTCTCGTGAAACAC-3', para 35S::AC4-IR. En el caso de la detección de la construcción 35S::CP-IR, se utilizó el oligonucleótido CP-DIR 5'-GCTTAATTAAGGCGCGCCACATCCCGCCTGTCAAGTCTA-3' y el chsA-DIR como se indica en la figura 24.



Figura 24.- Mapa de la construcción 35S::AC4. En color morado se encuentran marcados los sitios correspondientes a los oligonucleótidos utilizados para realizar la detección del fragmento AC4-IR.

Para las construcciones 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR se evaluaron 14 y 7 líneas independientes, respectivamente. Se encontraron 9 líneas positivas para la construcción 35S::AC4-IR y 1 para 35S::CP-IR.

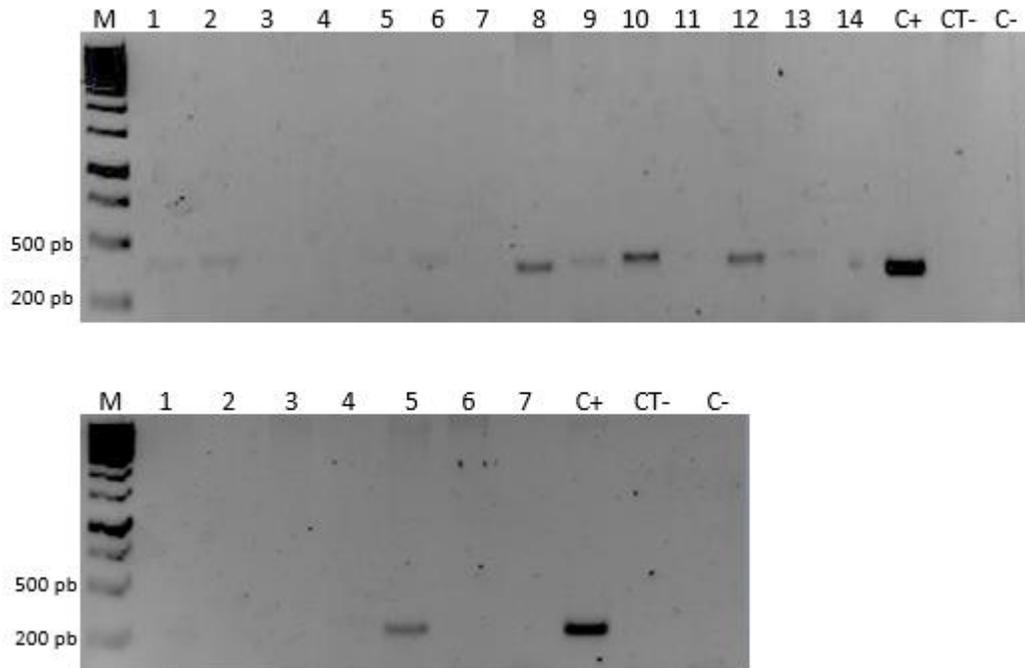


Figura 25. Análisis de PCR de las líneas transgénicas 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR. La parte superior corresponde a las líneas 35S::AC4-IR y la parte inferior a las líneas 35S::CP-IR. Los carriles muestran el número de la línea evaluada. C+ corresponde al control positivo, CT- corresponde a tejido de planta no transformada y C- es el control negativo con agua.

Actualmente las líneas seleccionadas se transfirieron a suelo para la obtención de progenie T₁ y T₂ para realizar los ensayos de infección y evaluar su resistencia frente a PepGMV.

VII. 7 Evaluación de la eficiencia de las construcciones sobre el proceso infectivo: Severidad de síntomas

El porcentaje de severidad de los síntomas inducidos en cada tratamiento con las diferentes construcciones evaluadas en ensayos transitorios fue comparado respecto al control positivo de la infección, plantas bombardeadas con PepGMV y el control negativo correspondiente (plantas sanas, no inoculadas con el virus). Los datos de severidad de síntomas fueron registrados de las 10 plantas por tratamiento evaluadas hasta el día 15 después de la inoculación del virus debido a que en el día 15 generalmente inicia el proceso de remisión de

síntomas. Igualmente se verificó que la severidad de éstos no aumentó después de ese periodo. La eficiencia de inoculación por bombardeo fue del 97.1%.

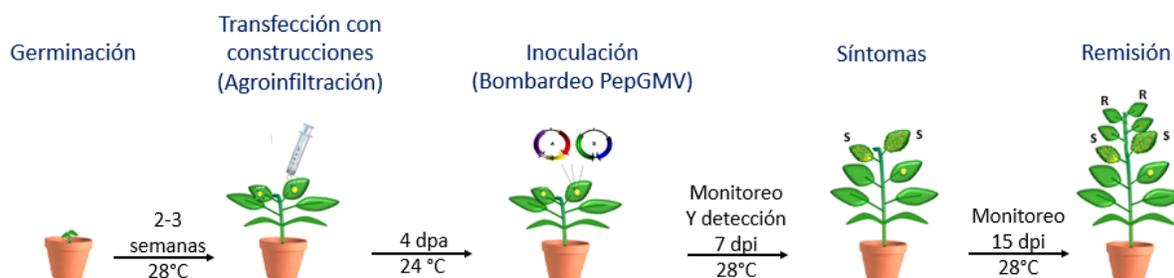


Figura 26.- Diagrama de proceso en ensayos transitorios para la evaluación de las construcciones sobre el proceso infeccioso.

En el gráfico de la figura 27 se puede observar el porcentaje de severidad de síntomas obtenidos con la fórmula del apartado VI.3. La línea de color verde correspondiente a las plantas sanas se mantiene constante sin síntomas, durante los 14 días después de realizar la inoculación en el resto de las plantas.

Por el contrario, las plantas bombardeadas con el virus, presentan un porcentaje de 95% al término de los días evaluados. Las plantas correspondientes a las construcciones 35S:CP-IR y 35S::TrAP-REn se comportan de manera similar teniendo un 90% y 82.5%, respectivamente. Siendo esta última la que presenta menos severidad en comparación a 35S::CP-IR. Si bien, el porcentaje de severidad de síntomas en estas plantas no fue igual que al control positivo de la infección, las diferencias no son significativas para aseverar que presentan resistencia a la infección.

Mientras que 35S:AC4-IR muestra un aumento similar a plantas inoculadas PepGMV al inicio de la infección, manteniendo un retraso en la severidad de los síntomas constante en los días siguientes hasta llegar a un 82.5% después de los 14 días.

Las plantas agroinfiltradas con la construcción 35S::Rep muestran un notable retraso en la aparición de síntomas severos hasta el día 13 después de la inoculación. Además se observó que el 50% de las plantas evaluadas no llegó a presentar sintomatología correspondiente al

valor 4 en la escala. Las variaciones en el tiempo de aparición y la severidad de los síntomas observados pueden estar influenciados por la eficiencia de agroinoculación debido al número de células que reciben el DNA, el estadio o tipo de célula que se infecta.

Para verificar que las diferencias obtenidas para esta construcción en comparación con el control positivo PepGMV, fueran significativas, se realizó una prueba no paramétrica Mann-Whitney ($P \leq 0.050$).

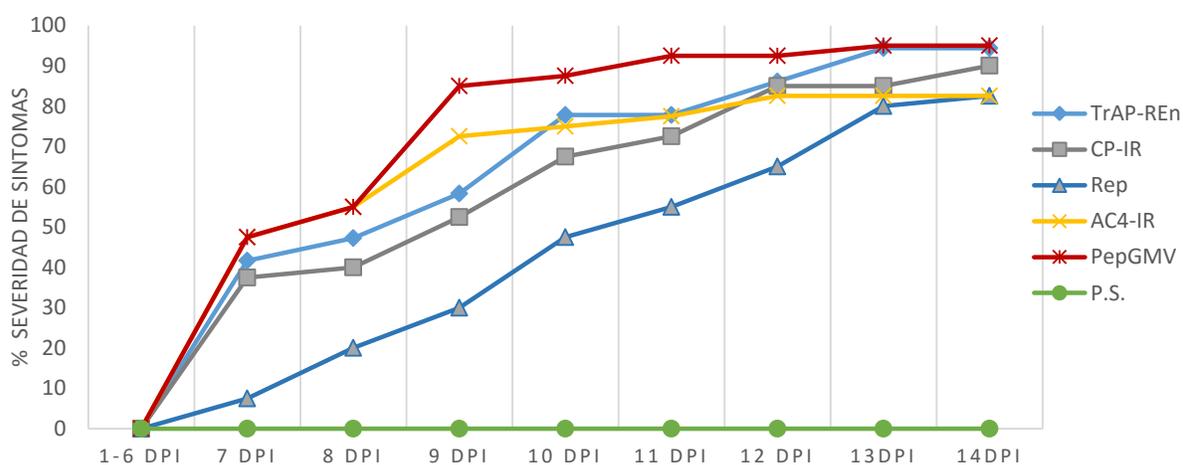


Figura 27.- Severidad de síntomas de plantas de chile. En el eje de las “x” están los días después de la infección con PepGMV y en el eje de las “y” se representa el porcentaje de severidad de síntomas de las construcciones evaluadas y sus controles.

En la figura 28 se muestran fenotipos de plantas de chile después de 10 días de la infección con PepGMV. En ellas se muestra la ausencia de síntomas en la planta sana, en comparación con la presencia de síntomas característicos de la infección en plantas que solamente fueron bombardeadas con PepGMV. Las hojas muestran enchinamiento, rugosidad y mosaicos en hojas inoculadas y sistémicas. Los controles de la infección con el virus, aquellas tratadas solo con medio de infiltración (CMI) y las infiltradas con *A. tumefaciens* con el vector PFGC4941 vacío (pFGC5941), muestran un patrón de severidad de síntomas muy similar a

PepGMV. Las plantas agroinfiltradas con las construcciones 35S::TrAP-REn, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR presentan síntomas similares al control de la infección.



Figura 28.- Plantas de chile después de 10 días de la infección con PepGMV. En la parte superior de la imagen se muestran los controles del experimento y en la parte inferior se encuentran imágenes de plantas de las construcciones evaluadas.

En cambio, las plantas agroinfiltradas con la construcción 35S::Rep, muestran una clara y marcada disminución en la severidad de síntomas. Las hojas de estas plantas presentan una leve presencia de mosaicos amarillos, apenas perceptibles. Además, en la figura 29, se puede observar la diferencia de tamaño de las plantas correspondientes a 35S::Rep en comparación con CMI y pFGC5941, después de 18 días de realizar el bombardeo con PepGMV.



Figura 29.- Fenotipo de plantas de chile después de 18 días de la infección con PepGMV. La fotografía muestra 10 plantas por tratamiento.

En las figuras 28 y 29, se puede observar el daño provocado en el ápice de hojas agroinfiltradas. Sin embargo, se ha reportado que el silenciamiento genético postranscripcional se propaga por la planta aun después que las hojas muestren senescencia (Voinnet & Baulcombe, 1997). Esto es corroborado con la detección del transcrito del transgen a los cuatro días después de realizar la agroinfiltración, cuando el ápice de las hojas inoculadas mostraba signos de senescencia.

Para evaluar si la infiltración de las plantas desencadena por si misma algún tipo de defensa contra la infección con PepGMV, se analizó la severidad de los síntomas de plantas de chile inoculadas solo con medio de infiltración (**figura 30**). Al inicio de la aparición de síntomas, estos parecen más leves durante los dos días subsecuentes, al término de los 14 días evaluados la severidad de los síntomas llega a un 95% de severidad igualando al control de la infección PepGMV.

Además, para verificar que ni *A. tumefaciens* ni el vector por sí mismo, indujeran algún tipo de respuesta en la planta que interviniera con la severidad de síntomas, se evaluaron plantas

agroinfiltradas con el plásmido pFGC5941 vacío (**Figura 30**). En este caso, la severidad de síntomas se iguala a la mostrada por el control positivo de la infección a partir del día 10 después de la inoculación, llegando a un 95% al término de 14 días.

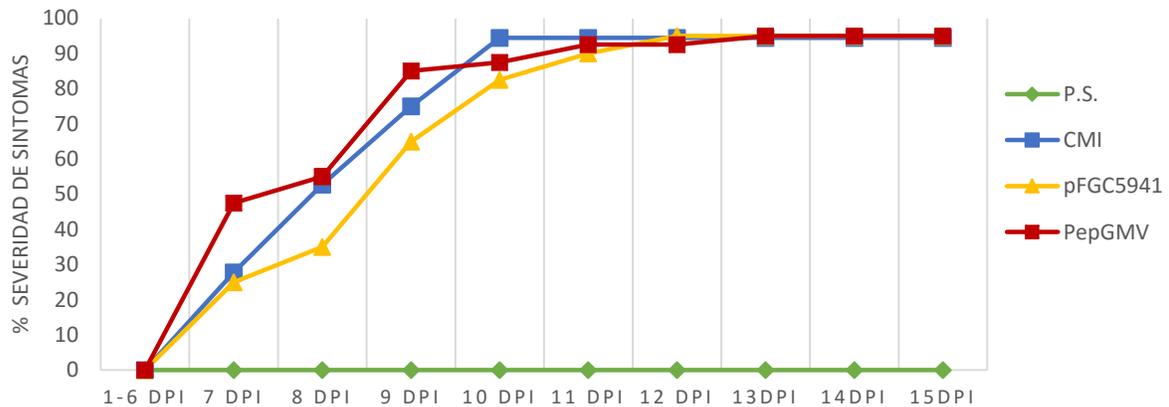


Figura 30.- Severidad de síntomas en controles de experimento. P.S. corresponde a la planta sana; CMI, plantas tratadas con medio de infiltración, pFGC5941 corresponde a las plantas agroinfiltradas con el vector vacío y PepGMV es el control de la infección (plantas infectadas con el virus PepGMV).

Lo observado en este análisis sugiere que en la infiltración, ni la bacteria *A. tumefaciens* ni el vector vacío pFGC5941 causan alteraciones en la severidad de los síntomas observados al inocular plantas de Chile con PepGMV. Por lo tanto se puede decir que las diferencias encontradas en cuanto a la severidad de los síntomas en los grupos evaluados se deben a las construcciones agroinfiltradas con los fragmentos seleccionados.

La remisión de síntomas se presenta después de los 15 días de realizarse la infección. Para determinar si las construcciones alteran de alguna manera la remisión, se cuantificó la cantidad de plantas por grupo que presentaban disminución en la severidad de síntomas en hojas nuevas (**Figura 31**). El control positivo de la infección PepGMV, muestra un 90% de

plantas en remisión a partir de los 15 dpi y un 100% después de 20 dpi. En contraste, los tratamientos 35S::CP-IR, 35S::TrAP-REn y 35S::AC4-IR presentan un 50-67 % al inicio, llegando a un 80-90% al término de los 20 días.

Este comportamiento concuerda con lo observado en la determinación de la severidad de síntomas, ya que las plantas que no alcanzaron un valor de 4 en escala de síntomas tardaron más en presentar hojas en remisión. Esto podría deberse a la cantidad de DNA viral en las plantas y la cantidad de RNA pequeños generados, debido a que se ha reportado que debe existir un umbral en la concentración de DNA viral para que la remisión se lleve a cabo. Esto sugiere que la carga viral en plantas con síntomas más leves podría ser menor que en aquellas con síntomas más severos, lo que impide llegar a los RNA pequeños a la concentración necesaria para desencadenar la remisión. Se ha reportado que plantas que presentan altos niveles de expresión de RNA transgénico presentan bajos niveles de resistencia. En cambio, plantas que acumulan bajos niveles de RNA transgénico, exhiben altos niveles de resistencia (Goldbach R. *et al.*, 2003).

Sin embargo, se ha visto también que pequeñas poblaciones de DNA viral son capaces de evadir respuestas de defensa de la planta, al fin de mantener la infección “atenuada” para la posterior diseminación de la enfermedad (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006).

El tratamiento con 35S::Rep mostró un retraso en la aparición de la remisión, al igual que un retraso en la aparición de los mismos síntomas. Se observó que plantas con síntomas de leves a moderados les tomo más tiempo llegar a remisión, y las plantas con síntomas más severos pudieron alcanzar la recuperación en poco tiempo. Es por eso, que se puede observar que el mismo número de plantas con valor 4 en la escala de síntomas alcanzó la remisión al término de los 20 días evaluados a diferencia del resto que permaneció con síntomas menos severos, pero sin hojas en remisión.

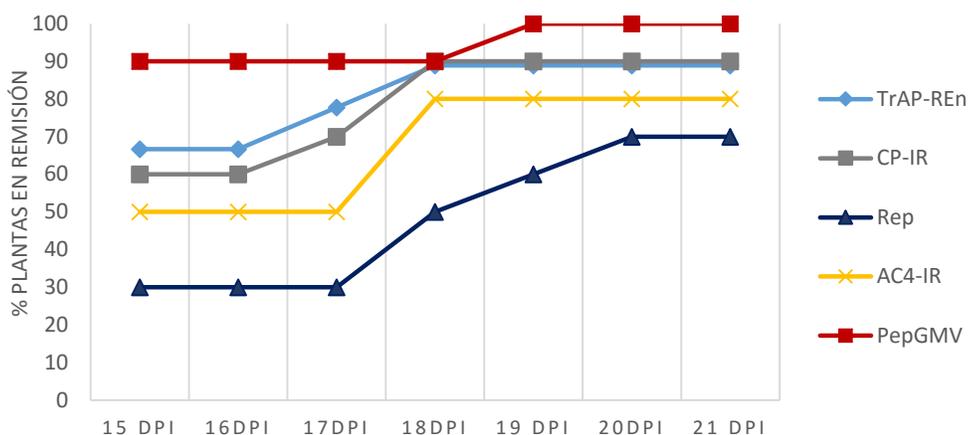


Figura 31.- Porcentaje de plantas en remisión por tratamiento. En el eje de las “x” se indica el día de conteo de plantas con hojas en remisión por tratamiento, y en el eje de la “y” muestra el porcentaje de plantas en remisión de un total de 10 plantas evaluadas por tratamiento.

VII. 8 Funcionalidad de las construcciones

Las variaciones observadas entre plantas de un mismo tratamiento se pueden deber a diversos factores como lo son: cantidad de células infectadas y el estadio de desarrollo de las hojas tratadas, entre otros.

La resistencia generada por la construcción 35S::Rep, la cual dirige la generación de RNA de doble cadena de la región correspondiente al gen Rep de PepGMV, podría estar dada por diversos mecanismos. Se han reportado plantas de tomate transformadas con una construcción que contiene 210 aminoácidos del gen Rep infectadas con *Virus del rizado amarillo del tomate Sardinia* (TYLCSV). En ellas se observó que al infectar plantas con el virus homólogo a la secuencia usada para la construcción, la resistencia se daba por la capacidad de Rep-210 de inhibir la transcripción del gen Rep, mientras que en el caso de la infección con el virus heterólogo, la resistencia se daba por la inhibición de la replicación (Lucioli A. *et al.*, 2003). Por lo tanto se puede decir que la resistencia obtenida por la expresión de un transgen en plantas infectadas con virus puede deberse a mecanismos

diferentes dependiendo del virus al que la planta se haya expuesto (Lucioli A. *et al.*, 2003). Además que la eficiencia del PTGS inducido por virus varía de acuerdo a características mismas del virus, así como también, de la interacción con la planta hospedera. (Chellappan P. *et al* 2004).

Por otra parte, reportes indican que en plantas de Chile inoculadas con PepGMV, no se detectaron siRNA en la hoja inoculada, mientras que en tejido en síntomas y remisión se detectaron de 21-22 y 24-25 nt (Carrillo-Tripp J. *et al.*, 2006). Lo que pudiera sugerir que la activación del mecanismo de silenciamiento por RNA necesita un umbral de concentración de DNA o RNA viral para desencadenarse. La concentración de RNA pequeños procedentes del gen Rep aumenta conforme avanza la remisión, lo que podría dar un indicio de lo que sucede al agroinfiltrar la construcción. Al generarse sRNA en estadios tempranos de la infección la severidad de los mismos síntomas se va retrasando ya que le podría “costar” más al virus llegar a la cantidad de carga viral para generar los síntomas característicos.

Además, el N-terminal del gen Rep posee parte de la región promotora que codifica para la proteína CP. Por lo que la resistencia observada podría estar asociada a silenciamiento génico transcripcional (TGS), debido a la represión de la transcripción del gen CP, cuya proteína está involucrada en el movimiento del virus y la infección sistémica (Fondong V. N., 2013). Esta característica de la proteína CP, podría explicar lo observado en las plantas resistentes 35S::Rep. A su vez, se ha visto que en *Begomovirus* bipartitas con mutaciones y reemplazos en CP, presentan síntomas atenuados y con retraso en la aparición de los mismos. Características que justamente se observaron en las plantas infiltradas con 35S::Rep evaluadas en este experimento.

Sin embargo, también se ha reportado que la infección sistémica puede no requerir de CP. Lo cual es el caso del *Virus huasteco del Chile* infectando Chile y *N. benthamiana* (Guevara-González R. G. *et al.*, 1999).

Por otro lado, la baja eficiencia de las construcciones 35S::TrAP-REn, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR puede deberse a una menor amplificación de la señal de silenciamiento generada por estas construcciones en comparación con la acumulación del RNA viral.

Las variaciones en la funcionalidad de las construcciones evaluadas para generar resistencia pueden variar de acuerdo a varios factores. Entre estos factores se encuentra la amplificación de la señal de silenciamiento. Se ha visto que el proceso de amplificación de la señal de silenciamiento es clave para la defensa antiviral, debido a que esta amplificación debe darse al mismo ritmo de la replicación y la acumulación del RNA viral (Schiebel, W. *et al.*, 1993; Tang G. *et al.*, 2002).

Otro factor importante que pudo afectar la eficiencia de las construcciones para generar algún tipo de resistencia en las plantas agroinfiltradas, puede estar relacionado con el movimiento de la señal de silenciamiento. El movimiento de la señal de silenciamiento generada pudo ser menos veloz que el movimiento del virus en la planta. De acuerdo a lo anteriormente mencionado, se podría sugerir que las construcciones pueden ser más eficientes en plantas transgénicas, en comparación a la expresión transitoria evaluada en este experimento. Lo que se esperaría en una planta transgénica es la expresión constante tejido específica en zonas que normalmente infecta el virus. Entonces, los niveles de RNA pequeños serían mayores y se encontrarían en zonas donde apenas se esté moviendo el virus. Esta ventaja ofrece la posibilidad de que la señal de defensa sea suficiente para desencadenar silenciamiento génico que pueda reflejarse en algún tipo de resistencia en las plantas transgénicas.

Aunado a esto, Noris y colaboradores reportan que hay un umbral de expresión/replicación de sRNA que proporciona resistencia. Por debajo de este umbral, el DNA viral se acumula en células infectadas inicialmente, el cual se puede esparcir sistémicamente al resto de la planta. De esta manera el virus es capaz de evadir la resistencia mediada por silenciamiento a nivel RNA (Noris E. *et al.*, 2004). Por lo anterior se podría tener como un factor adicional que influya la funcionalidad de las construcciones, al nivel de sRNA viral expresado, el cual podría encontrarse por debajo del umbral necesario para generar resistencia.

Los resultados observados sugieren que la construcción 35S::Rep es un buen candidato para generar líneas transgénicas que presenten disminución y retraso en la aparición de síntomas y en la severidad de los mismos.

VII. 9 Incidencia

Para evaluar si las plantas con la construcción 35S::Rep están infectadas con el virus PepGMV, se realizó PCR punto final con DNA extraído de tejido sintomático. Se obtuvieron bandas de aproximadamente 650 pb en cada una de las amplificaciones correspondientes al total de las plantas 35S::Rep. La incidencia obtenida de acuerdo a la fórmula del apartado VI.4 es del 100%.

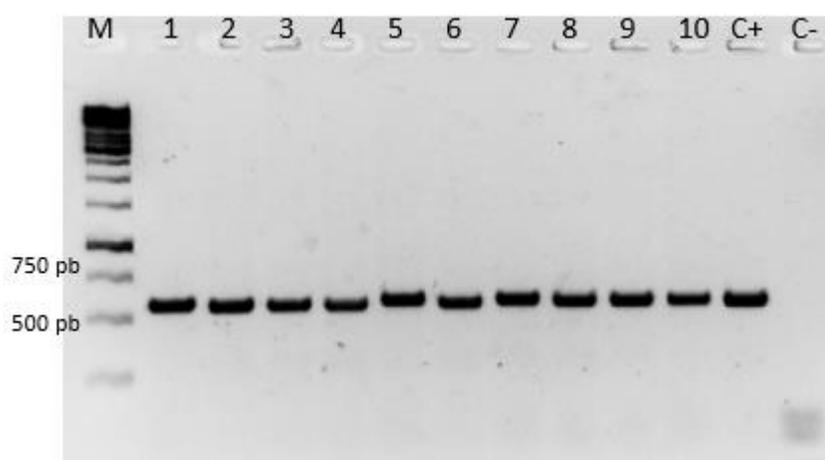


Figura 32.- Verificación de la presencia del virus en plantas 35S::Rep por PCR. Los carriles 1-10 corresponden a las 10 plantas analizadas 35S::Rep. C+ es el control positivo, plantas infectadas con PepGMV. C- corresponde a plantas sanas.

VIII. CONCLUSIONES

El mapeo de los RNA pequeños mostró variaciones en cuanto a la distribución, tamaño y cantidad de los sRNA de origen viral. La distribución de los sRNA encontrada podría deberse a la existencia de regiones que favorecen su formación en las secuencias analizadas, ya sea por la formación de estructuras secundarias o por los nucleótidos que componen la secuencia misma.

La presencia de picos de sRNA considerables en zonas específicas del genoma de PepGMV al infectar plantas de Chile, podría estar relacionado con la cantidad de transcrito generado en esta zona debido al requerimiento de TrAP para la expresión de los genes tardíos y su función como represor de silenciamiento.

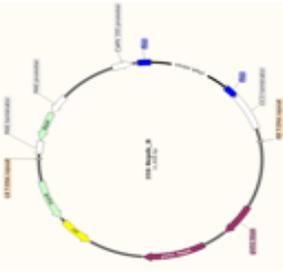
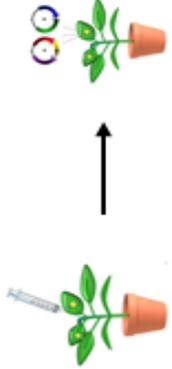
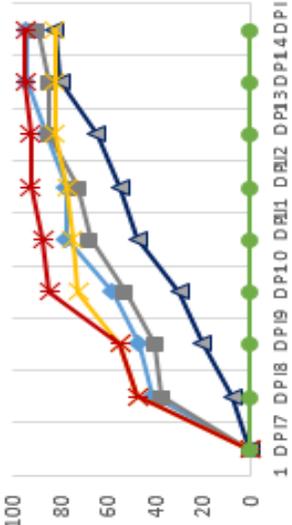
El análisis de los RNAs pequeños realizado muestra principalmente sRNA de 21-22 nt sugiriendo que el mecanismo que actúa como defensa de la planta es PTGS, lo que concuerda con lo reportado por Rodríguez Negrete y Carrillo Tripp.

En *A. thaliana*, las proteínas DCL24, DCL2 y DCL3 generan los RNA pequeños virales de 21, 22 y 24 nt (Ruiz-Ferrer V. *et al.*, 2009). De acuerdo a esto, las proteínas que mayormente podrían estar produciendo los sRNA encontrados son las proteínas DCL4 y DCL2. En cambio, DCL3 produce moléculas más largas (24 nt) las cuales fueron encontradas en menor número en este análisis, por lo que se podría sugerir que esta enzima presenta una actividad menor, principalmente 10 días después de la infección.

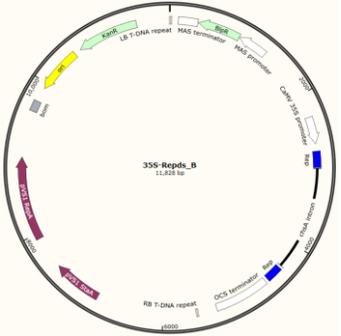
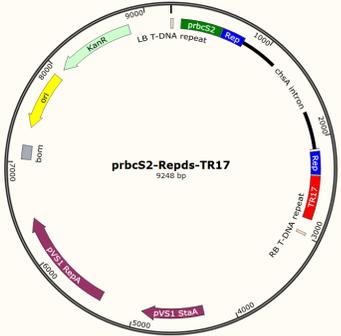
Las plantas agroinfiltradas con la construcción 35S::Rep presentaron retraso en la aparición de síntomas, así como también una disminución en la severidad de los mismos, a diferencia de las construcciones 35S::TrAP-REn, 35S::AC4-IR y 35S::CP-IR, las cuales no presentaron diferencias significativas en comparación con el control de la infección PepGMV. Los resultados observados sugieren que la construcción 35S::Rep es un buen candidato para generar líneas transgénicas que presenten disminución de la severidad de síntomas y retraso en la aparición de los mismos.

La funcionalidad de la construcción 35S::Rep podría estar dada a diferentes niveles. Para determinar lo que podría estar sucediendo de manera más concreta es necesario realizar más experimentos.

De acuerdo a lo observado en el presente trabajo podría decir que el mecanismo de silenciamiento por RNA es un proceso muy complejo que presenta infinidad de variantes cuando se evalúa en diversas interacciones planta-virus. Sin embargo, es posible obtener información general de utilidad para empezar a discernir lo que sucede durante estos procesos biológicos.

<p>Análisis de sRNA y selección de regiones candidatas</p> 	<p>Construcciones (Promotor 35S)</p> 	<p>Expresión transitoria (Promotor 35S)</p> 	<p>Expresión estable en tabaco</p> 																																																																																																																							
<p>Ensayos realizados</p>  <table border="1"> <caption>Approximate data from the transient expression graph</caption> <thead> <tr> <th>DPI</th> <th>DP19 (%)</th> <th>DP18 (%)</th> <th>DP17 (%)</th> <th>DP10 (%)</th> <th>DP13 (%)</th> <th>DP14 (%)</th> <th>DP1 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>6</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>7</td><td>0</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td><td>25</td></tr> <tr><td>8</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>9</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>10</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>11</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>12</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>13</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> <tr><td>14</td><td>0</td><td>85</td><td>75</td><td>65</td><td>55</td><td>45</td><td>35</td></tr> </tbody> </table>		DPI	DP19 (%)	DP18 (%)	DP17 (%)	DP10 (%)	DP13 (%)	DP14 (%)	DP1 (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	7	0	75	65	55	45	35	25	8	0	85	75	65	55	45	35	9	0	85	75	65	55	45	35	10	0	85	75	65	55	45	35	11	0	85	75	65	55	45	35	12	0	85	75	65	55	45	35	13	0	85	75	65	55	45	35	14	0	85	75	65	55	45	35	<p>Ensayos en proceso</p>
DPI	DP19 (%)	DP18 (%)	DP17 (%)	DP10 (%)	DP13 (%)	DP14 (%)	DP1 (%)																																																																																																																			
1	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
2	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
3	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
4	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
5	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
6	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																			
7	0	75	65	55	45	35	25																																																																																																																			
8	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
9	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
10	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
11	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
12	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
13	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			
14	0	85	75	65	55	45	35																																																																																																																			

Las construcciones realizadas se diseñaron buscando obtener un producto biotecnológico que cumpla con los lineamientos de bioseguridad, principalmente en cuanto a las características fenotípicas específicas para un organismo genéticamente modificado. Además de utilizar elementos que no se encuentren protegidos intelectualmente.

Elementos regulatorios	Construcciones A	Construcciones B
Promotor	<p>35S</p> <p>Promotor constitutivo fuerte del <i>Virus del mosaico de la coliflor</i></p>	<p>prbcS2</p> <p>Promotor de expresión específica de hoja de la ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa</p>
Terminador	<p>OCS</p> <p>Terminador de la octopina sintasa</p> 	<p>tRab17</p> <p>Terminador del gen de respuesta a ABA</p> 

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Bartel, D. P.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-297 (2004).
2. **Baum K., Wienand U., Meier I.** Reduction of G-box binding factor DNA binding activity, but not G-box binding factor abundance, causes the downregulation of RBCS2 expression during early tomato fruit development. *FEBS*. 454:95-99 (1999).
3. **Carrillo-Tripp J., Lozoya-Gloria E., Rivera-Bustamante R. F.** Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*. 97: 51-59 (2007).
4. **Chellappan P., Vanitharani & Fauquet C.** Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected host, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology*. 78: 7465-7477 (2004).
5. **Chellappan P., Vanitharani & Fauquet C.** MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *PNAS*. 102:10381-10386 (2005).
6. **Covey S. N., Al-Kaff N. S., Lángara A. Turner D. S.** Plants combat infection by gene silencing. *Nature*. 385: 781-782 (1997).
7. **Dalmay T., Hamilton S., Rudd S., Angell & Baulcombe D. C.** An RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by virus. *Cell*. 101:543-553 (2000).
8. **Dangl J. L. & Jones J. D. G.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411, 826-833 (2001).
9. **Fagard M. & Vaucheret H.** Systemic silencing signal. *Plant Molecular Biology*. 43: 285-293 (2000).
10. **Fondong V. N.** Geminivirus Protein structure and function. *Molecular Plant pathology*. 14:635-649 (2013).
11. **Guevara-González R. G., Ramos P. L. & Rivera-Bustamante R. F.** Complementation of coat protein mutants of Pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 89, 540-545 (1999).
12. **Goldbach R., Bucher E., Prins M.** Resistance mechanisms to plants viruses: an overview. *Virus Research*. 92:207-212 (2003).

13. **Góngora-Castillo E., Ibarra-Laclette E., Trejo-Saavedra D. & Rivera-Bustamante R.** Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology Journal*, 9:295 (2012).
14. **Hanley-Bowdoin L., Settlege S., Orozco B., Nagar S. & Robertson D.** Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18:1, 71-106 (2010).
15. **Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C.** A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*. 286:950-952 (1999).
16. **Helliwell C. A. & Waterhouse P. M.** Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods in enzymology*. 392:24-35 (2005).
17. **Hull R.** *Plan Virology*. Academic Press, London, p.p. 1001.
18. **Ruiz-Ferrer V & Voinnet O.** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology.*, 60:485-510 (2009).
19. **Ruiz T. M., Voinnet O. & Baulcombe D. C.** Initiation and Maintenance of Virus-Induced gene Silencing. *The Plant cell*. 10: 937-946 (1998).
20. **Jones-Rhoades M. W., Bartel D., Bartel B.** MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:19-53 (2006).
21. **Laufs J., Traut W., Heyraud F., Matzeit V., Rogers S.G., Schell J., Gronenborn B.** In vitro cleavage and ligation at the viral origin of replication by the replication protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 92:3879-3883 (1995).
22. **Liu J., Zhand X., Zhang F., Hong N., Wang G., Wang A. y Wang L.** Identification and characterization of microRNAs from in vitro-grown pear shoots infected with Apple stem grooving virus in response to high temperatura using small RNA sequencing. *BCM Genomics*. 16:945 (2015).
23. **Lucioli A., Noris E., Brunetti A., Tavazza R., Ruzza V., Castillo A., Bejarano E. R., Accotto G. P., Tavazza M.** *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* Rep-Derived Resistance to Homologous and Heterologous Geminiviruses Occurs by Different Mechanisms and Is Overcome if Virus-Mediated Transgene Silencing Is Activated. *J. Virol.* 77:6785-6798 (2003).

24. **Manzara T., Gruissem W.** Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynthesis Research*. 16: 117-139 (1988).
25. **Meier I., Callan L., Fleming A. & Gruissem W.** Organ-Specific Differential regulation of a Promoter Subfamily for the Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Small Subunit Genes in Tomato. *Plan Physiol*. 107:1105-1118 (1995).
26. **Méndez-Lozano J., Torres-Pacheco I., Fauquet C. M. & Rivera-Bustamante R. F.** Interactions Between Geminiviruses in a Naturally Occurring Mixture: Pepper huasteco virus and pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* Vol. 93, No. 3 (2003).
27. **Molnar A., Melnyk C. W., Bassett A., Hardcastle, Dunn R., Baulcombe D. C.** Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*. 328:872 (2010).
28. **Noris E., Lucioli., R. Tavazza P., Caciagli P., Accotto P., Tavazza M.** Tomato yellow leaf curl Sardinia virus can overcome transgene-mediated RNA silencing of two essential viral genes. *J. Gen Virol*. 85:1745-1749 (2004).
29. **Ogwok E., Iyas M., Alicai T., Rey M., Taylor N. J.** Comparative analysis of virus-derived small RNAs within cassava (*Manihot esculenta Crantz*) infected with cassava Brown streak virus. *Virus Reseach*. 1-11 (2016).
30. **Papp, I. Mette M. F., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S. E., Ray A., Van der Winden J., Matzke M., Matzke A.** Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*. 132: 1382-1390 (2003).
31. **Pilartz M., Jeske H.** Abutilon mosaic virus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* 189: 800-802 (1992).
32. **Pilartz M., Jeske H.** Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *J. Virol*. 77:10808-10818 (2003).
33. **Pooggin M. M.** How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci*. 14:15233-15259 (2013).

34. **Raja P., Wolf J. & Bisaro D.** RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799:337-351 (2010).
35. **Ramesh S. V., Mishra A. K. & Praveen S.** Hairpin RNA-mediated strategies for silencing of Tomato leaf curl virus AC1 and AC4 genes for effective resistance in plants. *Oligonucleotides*. 17:251-257 (2007).
36. **Ribeiro S. G., Lohuis H., Goldbach & Prins M.** Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *Journal of Virology*. 81: 1563-1573 (2007).
37. **Rodríguez-Negrete E., Carrillo-Tripp J., Rivera-Bustamante R.** RNA Silencing against Geminivirus: Complementary Action of Posttranscriptional gene Silencing and Transcriptional Gene Silencing in Host recovery. *Journal of Virology*. 1332-1340 (2009).
38. **Schiebel W., Hass B., Marinkovic S., Klanner A. & Sanger H. L.** RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J. Biol. Chem.* 268: 11858-11867 (1993).
39. **Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P. & Zamore, P. D.** A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 17:49-63 (2002).
40. **Theodore M. K., Fromm M., Weissinger A., Tomes D., Schaaf S., Sletten M. & Sanford J. C.** Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Pro Natl Acad Sci.* 85:4305-4309 (1988).
41. **Trinks D., Rajeswaran R., Shivaprasad, Akbergenov R., Oakeley E., Veluthambi K., Hohn T. & Pooggin M.** Suppression of RNA silencing by a Geminivirus protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.*, 79:2517-2527 (2005).
42. **Vanderschuren H., Akbergenov R., Pooggin M. M., Hohn T., Gruissem W., Zhang.** RNA-mediated resistance to cassava geminiviruses in transgenic cassava host genes. *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. pp 201-203.

43. **Vanitharani R., Chellappan P., Fauquet C.** Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 78:9487-9498 (2004).
44. **Varsani A., Navas-Castillo J., Moriones E., Hernández-Zepeda A., Brown J., Zerbini M. & Martin D.** Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Virology Division News.* (2014).
45. **Vilardell J., Goday A., Freire M. A., Torrent M., Martinez C., Torné J & Pagés M.** Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of Rab-17 in maize. *Plant molecular biology.* 14: 423-432 (1990).
46. **Voinnet O. & Baulcombe D. C.** Systemic signalling in gene silencing. *Nature.* 389:553 (1997).
47. **Voinnet O., Lederer C. & Baulcombe D.C.** A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell.* 103:157-167 (2000).
48. **Wanner L. A., Gruissem W.** Expression dynamics of tomato *rbcS* gene family during development. *The Plant cell.* 3: 1289-1303 (1991).
49. **Wingard S. A.** Host and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J. Agric, Res.* 37:127-153 (1928).
50. **Xie Z., Johansen A., Gustafson K., Kasschau A., Lellis A., Zilberman S., Jacobsen J., Carrington.** Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLOS Biol.* 2 (2004).
51. **Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki Kazuo.** A Novel cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature. Or High-Salt Stress. *The Plant Cell.* 6:251-264 (1994).
52. **Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R., Chen X.** Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science.* 3017:932-935 (2005).
53. **Zilberman D., Cao X. & Jacobsen S.E.** ARGONAUTE4 control of locus specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science.* 299: 716-719 (2003).