



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Análisis del movimiento de los componentes genómicos
del Virus del mosaico de la alfalfa (AMV) en *Nicotiana
benthamiana* en ausencia de replicación viral”**

TESIS

Que presenta

MIGUEL ÁNGEL VICTORINO DOMÍNGUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de tesis: **Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle
Cázares**

Asesores: **Dr. Roberto Ruiz Medrano
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara**

Ciudad de México

Noviembre, 2024

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares y el Dr. Roberto Ruiz Medrano, y la asesoría de la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara.

De igual forma, parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular de Plantas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia con el apoyo del Dr. Vicente Pallás Benet y el Dr. Jesús Ángel Sánchez Navarro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano y a la Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares por permitirme trabajar dentro de su equipo de trabajo y por su valiosa guía durante el desarrollo de este proyecto. Su entusiasmo y dedicación a la investigación me han motivado a dar mi mayor esfuerzo.

Al Dr. Vicente Pallás Benet y al Dr. Jesús Ángel Sánchez Navarro por su cálido recibimiento durante la estancia de investigación en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, y por su gran ayuda en el desarrollo del presente trabajo. Espero poder volver a encontrarnos.

A la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández y al M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz por su ayuda técnica y orientación brindada durante mi estancia en el laboratorio. Los admiro y aprecio.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por formar parte de mi comité tutorial y por su valiosa orientación durante mi estancia de maestría.

A mi familia por apoyarme siempre en mis proyectos personales y por enseñarme a dar siempre lo mejor de mí. Los quiero mucho.

A mis amigos del Cinvestav por los buenos momentos que pasamos juntos y por haber hecho de mi estancia en el laboratorio una grata experiencia.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada (no. de registro 1182991) para la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Virus: Definición y clasificación	9
1.2 Virus de plantas	10
1.3 Infección viral en plantas	11
1.3.1 Ciclo de infección y replicación viral	12
1.3.1.1 Replicación de virus de RNA	13
1.3.2 Movimiento viral	15
1.3.2.1 Movimiento célula a célula	15
1.3.2.2 Movimiento sistémico	16
1.3.3 Mecanismos de defensa en plantas contra infecciones virales	18
1.3.3.1 Respuesta hipersensible (HR)	19
1.3.3.2 Resistencia sistémica adquirida (SAR)	20
1.3.3.3 Silenciamiento génico	20
1.4 Clones infecciosos virales	22
1.4.1 Transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
1.5 Virus del mosaico de la alfalfa (AMV)	24
1.5.1 Estructura genómica de AMV	24
1.5.2 Ciclo de infección de AMV	25
1.5.3 Movimiento de AMV	27
2. ANTECEDENTES	29
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Cepas virales	37
6.2 Construcción de clones infecciosos de AMV	37
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos para la técnica de Stem-loop RACE	37
6.2.2 Amplificación y secuenciación de extremos 5' y 3' de los componentes genómicos de AMV por la técnica de Stem-loop RACE	38
6.2.3 Amplificación de los componentes genómicos de AMV completos y clonación en el vector binario pLX-B2	40
6.2.4 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α con clones infecciosos de AMV y corroboración por PCR de colonia	42

6.2.5	Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> C58 con clones infecciosos de AMV	43
6.3	Ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de <i>N. benthamiana</i>	43
6.3.1	Cultivo en medio líquido de células transformantes de <i>A. tumefaciens</i> C58 y resuspensión en medio de infiltración	44
6.3.2	Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> con clones infecciosos de AMV	44
6.3.3	Extracción de RNA total de hojas de <i>N. benthamiana</i>	45
6.3.4	Síntesis de cDNA a partir de RNA total de hoja	45
6.3.5	Detección de componentes genómicos de AMV por PCR	46
6.3.6	Síntesis de sondas de RNA para hibridaciones moleculares tipo Dot blot y Northern blot	47
6.3.7	Detección de componentes genómicos de AMV por hibridaciones moleculares tipo Dot blot	49
6.3.8	Detección de componentes genómicos de AMV por hibridaciones moleculares tipo Northern blot	51
6.4	Caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa	52
6.4.1	Secuenciación de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa	52
6.4.2	Identificación de dominios conservados en componentes genómicos de AMV-Alfalfa	53
6.4.2.1	Alineamiento de secuencias 5'UTR y 3'UTR de AMV	53
6.4.2.2	Análisis de estructuras secundarias de regiones 3'UTR de AMV	53
6.4.3	Identificación de dominios conservados en proteínas de AMV-Alfalfa	54
6.5	Construcción de clones infecciosos híbridos del RNA2 de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis	54
6.5.1	Diseño de oligonucleótidos para la construcción de clones infecciosos híbridos	54
6.5.2	Amplificación y clonación de las secuencias híbridas en el vector binario pLX-B2	55
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.1	Construcción de clones infecciosos de AMV	56
7.1.1	Alineamiento de secuencias reportadas de los componentes genómicos de AMV para el diseño de oligonucleótidos para la técnica de Stem-loop RACE	56
7.1.2	Amplificación y secuenciación de los extremos 5' y 3' de los componentes genómicos del aislado AMV-Alfalfa	58
7.1.3	Amplificación y clonación en el vector binario pLX-B2 de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa	59
7.1.4	Análisis de células transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α por PCR de colonia	60
7.2	Caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa	61
7.2.1	Secuenciación de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa	61

7.2.2	Identificación de dominios conservados en componentes genómicos de AMV-Alfalfa	62
7.2.2.1	Análisis de estructuras secundarias de regiones 3'UTR de AMV	65
7.2.3	Identificación de dominios conservados en proteínas de AMV-Alfalfa	69
7.3	Ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de <i>N. benthamiana</i>	72
7.3.1	Ensayo 1: Evaluación de funcionalidad de clones infecciosos de AMV-Alfalfa	72
7.3.1.1	Detección por hibridación molecular tipo Dot blot y Northern blot de los componentes genómicos de AMV en plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con distintas combinaciones de clones infecciosos	72
7.3.2	Ensayo 2: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV en ausencia de replicación viral	76
7.3.2.1	Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas (en ausencia de replicación viral)	76
7.3.2.2	Evaluación sintomática de plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con clones infecciosos de AMV (en ausencia de replicación viral)	79
7.3.3	Ensayo 3: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV co-inoculados en distintas hojas	80
7.3.3.1	Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas agroinfiltradas (en co-inoculación de distintas hojas)	80
7.3.3.2	Evaluación sintomática de plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con clones infecciosos de AMV (en co-inoculación de distintas hojas)	84
7.3.4	Ensayo 4: Estudio de la acumulación diferencial del RNA2 de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis	85
7.3.4.1	Amplificación y clonación de las construcciones híbridas del RNA2 en el vector binario pLX-B2	85
7.3.4.2	Evaluación sintomática de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con clones infecciosos híbridos del RNA2 de AMV	86
8.	CONCLUSIONES	88
9.	PERSPECTIVAS	90
10.	BIBLIOGRAFÍA	91
11.	ANEXOS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de infección de virus de RNA de plantas	13
Figura 2. Rutas de movimiento célula a célula y movimiento sistémico que siguen los virus en una infección sistémica de plantas	18
Figura 3. Mecanismo de transferencia de T-DNA de <i>A. tumefaciens</i> hacia una célula vegetal	23
Figura 4. Estructura genómica de AMV (aislado 425)	25
Figura 5. Ciclo de infección de AMV. A) Entrada, replicación y salida de AMV en una célula vegetal; B) Modelo de traducción de los RNAs de AMV	27
Figura 6. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV-Leonotis y AMV-Capsicum en hojas locales y sistémicas de distintas plantas infectadas	30
Figura 7. Detección por Northern blot de los componentes genómicos de AMV-Leonotis en hojas locales de jitomate Flora Dade infectado	31
Figura 8. Estructura secundaria de la región 5' UTR de un RNA3 de AMV obtenido por evolución compensatoria	32
Figura 9. Reconstitución de la replicación de los RNAs de BMV en plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas	33
Figura 10. Examinación de los efectos de la proteína MP de BMV en el transporte del RNA1 y RNA2	34
Figura 11. Procedimiento de Stem-loop RACE para la secuenciación de los extremos 5' UTR y 3' UTR de los RNAs de AMV	38
Figura 12. Procedimiento de ligación de RNAs completos de AMV en el vector binario	41
Figura 13. Construcciones de vector binario pLX-B2 con los componentes genómicos de AMV	42
Figura 14. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los RNAs de AMV-Alfalfa	47
Figura 15. Construcciones de vector pDrive con secuencias de los componentes genómicos de AMV para la síntesis de sondas de RNA marcadas con Dig-11-UTP	49
Figura 16. Sistema de transferencia de RNA para Northern blot	52
Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para la construcción de los RNAs híbridos de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis	55
Figura 18. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA1 de distintos aislados de AMV	56
Figura 19. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA1 de distintos aislados de AMV	57
Figura 20. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA2 de distintos aislados de AMV	57
Figura 21. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA2 de distintos aislados de AMV	57
Figura 22. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA3 de distintos aislados de AMV	57
Figura 23. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA3 de distintos aislados de AMV	58

Figura 24. Perfil electroforético de los productos de PCR de los extremos 5' y 3' de cada componente genómico de AMV-Alfalfa	58
Figura 25. Secuencias de los extremos 5' y 3' de cada componente genómico de AMV-Alfalfa	59
Figura 26. Perfil electroforético de los productos de PCR de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa	60
Figura 27. Perfil electroforético de los productos de PCR de colonia de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa en células transformantes de <i>E. coli</i> DH5α	61
Figura 28. Alineamientos de los extremos 5' del RNA1 de distintos aislados de AMV	63
Figura 29. Alineamientos de los extremos 3' del RNA1 de distintos aislados de AMV	63
Figura 30. Alineamientos de los extremos 5' del RNA2 de distintos aislados de AMV	63
Figura 31. Alineamientos de los extremos 3' del RN2 de distintos aislados de AMV	64
Figura 32. Alineamientos de los extremos 5' del RNA3 de distintos aislados de AMV	64
Figura 33. Alineamientos de los extremos 3' del RN3 de distintos aislados de AMV	64
Figura 34. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA1 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa	65
Figura 35. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA2 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa	66
Figura 36. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA3 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa	67
Figura 37. Identificación de los motivos conservados del dominio MT de la proteína P1 de AMV-Alfalfa	69
Figura 38. Identificación de los motivos conservados del dominio HEL de la proteína P1 de AMV-Alfalfa	70
Figura 39. Identificación del domidio GDD de la proteína P2 de AMV-Alfalfa	70
Figura 40. Identificación de los dominios conservados de las proteínas MP y CP de AMV-Alfalfa	71
Figura 41. Evaluación de funcionalidad de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa en distintas combinaciones	74
Figura 42. Amplificación de la secuencia completa del RNA2 de las plantas 6 y 8	74
Figura 43. Evaluación de funcionalidad de distintos clones infecciosos del RNA1 de AMV-Alfalfa y prueba de sonda específica para RNA2 de AMV-Alfalfa	75
Figura 44. Detección por PCR del RNA1 de AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral)	76
Figura 45. Detección por PCR del RNA2-4270 de AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral)	78

Figura 46. Detección por PCR del RNA3 de AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral)	79
Figura 47. Síntomas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con clones infecciosos individuales de AMV tras 6 dpi (en ausencia de replicación viral)	80
Figura 48. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas tras 6 dpi (co-inoculación en distintas hojas)	81
Figura 49. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas tras 10 dpi (co-inoculación en distintas hojas)	82
Figura 50. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas tras 6 dpi (co-inoculación de RNA1 y RNA2 en una misma hoja, y RNA3 en una hoja distinta)	83
Figura 51. Síntomas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con clones infecciosos en co-inoculación	84
Figura 52. Amplificación de las regiones 5'UTR-ORF y 3'UTR de los aislados de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis para la construcción de los RNA2 híbridos	85
Figura 53. Síntomas de plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con clones infecciosos híbridos del RNA2 (Cada planta fue agroinfiltrada con una mezcla del RNA1 AMV-Arabidopsis, RNA3 AMV-Alfalfa y el respectivo RNA2)	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los extremos 5' y 3' de los RNAs de AMV-Alfalfa por la técnica de Stem-loop RACE	40
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los RNAs de AMV-Alfalfa completos	41
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los RNAs de AMV-Alfalfa	46
Tabla 4. Longitud de regiones importantes de los componentes genómicos de AMV-Alfalfa	62

RESUMEN

El movimiento de virus en plantas es un proceso complejo en el que participan componentes del virus y componentes propios del hospedero para establecer una infección sistémica. Para esto, los componentes del virus deben moverse entre tejidos cercanos (movimiento de célula a célula) hasta alcanzar el tejido vascular donde pueden moverse hacia tejidos distantes (movimiento sistémico) para infectar nuevas células. Dependiendo de la especie del virus y del hospedero en cuestión, los mecanismos de movimiento pueden variar, estableciendo un mecanismo de interacción específico y que define el rango de infección del virus.

El Virus del mosaico de la alfalfa es un virus de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva que cuenta con tres RNAs genómicos (RNA1, RNA2 y RNA3) y un cuarto RNA subgenómico (RNA4), a partir de los cuales puede sintetizar sus proteínas virales (P1, P2, MP y CP, respectivamente). En trabajos recientes, se ha demostrado la capacidad del movimiento sistémico de los RNAs de AMV sin la participación de MP y CP, lo cual representa un nuevo hallazgo en el entendimiento del movimiento de AMV.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV en *N. benthamiana* en ausencia de replicación viral, encontrando que el RNA1 y RNA2 pueden moverse a larga distancia, mientras que el RNA 3 no posee esta capacidad. Cuando los RNAs de AMV son co-inoculados en distintas hojas, el movimiento del RNA1 y RNA2 permite el establecimiento de una infección sistémica.

Adicionalmente, se realizó la caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa para estudiar la diferencia de infectividad y la diferencia de acumulación del RNA2 entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis. Las posibles causas son analizadas y discutidas.

ABSTRACT

Virus movement in plants is a complex process in which viral components and host components are involved in order to set a systemic infection. For this purpose, the viral components need to move across adjacent tissues (cell-to-cell movement) until the vascular tissue is reached and they can move toward distant tissues (systemic movement) for the infection of new cells. Depending on the virus and host species, the movement mechanisms can be variable, establishing a specific mechanism of interaction which defines the host-range of infection of the virus.

Alfalfa mosaic virus (AMV) is a plus-single-strand RNA virus that possesses three genomic RNAs (RNA1, RNA2 and RNA3) and a fourth subgenomic RNA (RNA4) from which the viral proteins are synthesized (P1, P2, MP and CP, respectively). In recent publications, it has been reported the capacity of systemic movement of AMV RNAs without the interaction with MP and CP which represents a new discovery in the understanding of AMV movement.

In the present work, the replication-independent systemic movement of the genomic components of AMV was evaluated in *N. benthamiana* plants. It was found that RNA1 and RNA2 are able to move long distances whilst RNA3 is unable to. When co-inoculation of the three AMV RNAs was tested in different leaves, the transportation of RNA1 and RNA2 allowed the onset of a systemic infection.

Furthermore, molecular characterization of AMV-Alfalfa strain was performed to study the infectivity and accumulation difference of RNA2 between AMV-Alfalfa and AMV-Arabidopsis strains. The possible causes of these observations are analyzed and discussed.

INTRODUCCIÓN

1.1 Virus: Definición y clasificación

Los virus son entes biológicos capaces de infectar células de organismos vivos y utilizar su maquinaria celular para producir un mayor número de copias de sí mismo en un proceso llamado replicación viral. Estos poseen un genoma, ya sea de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA), una cápside de naturaleza proteica y, en algunos casos, lípidos asociados a la cápside que conforman una envoltura (Marintcheva, 2018). Cada elemento del virus le aporta alguna ventaja o capacidad para la integración a su célula hospedera, replicación intracelular y posterior diseminación hacia otras células (Modrow et al., 2013).

En el genoma viral se encuentra tan sólo una parte de la información que necesita el virus para su funcionamiento. Esta deficiencia se ve complementada por algunos elementos propios de la célula hospedera que permiten al virus realizar acciones que por sí solo no podría, por lo cual se considera que los virus son parásitos intracelulares obligados. La complejidad de los mecanismos celulares empleados por el virus puede depender de diversos factores como la especie hospedera, elementos abióticos y la complejidad misma del genoma viral (Raoult y Forterre, 2008).

Los virus pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura genómica y la forma de transmitir su información. En 1971, David Baltimore propuso un sistema de clasificación para los virus y establece que existen 7 categorías que se pueden distinguir por la forma en que sintetizan RNAm (Baltimore, 1971). Estas 7 categorías son: virus de DNA de doble cadena (Grupo I); virus de DNA de cadena sencilla (Grupo II); virus de RNA de doble cadena (Grupo III); virus de RNA de cadena sencilla positiva (Grupo IV); virus de RNA de cadena sencilla negativa (Grupo V); virus de RNA de cadena sencilla positiva con intermediarios de DNA

(retrovirus) (Grupo VI); y retrovirus de DNA de doble cadena (Grupo VII) (Mahmoudabadi & Phillips, 2008).

1.2 Virus de plantas

El primer virus de plantas descubierto fue el virus del mosaico del tabaco (TMV), el cual fue reportado a finales del siglo XIX por Martinus Beijerinck en Holanda y por Dmitrii Iwanowski en Rusia, como un agente infeccioso submicroscópico en plantas de tabaco (Scholthof, 2001). Esto, a su vez, representó el descubrimiento de los virus como agentes infecciosos causantes de enfermedades en cultivos de interés agrícola y pavimentó el camino para el descubrimiento y estudio de nuevas especies virales. De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), hasta la fecha se han reportado más de 2000 especies de virus de plantas de los cuales más de 1000 especies pueden infectar cultivos de importancia económica (Sharma, 2023).

Los virus de plantas almacenan su genoma en forma de DNA de cadena sencilla (ssDNA) o DNA de cadena doble (dsDNA), RNA de doble cadena (dsRNA) y, en su mayoría, RNA de cadena sencilla (ssRNA). De los virus de RNA de cadena sencilla, aquellos con polaridad positiva son los que más abundan, aunque también existen con polaridad negativa. A su vez, los genomas de virus de plantas pueden ser monopartitos (una sola partícula viral almacena el genoma), multipartitos (distintos componentes genómicos están empaquetados en distintas partículas virales) o segmentados (distintos componentes genómicos empaquetados en una sola partícula viral) (Suman et al., 2023). Esta diversidad en las especies de virus de plantas los convierte en patógenos versátiles en términos de rango de hospederos, patogénesis, vía y eficiencia de transmisión, y dinámica evolutiva.

1.3 Infección viral en plantas

A diferencia de los virus que infectan especies animales, los virus de plantas raramente son transmitidos por contacto directo entre un individuo infectado y uno sano. En cambio, existen dos mecanismos principales transmisión: transmisión vertical a través de polen y semillas; y transmisión horizontal mediada por vectores (Sacristán et al., 2011). Entre estos dos mecanismos, la transmisión mediada por vectores parece ser el mecanismo de infección más común presente en plantas y es, por lo tanto, objeto principal de estudio como modelo de transmisión de virus en plantas (Lefeuvre et al., 2019).

Entre los vectores de transmisión de virus de plantas se encuentran los insectos, arácnidos, hongos, nemátodos y algunos protistas, siendo los insectos los principales vectores de transmisión. El orden de los hemípteros puede transmitir más del 70% de los virus de plantas conocidos y se caracterizan por ser insectos chupadores de savia como los áfidos, las chinches de campo y la mosca blanca (Tamborindeguy et al., 2023).

La transmisión viral puede clasificarse en cuatro mecanismos dependiendo de la localización y persistencia del patógeno dentro del vector, así como la capacidad del virus de replicarse dentro del vector. Por un lado, las transmisiones no persistente y semipersistente se caracterizan por un corto periodo de tiempo estando el virus dentro del aparato bucal o el tracto digestivo superior del insecto, además de la ausencia de replicación dentro del vector; y, por otro lado, en las transmisiones circulativa persistente y propagativa persistente, el virus es capaz de entrar y circular a través del cuerpo del insecto. En el caso de la transmisión propagativa persistente, el virus es capaz de replicarse usando al vector como hospedero (Ng & Falk, 2006).

1.3.1 Ciclo de infección y replicación viral

Para que el ciclo de infección del virus pueda iniciar, el virus debe ingresar al tejido vegetal a través de una lesión o por medio de un vector de transmisión. Regularmente, el ciclo de transmisión de virus mediado por vectores sigue tres pasos (Katis et al., 2007):

- 1) Adquisición: Un vector (un áfido, por ejemplo) se posa sobre la hoja de una planta infectada y penetra con su estilete la epidermis de la hoja, succionando las partículas virales en el proceso.
- 2) Retención: Las partículas virales se alojan dentro del aparato bucal del insecto y puede seguir los mecanismos de transmisión persistente, semipersistente o no persistente.
- 3) Inoculación: Las partículas virales retenidas dentro del insecto son liberadas cuando este se posa sobre una planta sana y se alimenta de ella.

Particularmente, los virus de plantas no cuentan con receptores específicos para la entrada del virus a la célula. En cambio, aprovechan el ingreso por medio del aparato bucal del vector para entrar a las células vegetales y desensamblar sus componentes en el citoplasma celular. Una vez que el virus libera su material genético, el ciclo de replicación viral comienza empleando la maquinaria celular de la planta para producir un mayor número de copias de sí mismo (Xavier & Whitfield, 2023). En el caso de virus de RNA, el proceso de replicación ocurre en complejos de replicación viral (VRCs) compuestos por el RNA viral, proteínas de replicación viral y proteínas del hospedero, los cuales se acoplan a membranas modificadas de diversos organelos celulares (Carbonell *et al.*, 2016). Las nuevas moléculas de RNA y proteínas de la cápside sintetizadas se ensamblan para conformar nuevas partículas virales que podrán moverse a través de plasmodesmos para infectar células aledañas e, incluso, moverse por medio del tejido vascular de la planta y colonizar tejidos distantes. El ciclo de infección termina cuando un vector succiona las nuevas partículas virales formadas y las

transmite a una planta sana, reiniciando el ciclo de infección (Xavier & Whitfield, 2023).

1.3.1.1 Replicación de virus de RNA

Los virus de RNA representan a la mayoría de las especies virales de plantas, por lo que son un modelo de estudio de replicación viral. A diferencia de los virus de DNA, los virus de RNA utilizan exclusivamente intermediarios de RNA, por lo que todos los virus de esta clase codifican polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRp) para poder replicar sus RNAs genómicos. Dependiendo de la polaridad del virus, las enzimas RdRp sintetizan las cadenas complementarias al RNA genómico que, a su vez, funcionan como molde para la síntesis de nuevas cadenas de RNA de la polaridad del virus (Figura 1; Carbonell *et al.*, 2016; Choudhary *et al.*, 2020).

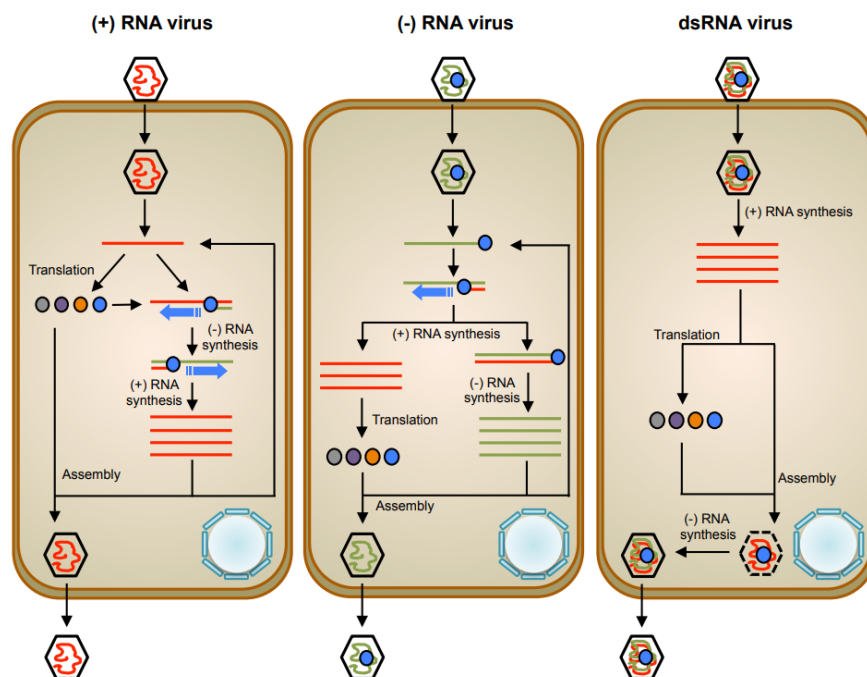


Figura 1. Ciclo de infección de virus de RNA de plantas. Izquierda: Virus de RNA de cadena sencilla positiva; Centro: Virus de RNA de cadena sencilla negativa; Derecha: Virus de RNA de cadena doble (Adaptado de Carbonell *et al.*, 2016).

En el caso de los virus de RNA de cadena sencilla positiva, una vez que el virus ha ingresado a la célula hospedera y ha desensamblado sus componentes en el citoplasma, las cadenas de RNA de polaridad positiva funcionan como RNAm para ser traducidos y sintetizar las proteínas virales. La RdRp sintetiza cadenas de polaridad negativa a partir de las cadenas de polaridad positiva, las cuales sirven como molde para la síntesis de nuevas cadenas de polaridad positiva que pueden ser traducidas, utilizadas como molde o reclutadas para la formación de nuevas partículas virales (Hull, 2014).

Por otro lado, los virus de polaridad negativa necesitan sintetizar una cadena complementaria de RNA para poder traducir su RNAm y producir las proteínas virales. Para esto, la RdRp está empaquetada junto con los RNAs dentro de las partículas virales de tal forma que, al desensamblarse los componentes del virus dentro de la célula, la RdRp puede por sí sola sintetizar cadenas de RNAm que serán traducidas, utilizadas como molde para sintetizar RNA de polaridad negativa o formarán parte de nuevas partículas virales (Choudhary et al., 2020).

Por último, en las partículas virales de RNA de cadena doble también se encuentra empaquetada la RdRp que sintetiza RNAm a partir de cadenas de RNA de polaridad negativa. Así como en los demás virus de RNA, este RNAm cumple las mismas funciones. Sin embargo, en esta ocasión el RNAm adquiere una función adicional como molde para la síntesis de cadenas de polaridad negativa dentro de las partículas virales ya ensambladas. Esto es un proceso exclusivo de los virus de RNA de cadena doble que se conoce como “maduración” y protege al RNA viral de los mecanismos de defensa del hospedero como el silenciamiento génico, el cual puede detectar e inactivar RNA de cadena doble (Choudhary et al., 2020; Pallas & García, 2011).

1.3.2 Movimiento viral

Los virus de plantas tienen que atravesar una barrera física al momento de migrar desde una célula infectada hacia una célula sana dentro de una planta: la pared celular. A diferencia de los virus de animales, los virus de plantas no pueden lisar a las células al momento de alcanzar una cantidad crítica de partículas virales debido a que la pared celular de las células vegetales está compuesta principalmente por celulosa, la cual no puede ser degradada por ninguna enzima viral conocida hasta la fecha (Taliani *et al.*, 2008). Debido a esto, el transporte de virus dentro de las plantas ocurre por medio de dos mecanismos: a través de plasmodesmos, en lo que se conoce como movimiento célula a célula (o movimiento local); y a través del tejido vascular de la planta (principalmente el floema) que se conoce como movimiento sistémico (o movimiento a larga distancia). En ambos casos, el virus hace uso de componentes virales como proteínas de la cápside (CP) y proteínas de movimiento (MP), así como sistemas de secreción y proteínas propias de la planta (Hong & Ju, 2017; Wang *et al.*, 2020).

1.3.2.1 Movimiento célula a célula

El movimiento célula a célula ocurre a través de plasmodesmos, los cuales son nanoestructuras con forma de canal y un límite de exclusión de ~3 nm que interconectan células vegetales adyacentes en un simplasma (Lucas *et al.*, 2009). En general, el límite de exclusión de los plasmodesmos es muy pequeño a comparación del tamaño de las partículas virales, por lo que los virus de RNA codifican proteínas de movimiento (MP) que aumentan el límite de exclusión de los plasmodesmos y permiten el flujo de los componentes virales en forma de complejos de ribonucleoproteína (VNP) o partículas virales completas (Wang *et al.*, 2020).

El movimiento de componentes virales a través de plasmodesmos puede ser clasificado de acuerdo con los requerimientos de la CP para cumplir esta función

(Scholthof, 2005). De esta forma, los virus pueden ser clasificados dentro de las siguientes tres clasificaciones:

- 1) Clase I: En esta clasificación la CP no es requerida para el movimiento de los componentes virales y, por tanto, no forma parte del complejo de movimiento viral. Este tipo de virus está representado por el virus del mosaico del tabaco (TMV), el cual codifica una MP especializada de 30 kDa y no requiere a la CP para el movimiento célula a célula. Es importante resaltar que la MP de TMV, así como otras proteínas de movimiento homólogas de una otras especies virales pertenecen a la superfamilia de proteínas de movimiento 30K, las cuales pueden ser funcionalmente intercambiables entre sí (Carrasco *et al.*, 2018).
- 2) Clase II: En la clase II la CP ahora cumple una función auxiliar en el movimiento de los componentes virales ya sea de una manera activa o protegiendo al RNA viral de los mecanismos de defensa de la planta. El virus del mosaico del pepino (CMV) es un representante de este tipo de virus, el cual codifica una MP con similitudes bioquímicas a las de la MP de TMV, pero con la diferencia de que CMV depende completamente de su CP para moverse a través de los plasmodesmos (Kwon *et al.*, 2023).
- 3) Clase III: En contraparte con las dos clases anteriores, los virus de la clase III se caracterizan por moverse de una célula a otra en forma de partículas virales, por lo que la CP es indispensable para su movimiento (Takeda *et al.*, 2004).

1.3.2.2 Movimiento sistémico

Seguido al movimiento de célula a célula, el virus puede alcanzar órganos distantes al sitio de infección por medio del movimiento sistémico que se da lugar en el tejido vascular de la planta. Principalmente, los virus se mueven junto con los fotosintatos a través del floema, aunque existen excepciones de virus que también pueden moverse dentro del xilema. Esto dependerá de la interacción

específica de factores de la planta con los componentes del virus (Folimonova & Tilsner, 2018). Se sabe que el paso de los componentes virales hacia el tejido vascular representa un gran reto para el virus, por lo que la capacidad de movimiento sistémico de un virus es un determinante crucial en el establecimiento de su rango de hospederos (Park et al., 2013).

Los virus se enfrentan a complicaciones diferentes subyacentes al movimiento sistémico en comparación con el movimiento de célula a célula. El diámetro que se puede encontrar dentro de los canales del tejido vascular es mucho más grande en comparación al diámetro de las partículas virales. Además, las proteínas virales requeridas por los virus para los movimientos de célula a célula y sistémico también parecen ser distintas entre ambos mecanismos (Hong & Ju, 2017). Por ejemplo, la MP de 30 kDa de TMV es indispensable para el movimiento célula a célula, mientras que la CP no es requerida para ese efecto. Sin embargo, se ha observado que mutantes de CP deficientes en la formación de partículas virales de TMV hacen imposible su movimiento sistémico en plantas de *Nicotiana tabacum*, lo cual indica que CP es indispensable para el movimiento sistémico de TMV. Esto podría deberse a que el RNA viral de TMV debe ser protegido dentro de una cápside proteica para asegurar su supervivencia a lo largo del tejido vascular (Tran et al., 2022).

Para que un virus pueda alcanzar órganos distantes al sitio de infección, este debe primero moverse de célula a célula a través de los distintos tejidos de la planta hasta alcanzar el sistema vascular. En general, el camino recorrido por el virus comienza en las células del mesófilo, atravesando el haz vascular hacia las células del parénquima y, finalmente, pasando a través de las células acompañantes para llegar a los elementos cribosos. Una vez dentro del sistema vascular, el virus es transportado de manera pasiva siguiendo el flujo de los fotosintatos dentro del floema hasta alcanzar un órgano nuevo y comenzar el camino de regreso para alcanzar las células del mesófilo (Figura 2; Hipper et al., 2013; Xavier & Whitfield, 2023).

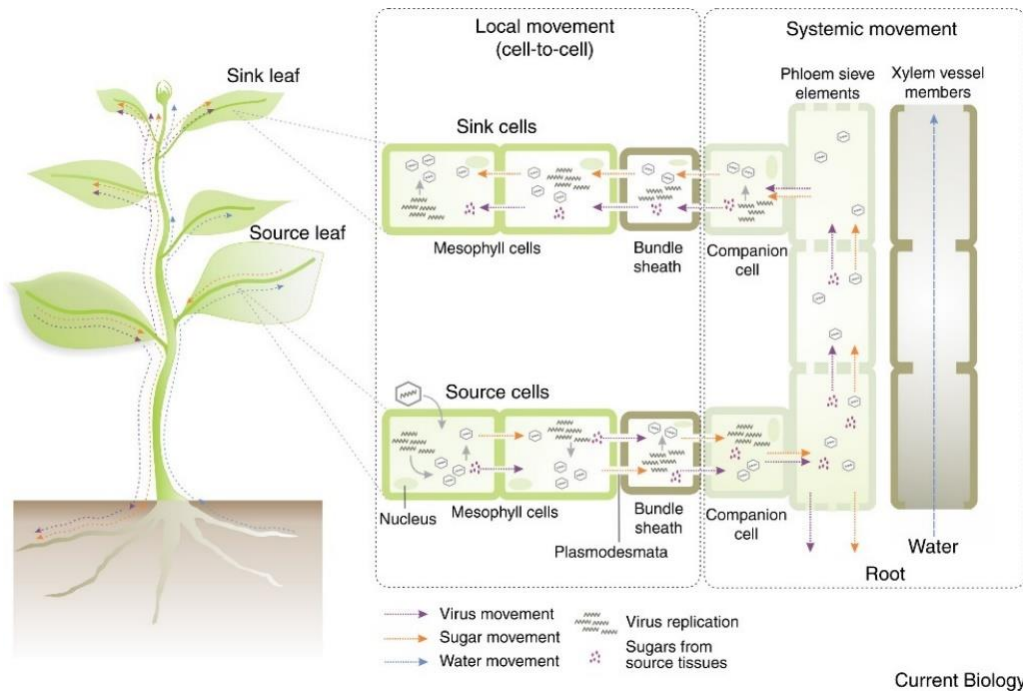


Figura 2. Rutas de movimiento célula a célula y movimiento sistémico que siguen los virus en una infección sistémica de plantas. (Adaptado de Xavier & Whitfi Eld, 2023).

Como se ha mencionado para el movimiento de célula a célula, en el movimiento sistémico también se pueden presentar dos conformaciones en las que los virus pueden moverse: en forma de complejos de ribonucleoproteína y en forma de partículas virales. El movimiento en forma de partículas virales se da en los virus pertenecientes a los géneros *Begomovirus*, *Benyvirus*, *Carmovirus*, *Closterovirus*, *Cucumovirus*, *Dianthovirus*, *Mastrevirus*, *Necrovirus*, *Potexvirus*, *Sobemovirus* y *Tobamovirus* (Hipper *et al.*, 2013). Otros virus no requieren la formación de partículas virales para moverse a larga distancia como en el caso del virus del mosaico del bromo (BMV), el cual se mueve en forma de VNPs y es capaz, incluso, de mover su RNA3 en ausencia de replicación viral (Gopinath & Kao, 2007).

1.3.3 Mecanismos de defensa en plantas contra infecciones virales

Cuando ocurre una infección sistémica por parte de un virus en una planta, esta puede activar diversos mecanismos de defensa para reprimir la proliferación

viral. Tanto componentes del virus como moléculas propias de la planta pueden interactuar para desencadenar alguna de las respuestas de defensa desarrolladas por las plantas en lo que se conoce como sistema inmune de plantas. Principalmente, estos mecanismos pueden ser de dos tipos: 1) mediados por genes de resistencia (*R*) como el caso de la respuesta hipersensible y la respuesta necrótica; y 2) basados en el silenciamiento génico (Liu et al., 2017).

1.3.3.1 Respuesta hipersensible (HR)

La respuesta hipersensible (HR) es un mecanismo de defensa de plantas que tiene la finalidad de limitar la propagación de un patógeno al inducir una reacción apoptótica en las células del tejido infectado. Esta respuesta puede derivarse por infecciones del tipo bacteriana, fúngica o viral, compartiendo mecanismos moleculares similares en cada una de ellas (Mandadi & Scholthof, 2013).

En el caso infecciones virales, la HR es activada cuando un factor de avirulencia (*Avr*) codificado por un virus es reconocido por el producto de un gen de resistencia *R* del hospedero (Pallas & García, 2011). Esto conlleva a cambios metabólicos en los niveles de hormonas de defensa como ácido salicílico, ácido jasmónico y óxido nítrico, y la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Además, la HR se ve caracterizada por la activación de proteasas similares a caspasas que actúan como efectoras de la muerte celular programada y necrosis celular (Calil & Fontes, 2017).

Cabe mencionar que existe un mecanismo de defensa denominado “necrosis sistémica” que es distinto a la necrosis derivada por el mecanismo de HR y que se manifiesta en un estadio avanzado de infección. La necrosis sistémica se observa principalmente en los órganos de la parte apical de la planta y su activación repercute en una respuesta letal que puede matar a la planta hospedera (Moeder & Yoshioka, 2008).

1.3.3.2 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

A diferencia de la HR, en la resistencia sistémica adquirida (SAR) la resistencia hacia el patógeno se confiere a los tejidos distantes con respecto al sitio de infección, además de perdurar por largo tiempo en caso de subsecuentes infecciones. El mecanismo exacto de SAR no ha sido definido, sin embargo, se sabe que también está activado por una interacción Avr/R que resulta en la acumulación de fitohormonas como el ácido salicílico y el ácido jasmónico en tejidos distantes (Vlot *et al.*, 2008).

La persistencia de la resistencia ante infecciones virales en SAR puede deberse a modificaciones epigenéticas como la metilación y acetilación del DNA, y el rearrreglo de cromosomas. De hecho, se ha reportado que estas modificaciones epigenéticas pueden ser heredadas a la progenie de una planta que haya sufrido una infección viral, confiriendo de resistencia a su descendencia (Huang *et al.*, 2023). De igual forma, hay estudios que apuntan a que la acumulación de componentes de señalización del sistema inmune como MPK3, MPK6 y NPR1 puede conferir resistencia a largo plazo ante la incidencia de nuevas infecciones (Spoel & Dong, 2012).

1.3.3.3 Silenciamiento génico

En una infección viral, componentes del virus pueden activar una respuesta de defensa para conferir de resistencia a la planta infectada o también pueden suprimir al componente viral en cuestión. Como parte del sistema inmune adaptativo de las plantas, el silenciamiento génico es un mecanismo de defensa capaz de suprimir la transcripción de RNAs virales o, incluso, degradarlos. Esto es posible debido a que las plantas cuentan con una maquinaria de silenciamiento de RNA que se encarga de reconocer moléculas de RNA de cadena doble de origen viral (dsRNA) y generar a partir de estas moléculas RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), los cuales, junto con otras proteínas

accesorias, conforman complejos de silenciamiento inducidos por RNA (RISC) (Pallas & García, 2011).

El silenciamiento de RNA no sólo es capaz de reprimir infecciones de origen viral, sino que es empleado como mecanismo de defensa ante una gran diversidad de patógenos. Además, este mecanismo es común en especies de distintos grupos taxonómicos como en animales, hongos y plantas. Esto ha conllevado a la identificación de distintos efectores importantes del silenciamiento de RNA viral como proteínas argonautas (AGO), polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRp), proteínas de unión a RNA de doble cadena (DRB) y proteínas Dicer-like (DCL) (Dana et al., 2017).

El mecanismo de silenciamiento comienza cuando proteínas DCL procesan a cadenas de dsRNA y generan fragmentos de RNA de aproximadamente 24 nucleótidos que se denominan RNAs pequeños de interferencia (siRNA). Después, los siRNAs son acoplados a complejos RISC y son madurados para liberar una de sus cadenas, dejando disponible una cadena para la hibridación con su secuencia blanco. Puesto que el siRNA procesado proviene de una secuencia viral, el complejo RISC es capaz de reconocer secuencias específicas de virus y bloquear sus procesos de transcripción y traducción. De igual forma, la proteína argonauta acoplada al complejo RISC puede generar cortes en la secuencia blanco detectada (Calil & Fontes, 2017).

Para inhibir el mecanismo de silenciamiento de RNA, algunos virus pueden codificar proteínas supresoras del silenciamiento, mermando la capacidad de respuesta inmune de la planta. Esto repercute en el desarrollo de la planta y puede verse reflejado en la aparición de síntomas típicos de infección viral. A su vez, la misma planta puede dirigir su maquinaria de silenciamiento hacia RNAs propios de la planta, provocando efectos secundarios en su fisiología (Wieczorek & Obrępalska-Stęplowska, 2015).

1.4 Clones infecciosos virales

Los clones infecciosos virales son secuencias de DNA con las que se pueden obtener transcritos infecciosos de virus in vitro o in vivo bajo la regulación de un promotor adecuado. Esta herramienta permite el estudio de genómica funcional y mecanismos virales, así como la interacción virus-hospedero. De igual forma, los clones infecciosos pueden ser empleados como vectores virales para la infección de plantas con ayuda de modelos de infección como *Agrobacterium tumefaciens* (Ishwara et al., 2020).

1.4.1 Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens es una bacteria fitopatógena gram negativa que tiene la capacidad de infectar células vegetales y transferir parte de su DNA (denominado T-DNA) al DNA genómico de la célula infectada, esto como parte de un mecanismo parasitario en el que *A. tumefaciens* desvía el metabolismo de la planta para la síntesis de sus propios nutrientes (Guo et al., 2019).

Naturalmente, *A. tumefaciens* contiene un plásmido inductor de tumores (Ti) que es el responsable de conferirle la capacidad infectiva y contiene los siguientes componentes principales:

- 1) Una región de T-DNA que, en el proceso de infección, es transferida al núcleo de la célula vegetal con ayuda de las proteínas de virulencia Vir y proteínas propias de la planta. El T-DNA codifica las enzimas necesarias para la síntesis de fitohormonas y opinas, de las cuales, las primeras son las responsables de inducir la formación de tumores en el tejido vegetal y las segundas son utilizadas por *A. tumefaciens* como fuente de carbono y nitrógeno. Flanqueando a esta región, se encuentran las secuencias borde (LB y RB) que consisten en secuencias cortas repetidas de 25 nucleótidos y que son cruciales en el mecanismo de transferencia del T-DNA al DNA genómico de la célula hospedera (Karthik et al., 2018).

Cabe señalar que, como método de transformación de células vegetales, la región del T-DNA ha sido sustituida por genes de interés biotecnológico en vectores binarios para su expresión en las células transformantes (por ejemplo, en el uso de clonas infecciosas).

- 2) Como información para el mecanismo de transferencia del T-DNA, se encuentra la región Vir que codifica las proteínas Vir responsables de la virulencia de *A. tumefaciens*. Esta región contiene al menos siete marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican a las proteínas VirA, VirB, VirC, VirD, VirE, VirF y VirG, las cuales actúan en conjunto con factores de la célula recipiente para transferir el T-DNA por medio de un sistema de secreción tipo IV (T4SS) hasta el núcleo celular (Figura 3; Hwang et al., 2017).

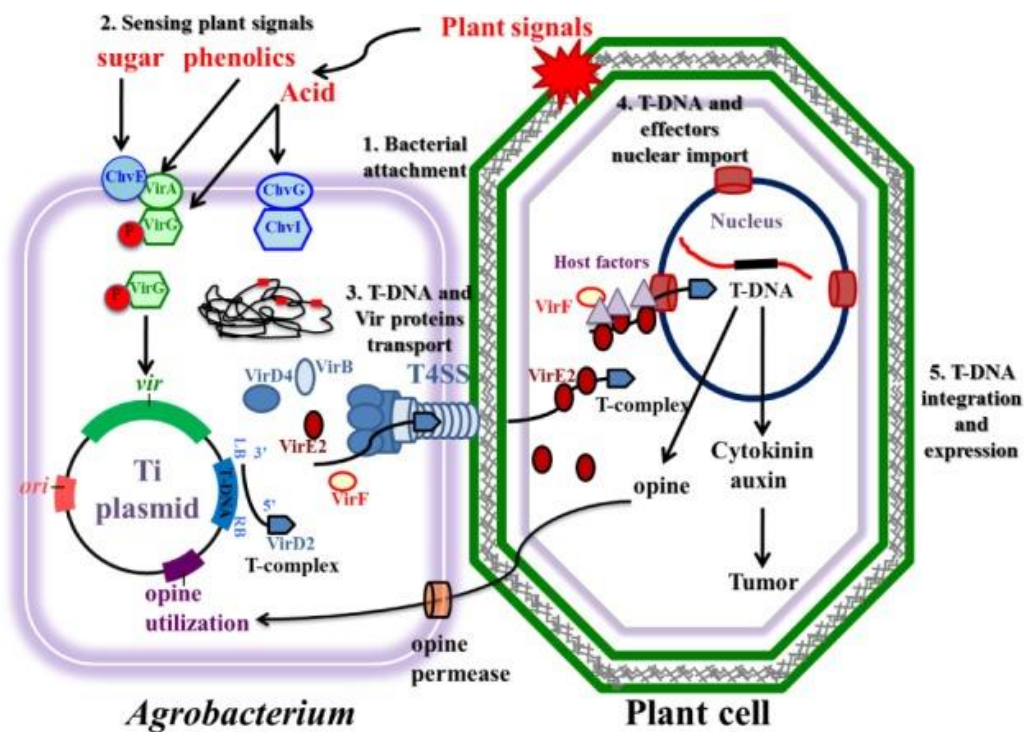


Figura 3. Mecanismo de transferencia de T-DNA de *A. tumefaciens* hacia una célula vegetal

(Adaptado de Hwang et al., 2017).

1.5 Virus del mosaico de la alfalfa (AMV)

El Virus del mosaico de la alfalfa (AMV) es un virus tripartito de RNA de cadena sencilla positiva (grupo IV de la clasificación de Baltimore) que fue identificado por primera vez en 1931 por Weimer en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*) y fue descrito como una enfermedad de mosaico en alfalfa transmisible por áfidos (Weimer, 1931). Actualmente, se sabe que AMV es capaz de infectar a más de 600 especies pertenecientes a más de 70 familias vegetales y puede reducir el rendimiento hasta un 65% de cultivos de interés económico como alfalfa, papa, pimiento, tomate, soya, chile, tabaco, entre otros (Hull, 2002).

Este virus pertenece a la familia taxonómica *Bromoviridae*, la cual está compuesta por los géneros *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus*, *Oleavirus* y *Alfamovirus*, siendo AMV la especie representante de este último género (Especie: *Alfamovirus alfalfa*).

1.5.1 Estructura genómica de AMV

Al igual que ocurre con los demás virus de la familia *Bromoviridae*, el genoma de AMV está segmentado en tres RNAs genómicos (RNA1, RNA2 y RNA3) y un RNA4 subgenómico. Particularmente, el RNA1 y RNA2 de AMV codifican las subunidades P1 de 126 kDa y P2 de 90 kDa del complejo de replicación viral, respectivamente. Por otro lado, el RNA3 es un componente disistrófico que codifica la proteína de movimiento MP de 32 kDa y la proteína de la cápside CP de 24 kDa, sin embargo, la CP es sintetizada a partir del RNA4 que es un RNA subgenómico derivado de la replicación del RNA3 (Figura 4; Carmen Herranz et al., 2012). Cada RNA es encapsidado individualmente en partículas proteicas de CP dando lugar a partículas virales con un grosor de 19 nm y longitudes que pueden variar entre 56 nm, 43 nm, 35 nm y 30 nm dependiendo del RNA encapsidado (RNA1, RNA2, RNA3 y RNA4, respectivamente) (Bol, 2008). Esta propiedad compartida por los miembros de la familia *Bromoviridae* ha

despertado interés por estudiar los mecanismos de movimiento y ensamblaje virales durante inoculaciones de componentes virales en tejidos distantes de una planta (Gopinath & Kao, 2007).

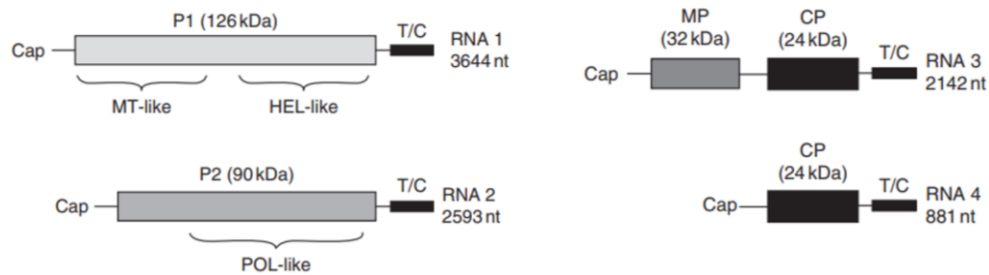


Figura 4. Estructura genómica de AMV (aislado 425) (Adaptado de Bol, 2008).

Cada RNA de AMV posee regiones no traducibles en sus extremos 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR), las cuales están involucradas en varios procesos moleculares inherentes a la activación, replicación, traducción y movimiento del virus. En el caso del 5'UTR, en su inicio cuenta con una estructura 5'cap que participa en el reclutamiento del complejo de traducción para la síntesis de las proteínas codificadas en cada RNA, además de conferir protección al RNA ante los mecanismos de defensa de la planta. Por otro lado, el 3'UTR cuenta con una secuencia homóloga de 145 nucleótidos en los cuatro RNAs que es capaz de adoptar dos conformaciones mutuamente exclusivas: la primera es un sitio de unión de CP (CPB) que está involucrado en los procesos de traducción y ensamblaje de partículas virales, mientras que la segunda adopta una estructura similar a un RNA de transferencia (TLS) y participa en el proceso de replicación (Figura 4; Bol, 2008).

1.5.2 Ciclo de infección de AMV

El ciclo de infección de AMV (Figura 5) comienza cuando 1) las partículas virales son inoculadas dentro del tejido vegetal por acción de un vector o por lesión mecánica. Una vez dentro de la célula vegetal, las partículas virales son

desensambladas liberando en el citoplasma los RNAs contenidos en ellas. Un dímero de CP se queda anclado al sitio CPB del extremo 3'UTR de los RNAs dando lugar a 2) la traducción temprana de los genes *P1* y *P2* del RNA1 y RNA2, respectivamente. En la traducción de los RNAs de AMV, la CP juega un papel fundamental al ser una proteína con función homóloga a la proteína de unión de poli(A) (PABP) que, en conjunto con el complejo de iniciación de la traducción, forman una estructura de anillo de RNAm y aumenta la eficiencia de traducción (Figura 5, B). Se ha comprobado por ensayos de inmunoprecipitación que la CP de AMV interactúa con la subunidad eIF4G del complejo de iniciación de la traducción y con la región CPB de los RNAs virales formando la estructura de anillo de RNAm mencionada (Bol, 2008).

3), 4) La replicación de los RNAs de AMV comienza cuando las proteínas P1 y P2 conforman el complejo de replicación viral y reconocen la estructura TLS de los extremos 3'UTR de cada RNA viral. La proteína P1 tiene un dominio de metiltransferasa en su extremo N-terminal que participa en la formación del 5'cap de la nueva cadena sintetizada, mientras que en su extremo C-terminal tiene un dominio de helicasa que le permite separar las cadenas de intermediarios de RNA de cadena doble. En el caso de la proteína P2, esta cuenta con un motivo GDD con unión a Mg^{++2} , el cual es un motivo conservado en RdRps de virus y que tiene actividad catalítica de polimerasa. 5) En conjunto, las proteínas P1 y P2 sintetizan una cadena complementaria de polaridad negativa por cada RNAm.

6), 7) A partir de la cadena negativa del RNA3 se sintetizan dos nuevas cadenas de RNA con polaridad positiva: La primera es una nueva molécula del RNA3, y la segunda resulta en el RNA4 subgenómico que contiene la secuencia de aproximadamente los últimos 881 nucleótidos del extremo 3' del RNA3. 8) Con esto, se puede traducir el RNA3 que da lugar a la síntesis de la MP, mientras que la traducción del RNA4 da lugar a la síntesis de la CP.

Una vez que hay suficiente número de moléculas de CP y RNAs virales de polaridad positiva, 9) pueden ensamblarse nuevas partículas virales o VNPs que

pueden ser 10) transportados hacia otras células con ayuda de moléculas de MP asociadas a plasmodesmos, reiniciando el ciclo de infección en una célula sana.

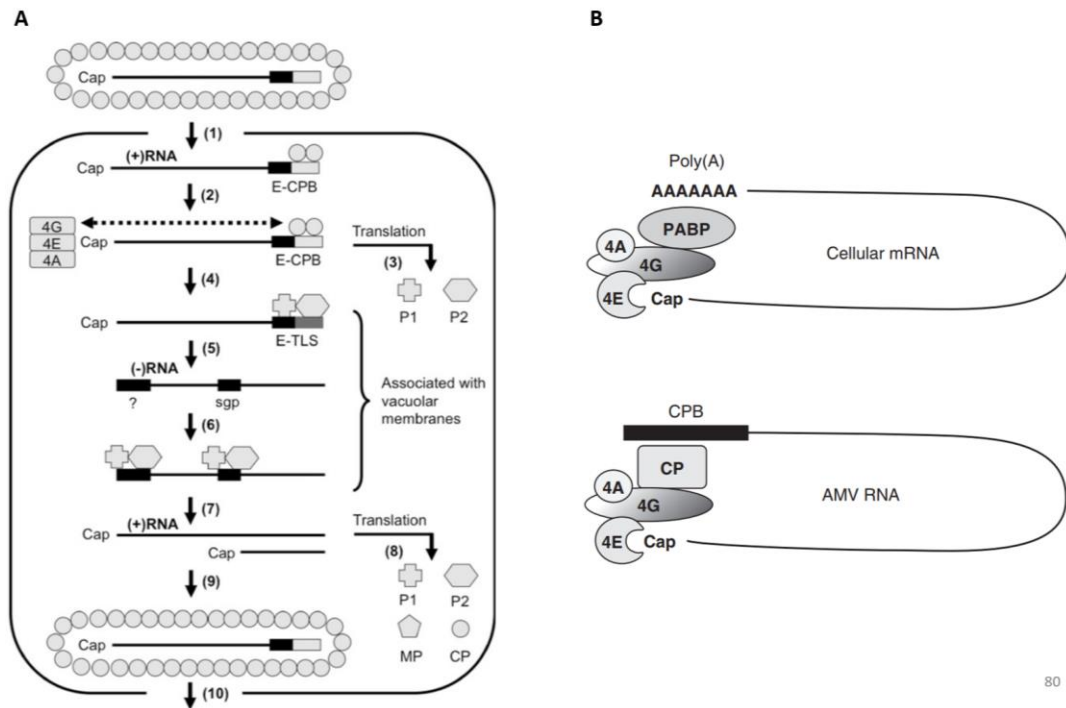


Figura 5. Ciclo de infección de AMV. A) Entrada, replicación y salida de AMV en una célula vegetal; B) Modelo de traducción de los RNAs de AMV (Adaptado de Bol y Linthorst, 2011).

1.5.3 Movimiento de AMV

Las regiones CPB de los extremos 3'UTR presentan gran afinidad por dímeros de CP y activan la encapsidación de los RNAs de AMV. Sin embargo, al analizar RNAs mutantes con la región 3'UTR eliminada, se ha demostrado que la región CPB no es indispensable en la encapsidación del RNA1 y del RNA2 ya que conservan su capacidad de encapsidarse (Vlot *et al.*, 2001). De cualquier forma, la encapsidación y posterior formación de partículas virales se ha reportado como procesos necesarios para el movimiento de AMV de célula a célula (Bol, 2008). La MP sintetizada a partir del RNA3 permite el movimiento de estas partículas virales al formar estructuras tubulares y aumentar el límite de exclusión en los plasmodesmos que conectan una célula con otra.

A pesar de la importancia de la formación de partículas virales en el movimiento de AMV de célula a célula, en otros trabajos se ha comprobado que la forma de partícula viral puede ser prescindible en el movimiento de AMV de célula a célula. Esto debido a que, al emplear un RNA3 que codifica una CP mutante deficiente en la formación de partículas virales, se reportó que el transporte de célula a célula de los RNAs de AMV no se vio comprometido. Sumado a esto, en este mismo trabajo se identificó que los 44 aminoácidos del extremo C-terminal de la MP de AMV interactúa con la CP y favorece el movimiento de célula a célula, además de que esta región C-terminal de la MP confiere movilidad de célula a célula cuando es agregada a la secuencia de MPs heterólogas pertenecientes a la superfamilia 30K, comprobando que las MPs de distintas especies de virus pueden ser funcionalmente intercambiables entre sí y sugiriendo que AMV se mueve en forma de un complejo de ribonucleoproteína (VNP) (Sánchez-Navarro et al., 2006). En un trabajo posterior, se evaluó la capacidad de movimiento sistémico de estas construcciones quiméricas del RNA3 de AMV con distintas MPs y se encontró que la región C-terminal de la MP de AMV también es necesaria para el movimiento a larga distancia del RNA viral, soportando el hecho de que el transporte de AMV requiere la participación de MP y CP (Fajardo et al., 2013).

Con todo esto, surge la pregunta de cuáles son los requerimientos mínimos para el movimiento de los componentes genómicos de AMV en una infección sistémica, así como cuáles son los mecanismos moleculares asociados a este proceso. En el presente trabajo se intenta dar respuesta a esta pregunta diseñando un experimento de inoculación de los componentes genómicos de AMV en plantas de *N. benthamiana* y evaluar su movimiento sistémico no asociado a la replicación viral.

ANTECEDENTES

El movimiento sistémico de AMV es un tema que no ha podido ser esclarecido por completo y que representa una incógnita en el entendimiento de los mecanismos moleculares de transporte sistémico de virus en plantas. Intentos por elucidar este mecanismo de transporte han arrojado información valiosa que evidencia la participación tanto de componentes del virus como elementos propios de la planta.

Se ha comprobado que la CP y MP de AMV están involucradas en el movimiento a corta y larga distancia de sus RNAs, además de la capacidad de estos componentes de moverse en ausencia de partículas virales como tal. Esto ha llevado a determinar que AMV puede mover sus componentes en forma de complejos de VNPs a lo largo del tejido vegetal. Sin embargo, en trabajos más recientes se ha podido observar el movimiento de RNAs de AMV no asociado a la interacción con CP, lo cual ha puesto en duda la estricta necesidad de CP en el mecanismo de movimiento sistémico (Calderón-Pérez et al., 2019; Villar-Álvarez et al., 2022).

Tras una colecta de tejido de *Leonotis nepetaefolia* con síntomas de infección viral realizada en 2005 en Atlixco, Puebla (Piedra-Ibarra et al., 2005), se logró obtener un aislado de AMV (AMV Leonotis) que, en un subsecuente trabajo, arrojó el primer indicio de elementos propios de la planta que pudieran estar complementando la función de componentes ausentes de AMV.

Posteriormente, en 2008, el aislado de AMV-Leonotis junto con otro aislado de AMV obtenido de plantas de pimiento (AMV-Capsicum) fueron utilizados para infectar tres plantas indicadoras (*Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* y *Gomphrena globosa*), así como tres variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum* Flora Dade, Rio Grande y Rutgers). Por un lado, el aislado AMV-Capsicum indujo síntomas de infección en todas las plantas

analizadas, mientras que el aislado AMV-Leonotis indujo síntomas en las tres plantas indicadoras y tan sólo en la variedad de jitomate Rutgers, siendo las variedades Flora Dade y Río Grande resistentes ante la infección de AMV-Leonotis (Calderón-Pérez, 2008). Al detectar por PCR los RNAs de cada aislado de AMV en hojas locales y sistémicas de las plantas analizadas, se encontró que una porción de al menos 1 kb en la región 3' del RNA2 y del gen de CP del RNA3 no estaban presentes en hojas locales ni sistémicas de las dos variedades de jitomate resistentes a AMV-Leonotis (Figura 6; Calderón-Pérez et al., 2019). Sumado a esto, haciendo la detección por Northern blot de los RNAs de AMV-Leonotis en la variedad de jitomate Flora Dade, se observó señal de hibridación para RNA1, RNA2 y MP, mientras que CP no pudo ser detectada (Figura 7).

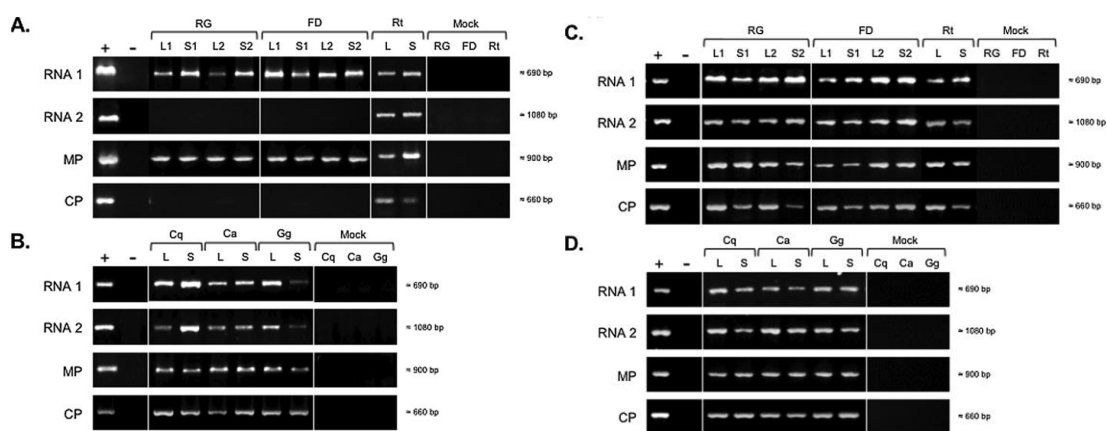


Figura 6. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV-Leonotis y AMV-Capsicum en hojas locales y sistémicas de distintas plantas infectadas. A) y B) Detección de AMV-Leonotis; C) y D) Detección de AMV-Capsicum (Adaptado de Calderón-Pérez et al., 2019).

Estos resultados obtenidos con el aislado AMV-Leonotis apuntaron a la idea de que pudo ocurrir un rearrreglo de las secuencias del RNA2 y RNA3, intercambiándose parte de ellos con secuencias del hospedero, lo cual se vio reflejado en la imposibilidad de amplificar un fragmento de dichos RNAs, pero pudiendo detectarlos por Northern blot, por no mencionar la presencia de múltiples bandas en las hibridaciones del RNA2 y RNA3. Ahora bien, al no estar presente la CP de AMV-Leonotis, la presencia del RNA1 y el gen de MP del RNA3

en hojas sistémicas sugirió que MP fue capaz de mover sistémicamente estos componentes genómicos, posiblemente junto con la ayuda de factores propios de la planta (Calderón-Pérez et al., 2019).

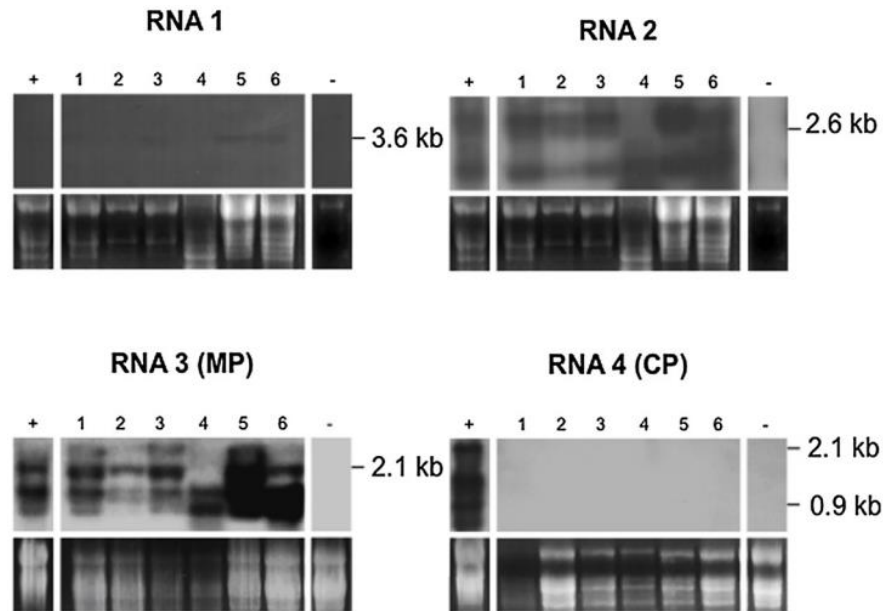


Figura 7. Detección por Northern blot de los componentes genómicos de AMV-*Leonotis* en hojas locales de jitomate *Flora Dade* infectado (Adaptado de Calderón-Pérez et al., 2019).

En otro trabajo, al realizar un experimento de evolución compensatoria de un RNA3 de AMV con una MP deficiente en movimiento sistémico, se obtuvieron 5 linajes evolutivos del RNA3 con modificaciones en la región 5'UTR que le confirieron la capacidad de movimiento sistémico. Analizando la secuencia de los RNA3 obtenidos, cada uno de ellos carecía de los 48 aminoácidos del extremo C-terminal de MP (de tal forma que no era capaz de interactuar con CP ni de moverse sistémicamente) y, tras varios pases de infección en plantas de *N. benthamiana*, se encontró que habían sufrido deleciones de 140 o 105 nucleótidos entre las posiciones 180 y 319 de la región 5'UTR, además de inserciones de 5 o 9 adeninas en las posiciones 300 y 301 (Figura 8; Villar-Álvarez et al., 2022).

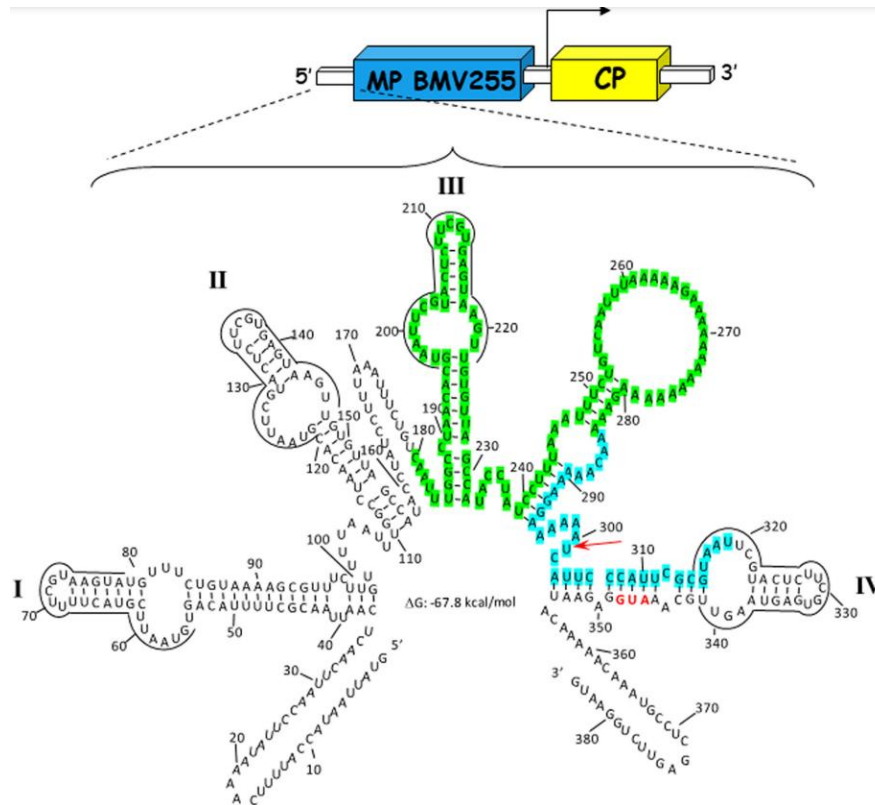


Figura 8. Estructura secundaria de la región 5' UTR de un RNA3 de AMV obtenido por evolución compensatoria (Adaptado de Villar-Álvarez et al., 2022).

Este resultado aportó nueva evidencia sobre el movimiento de RNAs de AMV no asociado a la formación de partículas virales ni a la interacción de MP con CP, soportando la idea de que los componentes genómicos de AMV se pueden mover en complejos de VNPs y que MP es competente por sí sola en sus movimientos célula a célula y sistémico.

Por otro lado, en un estudio realizado con el Virus del mosaico del bromo (BMV), el cual pertenece a la misma familia taxonómica que AMV (*Bromoviridae*), se evaluó su capacidad de movimiento sistémico no ligado a la replicación viral en un ensayo de agroinfiltración de clones infecciosos del virus en hojas de *N. benthamiana* (Gopinath & Kao, 2007). Al igual que AMV, BMV es un virus tripartito con la misma organización genómica, por lo que es un modelo de estudio para el transporte de sistémico de sus componentes genómicos. En este estudio, se

encontró que, al inocular cada RNA de BMV en hojas distintas de una misma planta, no se podían detectar RNAs virales productos de la replicación de BMV (Figura 9, A), por lo que se optó por inocular el RNA1 y RNA2 en una misma hoja, y el RNA3 en una hoja distinta para averiguar si, al estar presentes en la misma hoja los dos RNAs que codifican para la replicasa viral, la replicación de BMV se viera facilitada y evidenciara su capacidad de transporte sistémico no ligado a la replicación. De este modo, se pudieron detectar los componentes genómicos, así como el producto subgenómico de replicación (RNA4), en la hoja infiltrada con el RNA1 y RNA2, sugiriendo que hubo movimiento por parte del RNA3 hacia esa hoja (Figura 9, B). Esto supuso un gran descubrimiento puesto que, anteriormente, no se había descrito esta capacidad de movimiento del RNA3 en ausencia de la replicación viral.

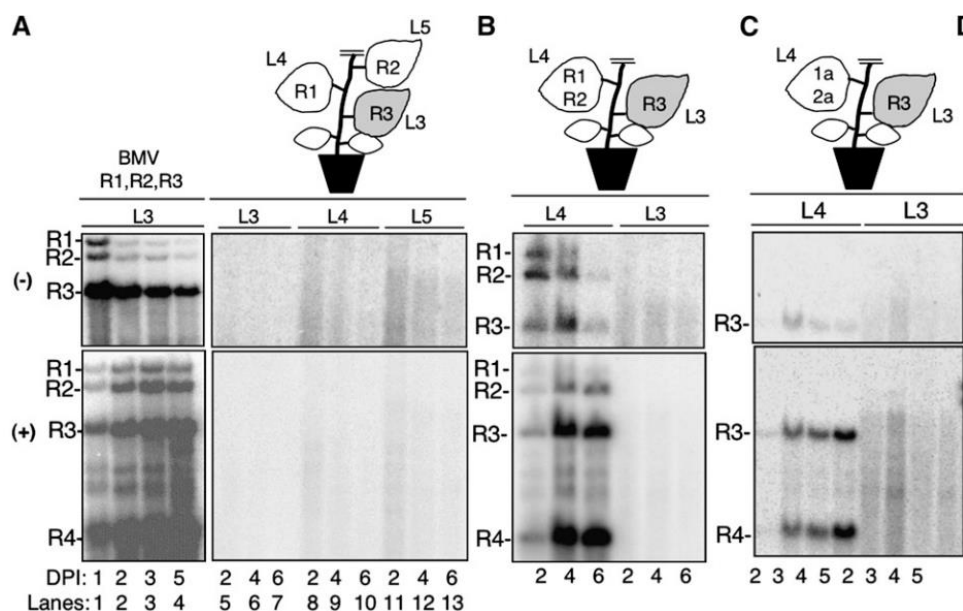


Figura 9. Reconstitución de la replicación de los RNAs de BMV en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (Adaptado de Gopinath y Kao, 2007).

Teniendo en cuenta que el RNA3 de BMV codifica para la proteína de movimiento MP y la proteína de la cápside CP, se planteó la hipótesis de que la traducción de este RNA en la hoja infiltrada dio lugar a la formación de partículas de MP que, de alguna forma, transportaron al RNA3 desde la hoja local infiltrada hacia las hojas

distantes infiltradas con el RNA1 y RNA2, dando lugar al inicio de replicación viral. Para comprobar esta hipótesis, se montó un segundo ensayo en el que se inocularon el RNA1 o el RNA2 individuales, con y sin moléculas partículas de MP, de tal forma que se pudiera observar el efecto de MP en el transporte de los RNAs virales (Figura 10). En este caso, tanto el RNA1 como el RNA2 fueron capaces de moverse cuando fueron inoculados con la MP, sugiriendo que la MP es capaz de transportar largas distancia los RNAs de BMV cuando no hay replicación viral. Este hallazgo representa el antecedente más directo sobre la metodología empleada en el presente trabajo.

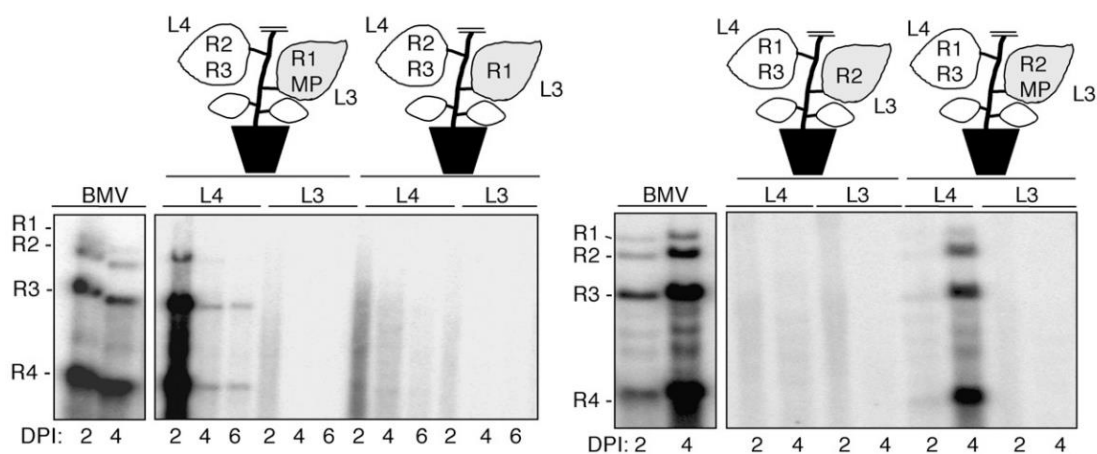


Figura 10. Examinación de los efectos de la proteína MP de BMV en el transporte del RNA1 y RNA2 (Adaptado de Gopinath y Kao, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Se estima que la infección del Virus del mosaico de la alfalfa (AMV) puede reducir el rendimiento de cultivos de interés económico hasta en un 65%, lo cual representa un asunto de gran preocupación a nivel mundial. La capacidad de infección sistémica de virus en plantas es un indicador del rango de hospederos a los que puede infectar un virus, por lo que el estudio de los mecanismos de movimiento sistémico de AMV podría brindar información valiosa para prevenir la incidencia de infecciones virales en cultivos de interés. Además, la falta de un entendimiento completo de los mecanismos moleculares empleados por AMV en el establecimiento de una infección sistémica, sumada a recientes hallazgos que conciernen el transporte a larga distancia de los componentes genómicos de AMV, acentúan la necesidad de elucidar estos mecanismos.

Los clones infecciosos virales son una herramienta que permite estudiar con un enfoque de genética funcional a especies virales y modelar sus mecanismos de infección en especies hospederas. Debido a esto, en el presente trabajo se emplean clones infecciosos para estudiar el movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV en la planta modelo *Nicotiana benthamiana*. Los resultados obtenidos podrían permitir un mejor entendimiento de los mecanismos de movimiento de virus en plantas y desarrollar estrategias para la prevención de enfermedades virales emergentes en especies vegetales.

HIPÓTESIS

La inoculación independiente de los componentes genómicos de AMV en hojas de *Nicotiana benthamiana* podría evidenciar la capacidad de movimiento a larga distancia no asociada a la replicación de estos componentes virales.

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el movimiento sistémico no ligado a la replicación viral de los componentes genómicos del Virus del mosaico de la alfalfa (AMV) en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

5.2 Objetivos específicos

1. Secuenciar los extremos 5' UTR y 3' UTR de cada RNA de AMV por la técnica de Stem-loop RACE.
2. Amplificar cada RNA viral y clonarlo en un vector binario para la construcción de clones infecciosos de AMV.
3. Transformar células de *A. tumefaciens* con cada construcción de vector binario.
4. Inocular los clones infecciosos en distintas combinaciones en hojas de *Nicotiana benthamiana* por medio de la técnica de agroinfiltración.
5. Detectar por PCR los transcritos de los RNAs virales en hojas locales y sistémicas inoculadas con cada componente viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas virales

El extracto de RNA total de AMV-Alfalfa fue proporcionado por la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del CINVESTAV Unidad Zacatenco, el cual fue aislado de cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*) infectados con AMV por inoculación mecánica. Por otro lado, los clones infecciosos de AMV-Arabidopsis fueron brindados por el Dr. Vicente Pallás Benet y el Dr. Jesús Ángel Sánchez Navarro del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, de la Universidad Politécnica de Valencia.

6.2 Construcción de clones infecciosos de AMV

Con el fin de estudiar el movimiento sistémico de los componentes genómicos individuales de AMV, se construyeron clones infecciosos por cada RNA viral bajo la regulación del promotor CaMV 35S en el vector binario pLX-B2.

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos para la técnica de Stem-loop RACE

Como primer paso en la construcción de los clones infecciosos, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los extremos 5' y 3' de cada RNA viral por la técnica de Stem-loop RACE como se muestran en la figura 11. Para esto, se realizó un alineamiento por cada RNA de AMV con el algoritmo MUSCLE del programa MEGA XI, comparando las secuencias completas reportadas en bases de datos e identificando las regiones más conservadas. Una vez identificadas estas regiones, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes (ver tabla 1).

6.2.2 Amplificación y secuenciación de extremos 5' y 3' de los componentes genómicos de AMV por la técnica de Stem-loop RACE

Los oligonucleótidos diseñados se utilizaron para amplificar los extremos 5' y 3' de cada RNA de AMV-Alfalfa de acuerdo con la metodología de Stem-loop RACE (Figura 11).

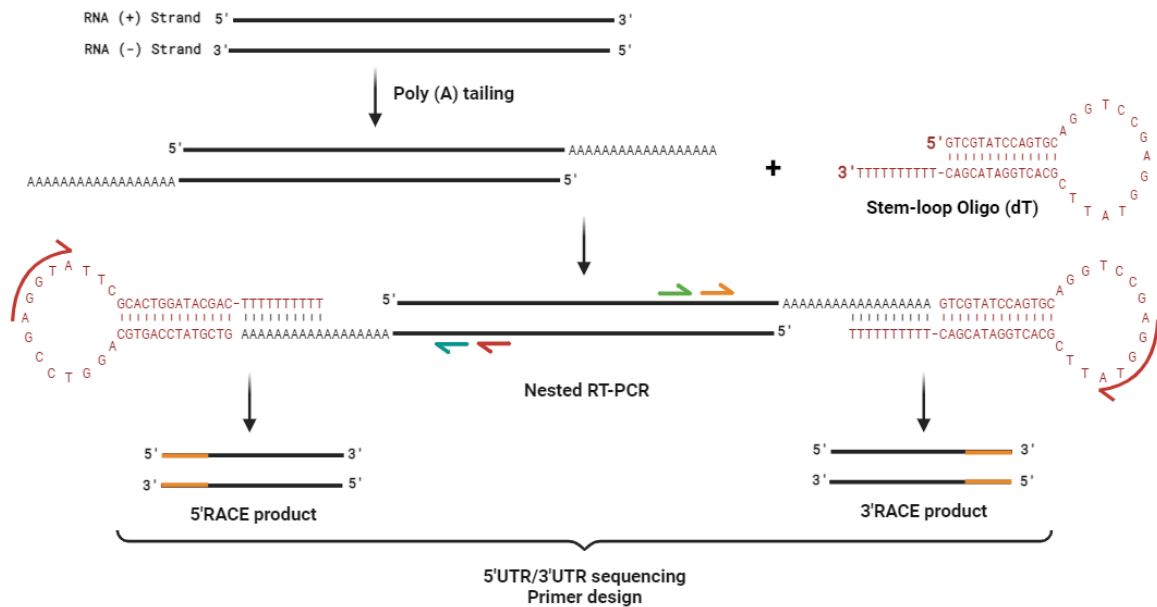


Figura 11. Procedimiento de Stem-loop RACE para la secuenciación de los extremos 5' UTR y 3' UTR de los RNAs de AMV (elaborado en biorender.com).

Primeramente, se cuantificó por espectrofotometría la concentración del extracto de RNA total de AMV-Alfalfa y se evaluó su integridad por el perfil electroforético en un gel al 1.5% de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Seguido a esto, se realizó una reacción de poliadenilación del RNA viral de doble cadena con la siguiente mezcla de reacción en un microtubo: 3 μL de RNA total (623 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 2.5 μL de 10X NEBuffer 2, 2.5 μL de ATP (50 mM), 1 μL de Inhibidor de RNasa (40 unidades/ μL), 1 μL de Poly(U) polimerasa NEB y agua para 25 μL . La reacción se incubó a 37°C por 30 min y después se purificó el RNA poliadenilado agregando 1 volumen de agua Milli-Q estéril más 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó en vortex y se

dejó incubar en hielo por 5 min. Seguido a esto, se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Posteriormente, se precipitó el RNA agregando 1 volumen de etanol absoluto y 2.7 volúmenes de acetato de sodio (3M, pH 5.8) e incubándose a -80°C por 15 min. La mezcla se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4°C y se retiró el sobrenadante con una micropipeta. La pastilla de RNA se resuspendió en 5 µL de agua Milli-Q estéril (el procedimiento de purificación de ácidos nucleicos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación con acetato de sodio (3M, pH 5.8) se nombrará como “purificación por fenolización” de aquí en adelante).

El RNA poliadenilado se utilizó como secuencia molde para la amplificación de los extremos 5' y 3' de cada RNA de AMV por Stem-loop RACE de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción: 0.5 µL de RNA poliadenilado, 2.5 µL de 2X Buffer, 0.5 µL de PVP 10%, 0.5µL de oligonucleótido externo específico (5 mM), 0.5µL de oligonucleótido Stem-loop (dT) (5 mM) 0.05 µL de Inhibidor de RNAsa (40 unidades/µL), 0.2 µL de polimerasa RT-PCR SuperScript III y agua para 5 µL. La reacción se incubó en un termociclador con la siguiente configuración: primer paso de 50°C por 30 min; segundo paso de 96°C por 2 min; tercer paso de 30 ciclos de 96°C por 10 s, 55°C por 10 s, y 68°C por 20 s; cuarto paso de 68°C por 5 min. Una vez terminada la primera amplificación, ésta se utilizó como molde para una segunda amplificación con la siguiente mezcla de reacción: 0.5 µL de DNA molde, 4 µL de 5X Buffer, 1.6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.4 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de oligonucleótido interno específico (5 mM), 2 µL de Stem-loop interno (5 mM), 0.12 µL de GoTaq DNA Polimerasa y agua para 20 µL. La reacción se incubó con la siguiente configuración: primer paso de 95°C por 2 min; segundo paso de 35 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 15 s, y 72°C por 15 s; tercer paso de 72°C por 2 min.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% para observar su perfil electroforético y se purificaron a partir de gel con el kit “QIAquick PCR purification kit” de QIAGEN (ver protocolo en [QIAquick PCR Purification Kit](#)

(qiagen.com)). Una vez purificados, los productos de PCR de Stem-loop RACE fueron enviados al Servicio de Secuenciación de ADN de la Ciudad Politécnica de la Innovación del campus de la Universidad Politécnica de Valencia, para ser secuenciados por el método de Sanger.

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Producto de PCR (bp)
5'RACE-RNA1-Ext	GCAGTTGTGTCGTCTGCAGC	222
5'RACE-RNA1-Int	AAGCATCTCCTGAATGGAGG	181
3'RACE-RNA1-Ext	GTAGAGATGCCGGTAATACC	283
3'RACE-RNA1-Int	TTGGTAATCAATGCCAACC	213
5'RACE-RNA2-Ext	TCGTGGAAGTCTTCGGCAGC	269
5'RACE-RNA2-Int	AAACATGTTTGTAACATTGG	214
3'RACE-RNA2-Ext	CTCGGATGCCAGGTCAAGGG	241
3'RACE-RNA2-Int	TGGGTGGGTCAAGGTTGAGG	171
5'RACE-RNA3-Ext	GACATTCCAGAACTCGAGGC	281
5'RACE-RNA3-Int	GTACGAATTACGCGAATGGG	220
3'RACE-RNA3-Ext	AAGCTGACGATCTTTGATCG	239
3'RACE-RNA3-Int	CTCCACTGGGTGGATTAAGG	169
Stem-loop (dT)	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTCTTCGCACTGGATACGACTTTTTTTTT	-
Stem-loop interno	TGCAGGTCCGAGGTCTTCGC	-

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los extremos 5' y 3' de los RNAs de AMV-Alfalfa por la técnica de Stem-loop RACE.

6.2.3 Amplificación de los componentes genómicos de AMV completos y clonación en el vector binario pLX-B2

Con las secuencias de los extremos 5' y 3' de cada RNA de AMV-Alfalfa identificadas, se diseñaron oligonucleótidos específicos con el sitio de restricción de BsmBI para amplificar cada RNA completo y clonarlo en el vector binario pLX-B2 por medio de restricción enzimática y ligación (Figura 10; Tabla 2). Para esto, primero se realizó la amplificación de cada RNA por RT-PCR usando como molde el RNA poliadenilado previamente. La mezcla de reacción empleada fue: 0.5 µL de RNA poliadenilado, 2.5 µL de 2X Buffer, 0.5 µL de PVP 10%, 0.5µL de oligonucleótido directo específico (5 mM), 0.5µL de oligonucleótido reverso

específico (5 mM), 0.05 μL de Inhibidor de RNAsa (40 unidades/ μL), 0.2 μL de polimerasa RT-PCR SuperScript III y agua para 5 μL . La reacción se incubó con la siguiente configuración: primer paso de 50°C por 30 min; segundo paso de 96°C por 2 min; tercer paso de 30 ciclos de 96°C por 10 s, 57°C por 10 s, y 68°C por 3:48 min; cuarto paso de 68°C por 5 min. Seguido a esto, se reamplificó cada RNA con la siguiente mezcla de reacción: 0.5 μL de DNA molde, 4 μL de 5X Buffer, 1.6 μL de dNTPs (2.5 mM), 2 μL de oligonucleótido directo específico (5 mM), 2 μL de oligonucleótido reverso específico (5 mM), 0.2 μL de polimerasa PrimerStar Takara (2.5 U/ μL) y agua para 20 μL .

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Producto de PCR (bp)
5'RNA1-4268	ACGTCTCAGAGGCGTTTTATCTTACACACG	3702
5'RNA2-4269	ACGTCTCAGAGGCGTTTTATCTTTTCGCGAT	2636
5'RNA2-4270	ACGTCTCAGAGGCGTCTTATCTTTTCGCGAT	2636
5'RNA3-4271	ACGTCTCAGAGGGTATTAATACCATTTTCAAATATTCC	2070
3'-3793	ACGTCTCCGACCCGCATCCCTAGGGGCATTCATG	-

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los RNAs de AMV-Alfalfa completos.

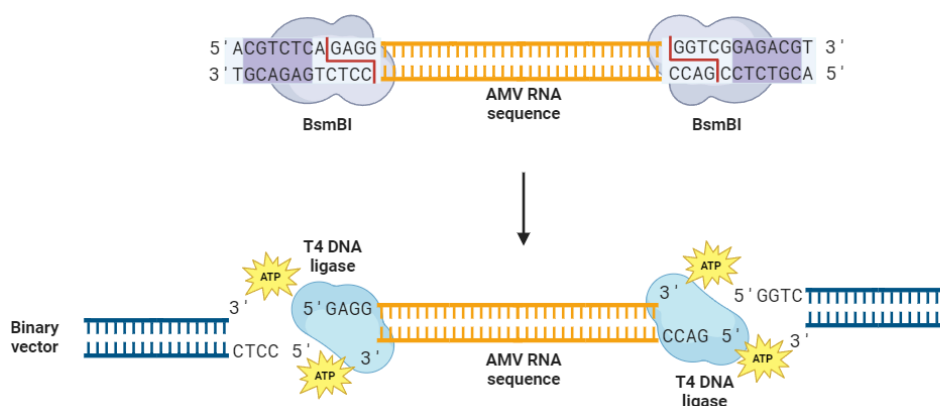


Figura 12. Procedimiento de ligación de RNAs completos de AMV en el vector binario (elaborado en biorender.com).

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% para observar su perfil electroforético y se purificaron a partir de gel. Seguido a esto, se montó una reacción de restricción con la enzima BsmBI por cada producto de PCR de

acuerdo con la siguiente mezcla de reacción: 650 ng de DNA, 6.5 μ L de 10X Buffer Tango, 6.5 μ L de DTT y agua para 65 μ L. La reacción se incubó a 37°C por 3 h y, posteriormente, se purificó el DNA por fenolización. Cada producto fue ligado por separado al vector pLX-B2 (linealizado con los extremos cohesivos correspondientes) de la siguiente manera: 1 μ L de inserto, 0.5 μ L de vector linealizado, 0.8 μ L de 10X Buffer, 0.5 μ L de T4 DNA Ligasa, 0.8 μ L de ATP (10 μ M) y agua para 8 μ L. La reacción de ligación se incubó a 25°C por 30 min para obtener los clones infecciosos (ver construcciones en Figura 13).

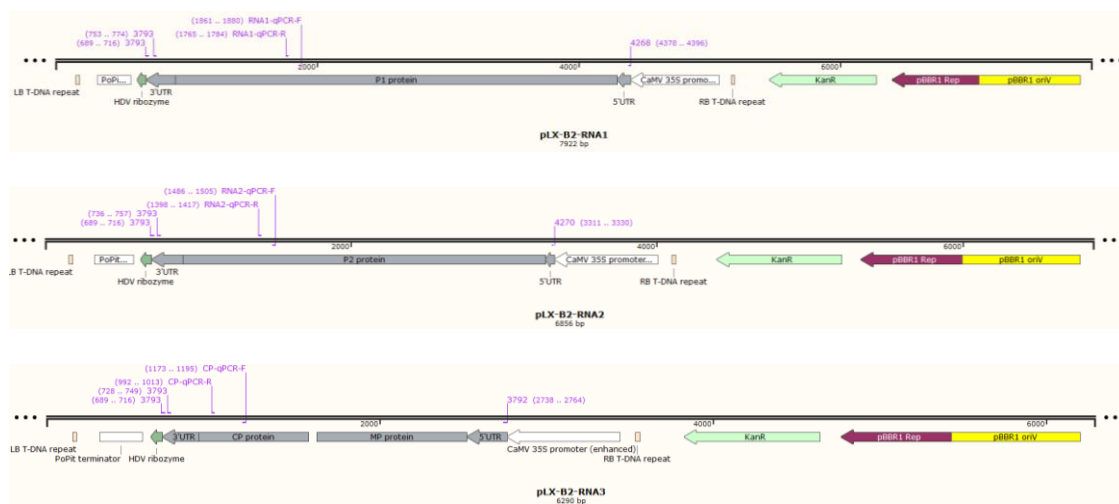


Figura 13. Construcciones de vector binario pLX-B2 con los componentes genómicos de AMV.

6.2.4 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con clones infecciosos de AMV y corroboración por PCR de colonia

Cada clon infeccioso se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por medio de electroporación. Para esto, se agregaron 4 μ L del producto de ligación a 50 μ L de células competentes en frío y se indujo un choque eléctrico a 1600 V en un electroporador. Las células transformantes se incubaron a 37°C por 1 h en medio LB líquido y, posteriormente, se transfirieron a placas de Petri con medio LB sólido con kanamicina (50 μ g/mL) como presión de selección. Las placas se dejaron en incubación a 37°C durante toda la noche y se verificó la

presencia de colonias al día siguiente. Se seleccionaron algunas colonias para corroborar la integración de los clones infecciosos por medio de PCR de colonia con la siguiente reacción: 1 µL de 5X buffer, 0.4 µL de MgCl₂, 0.1 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de oligonucleótido directo (5 µM), 0.5 µL de oligonucleótido reverso (5 µM), 0.03 µL de GoTaq DNA polymerase y agua para 5 µL. Los productos de PCR fueron analizados por su perfil electroforético en gel de agarosa al 1%.

6.2.5 Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* C58 con clones infecciosos de AMV

Las colonias transformantes de *E. coli* con resultado positivo para la integración de los clones infecciosos fueron seleccionadas para extraer DNA plasmídico por el método de lisis alcalina. Esto se realizó utilizando el kit “ZR Plasmid Miniprep kit-Classic” de ZYMO Research (ver protocolo en [ZR Plasmid Miniprep - Classic \(zymoresearch.com\)](http://www.zymoresearch.com)). Los plásmidos extraídos se utilizaron para transformar células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación siguiendo el mismo protocolo empleado para la transformación de las células de *E. coli* en el paso anterior. Seguido a esto, se incubaron las células transformantes a 28°C por 48 h en medio LB sólido con kanamicina (50 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL) como presión de selección, y se seleccionaron colonias transformantes al término de la incubación.

6.3 Ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de *N. benthamiana*

En el presente trabajo se realizaron cuatro ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de *N. benthamiana*, cada uno de ellos con un objetivo distinto. El primer ensayo tuvo la finalidad de evaluar la funcionalidad de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa construidos. El segundo ensayo se realizó para evaluar la capacidad de movimiento sistémico no ligado a la replicación de

los RNAs de AMV. Con el tercer ensayo se evaluó el movimiento sistémico de los RNAs de AMV co-inoculados en distintas hojas. Y, por último, pero no menos importante, con el cuarto ensayo se intentó estudiar la acumulación diferencial del RNA2 entre los aislados de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis.

Cabe mencionar que todos los ensayos de agroinfiltración se realizaron en plantas de *N. benthamiana* con 5 semanas de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo 16:8 h (luz:oscuridad). De igual forma, todos los ensayos siguieron el mismo procedimiento de cultivo, resuspensión en medio de infiltración e inoculación de los clones infecciosos de AMV.

6.3.1 Cultivo en medio líquido de células transformantes de *A. tumefaciens* C58 y resuspensión en medio de infiltración

Las colonias transformantes de *A. tumefaciens* con los clones infecciosos de AMV fueron cultivadas en medio LB líquido con kanamicina (50 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL) a 28°C y 200 rpm durante una noche. Al día siguiente, se centrifugó cada cultivo a 4000 rpm por 5 min y se descartó el medio agotado. La biomasa se resuspendió en 200 µL de medio de infiltración (10 mM MES pH: 5.6; 10 mM MgCl₂) y se midió la densidad óptica $\lambda_{600\text{nm}}$. De acuerdo con la medida de OD $\lambda_{600\text{nm}}$, se ajustó cada cultivo a un valor final de 0.3 en medio de infiltración.

6.3.2 Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con clones infecciosos de AMV

Las hojas de *N. benthamiana* fueron agroinfiltradas en la parte abaxial con ayuda de una jeringa de insulina de 1 mL. Dependiendo del ensayo de agroinfiltración realizado, se hicieron las combinaciones de clones infecciosos correspondientes. Las plantas infiltradas se mantuvieron en condiciones de invernadero a 24°C y un fotoperiodo 16:8 h (luz:oscuridad) hasta la colección de tejido para análisis.

6.3.3 Extracción de RNA total de hojas de *N. benthamiana*

Se extrajo RNA total por el método de Logemann (1987) de las hojas colectadas para la detección de los componentes genómicos de AMV. Para esto, se colocaron ~0.5 g de tejido foliar en un microtubo de 2 mL y se maceró el tejido con ayuda de un pistilo y nitrógeno líquido. Se agregaron 700 μ L de buffer de extracción (8 M hidrocloreuro de guanidinio, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM β -mercaptoetanol, pH 7.0) y se agitó vigorosamente en vortex. Los tubos se centrifugaron por 10 min a 16,000 g y se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1 mL nuevo. En el tubo nuevo se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex y se centrifugó por 45 min a 16,000 g a 4°C. La fase superior se transfirió a un microtubo nuevo de 1 mL nuevo. La separación con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se repitió centrifugando ahora por 15 min a 16,000 g a 4°C y la fase superior se transfirió a un microtubo nuevo. Después, se agregaron 0.7 volúmenes de etanol absoluto frío y 0.2 volúmenes de ácido acético 1 M. Se agitó en vortex y se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente, el RNA precipitado se centrifugó por 15 min a 16,000 g a 4°C y se retiró el sobrenadante. Seguido a esto, se lavó la pastilla de RNA con 500 μ L de acetato de sodio (3 M estéril a pH 5.2), se agitó en vortex y se centrifugó por 5 min a 16,000 g a 4°C. Se retiró el sobrenadante y, seguido a esto, se realizaron 2 lavados con 500 μ L de etanol al 70%. En el lavado final, se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. El RNA se resuspendió en agua Milli-Q estéril y se almacenó a -80°C.

6.3.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA total de hoja

Para cada muestra de RNA total, se cuantificó la concentración en un espectrofotómetro (NanoDrop) y se ajustó a 200 ng/ μ L para la síntesis de cDNA por RT-PCR. El procedimiento para la reacción de RT-PCR fue el siguiente: Se agregaron 2 μ L de RNA total (200 ng/ μ L), 2 μ L de Oligos Random Hexamers (10

μM), 1 μL de dNTPs (10 mM) y 9 μL de agua Milli-Q estéril. La mezcla se incubó a 70°C por 5 min y, seguido a esto, se dejó reposar en hielo por 2 min. Se agregaron 4 μL de Buffer 5X, 1 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de retrotranscriptasa. La reacción se incubó a 50°C por 60 min y después se inactivó la enzima a 80°C por 15 min.

6.3.5 Detección de componentes genómicos de AMV por PCR

A partir de cada muestra de cDNA, se realizó la amplificación de los componentes genómicos de AMV por PCR de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción: 2 μL de cDNA, 0.25 μL de oligonucleótido específico directo (10 μM), 0.25 μL de oligonucleótido específico reverso (10 μM), 5 μL de Mastermix Eppendorf 2.5X y agua para 12.5 μL . La reacción se incubó en un termociclador con el siguiente programa: primer paso de 95°C por 1:30 min; segundo paso de 35 ciclos de 95°C por 25 s, 58°C por 40 s, y 72°C por 16 s o 1:16 s (para el fragmento corto y el fragmento largo, respectivamente; ver Figura 14); tercer paso de 72°C por 2 min. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos cortos y largos de cada componente genómico se muestran en la tabla 3. Cada producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 2% para observar su perfil electroforético.

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Producto (bp)
RNA1-qPCR-F	ACCAATCTTGCGTCTTTGCC	116
RNA1-qPCR-R	TTTTCCGCAACCAGCAACTC	
RNA2-qPCR-F	AGATGCGCTCACATACTTGG	108
RNA2-qPCR-R	TCATCACC GGAAGCAACAAC	
RNA3-qPCR-F	CCCATGCAAGAATTCCTCAAGG	204
RNA3-qPCR-R	TCTCTCGACCCAAACTTCGTTG	
3'3793	ACGTCTCCGACCCGCATCCCTTAGGGGCATTCATG	1186 / 811 / 501 (RNA1 / RNA2 / RNA3)

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los RNAs de AMV-Alfalfa.

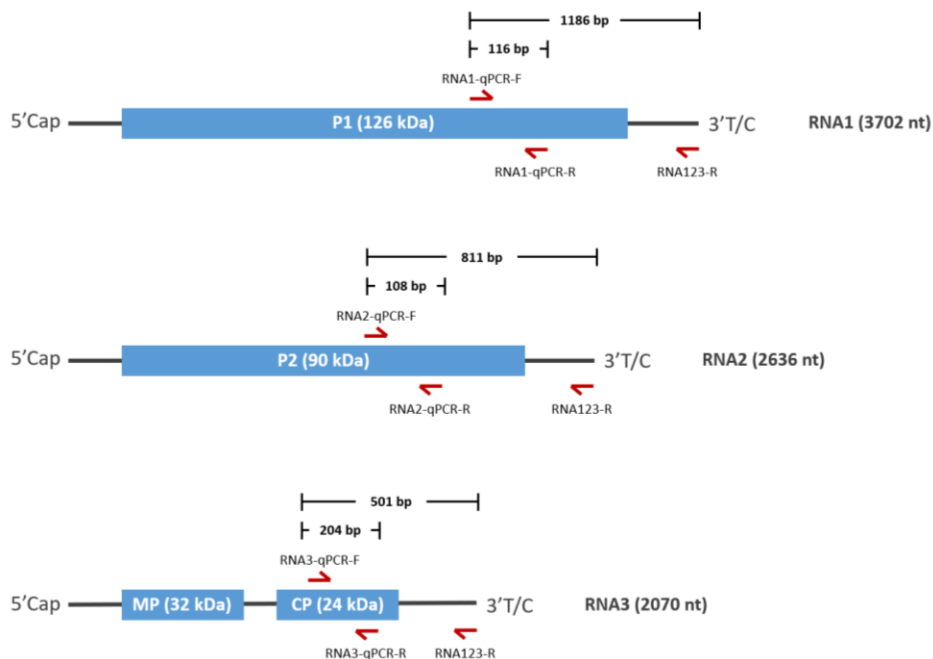


Figura 14. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los RNAs de AMV-Alfalfa.

6.3.6 Síntesis de sondas de RNA para hibridaciones moleculares tipo Dot blot y Northern blot

Para las hibridaciones moleculares tipo Dot blot y Northern blot, se sintetizaron sondas de RNA marcadas con Dig-11-UTP. Para esto, primero se amplificaron las secuencias correspondientes para cada componente genómico de AMV usando los oligonucleótidos empleados para la detección por PCR de los fragmentos cortos de cada RNA viral (tabla 3). La amplificación se realizó con la siguiente mezcla de reacción: 1.25 μ L de 10X Thermopol buffer, 0.25 μ L de 10mM dNTPs, 0.35 μ L de oligonucleótido específico directo, 0.35 μ L de oligonucleótido específico reverso, 0.05 μ L de Taq Polimerasa NEB, 1.5 μ L de DNA molde y agua para 12.5 μ L. Se prepararon 3 tubos de reacción por cada amplicón y se cargaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% para ser purificados con el kit “QIAquick PCR purification kit” de QIAGEN. Después, los productos purificados se ligaron al vector pDrive (ver construcciones en Figura 15) con la siguiente mezcla de reacción: 2.5 μ L de buffer de reacción, 0.5 μ L de vector pDrive y 2 μ L

de producto de PCR purificado. La reacción se dejó incubando a 16°C toda la noche y, al día siguiente, se utilizó el volumen total de cada reacción para transformar células competentes de *E. coli* Mach1-T1 por el método de choque térmico.

Para el choque térmico, se agregaron los 5 µL de la reacción de ligación a 50 µL de células competentes de *E. coli* Mach1-T1 y se dejaron reposar por 30 min en hielo. Seguido a esto, se incubaron por 52 s a 42°C y, rápidamente, se regresaron a hielo por 5 min. Después del choque térmico, se agregaron 250 µL de medio SOC líquido y se dejaron incubando por 1 h en agitación a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación, se transfirieron las células transformantes a placas con medio LB sólido con kanamicina (50 µg/mL) como presión de selección, así como X-gal (80 µg/mL) e IPTG (50 µM) para la selección de colonias blancas-azules. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y, al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas para ser analizadas.

Las colonias blancas seleccionadas se cultivaron en medio LB líquido con kanamicina (50 µg/mL) en agitación a 37°C durante toda la noche y se utilizaron para extraer DNA plasmídico con el kit “ZR Plasmid Miniprep kit-Classic” de ZYMO Research. Por cada construcción, se realizó una amplificación por PCR para corroborar la inserción y orientación de las sondas de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción: 1.5 µL de DNA molde, 0.25 µL de oligonucleótido específico directo (10 µM), 0.25 µL de oligonucleótido específico reverso (10 µM), 5 µL de Mastermix Eppendorf 2.5X y agua para 12.5 µL. La reacción se incubó en un termociclador con el siguiente programa: primer paso de 95°C por 1:30 min; segundo paso de 35 ciclos de 95°C por 25 s, 58°C por 40 s, y 72°C por 18 s; tercer paso de 72°C por 2 min. Las construcciones con inserción y orientación correcta se sometieron a una restricción enzimática para linealizar el vector con la siguiente mezcla de reacción: 6.5 µL de 10X Buffer CutSmart, 3.5 µL de enzima HindIII-HF, 27 µL de DNA plasmídico y agua para 65 µL. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y se purificó por fenolización.



Figura 15. Construcciones de vector pDrive con secuencias de los componentes genómicos de AMV para la síntesis de sondas de RNA marcadas con Dig-11-UTP.

Finalmente, los vectores linealizados se utilizaron para realizar reacciones de transcripción in vitro con Dig-11-UTP. Para esto, se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 2 μ L de 10X Buffer, 2 μ L de vector linealizado, 1 μ L de 10 mM ATP, 1 μ L de 10 mM CTP, 1 μ L de 10 mM GTP, 0.6 μ L de 10 mM UTP, 0.4 μ L de Dig-11-UTP, 2 μ L de T7 polimerasa y agua para 20 μ L. La reacción se incubó por 2 h a 37°C y, al terminar, se agregó un volumen de formamida a cada reacción y se almacenaron a -80°C.

6.3.7 Detección de componentes genómicos de AMV por hibridaciones moleculares tipo Dot blot

En el caso de las detecciones por hibridación molecular tipo Dot blot, se realizaron extracciones rápidas de RNA de tejido infectado de la siguiente forma: Se colectaron de 2 a 3 hojas y se metieron en bolsas de plástico estériles a temperatura ambiente. Se agregaron de 2 a 5 mL de buffer de citrato (Citrato

sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.5) y se maceró el tejido hasta obtener un extracto líquido de las hojas. De este extracto, se colocaron 5 µL en una membrana de nylon cargada positivamente y se fijó el RNA a la membrana al incidir luz UV por 3 min. Posteriormente, se realizó la hibridación molecular con sondas marcadas con Dig-11-UTP específicas para cada componente genómico de AMV (procedimiento que, a partir de este momento, será mencionado como hibridación molecular con sonda de RNA Dig-11-UTP).

Para realizar la hibridación molecular con sonda de RNA Dig-11-UTP, se siguió el siguiente procedimiento:

1. La membrana de nylon con RNA total fijado se introduce en un tubo de hibridación y se deja incubando en solución de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 0.1% N-laurilsarcosina, 0.02% SDS, 2% solución de bloqueo) por 2 h en un horno rotatorio a 68°C.
2. Se descarta la solución de hibridación y se incuba con la sonda de RNA Dig-11-UTP en rotación a 68°C durante toda la noche.
3. La sonda se recupera y se realizan dos lavados con buffer de lavado 1 (2X SSC, 0.1% SDS) por 5 min en rotación a temperatura ambiente.
4. Se realizan 2 lavados con buffer de lavado 2 (0.1X SSC, 0.1% SDS) por 15 min en rotación a 68°C.
5. Se equilibra la membrana en buffer 1 (Ácido maleico 100 mM, Cloruro de sodio 150 mM, pH 7.5) + 0.3% Tween 20 por 10 min en rotación a temperatura ambiente (a partir de aquí, todos los pasos se realizan a temperatura ambiente).
6. La membrana se bloquea en solución de bloqueo (1% Hidrolizado de caseína en buffer 1) por 30 min en rotación.
7. Una vez bloqueada la membrana, se incuba con el anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments 1:10000 en solución de bloqueo por 30 min en rotación.

8. Se recupera el anticuerpo y se realizan dos lavados con buffer 1 + 0.3% Tween 20 por 10 min en rotación.
9. Se equilibra la membrana en buffer 3 (100 mM Tris-HCL, 100 mM Cloruro de sodio, pH 9.5) por 5 min en rotación.
10. La membrana se retira del tubo de hibridación y se coloca dentro de una bolsa de plástico estéril. Dentro de la bolsa, la membrana se incuba con solución de revelado (Reactivo CSPD 1:100 en buffer 3) por 5 min en oscuridad.
11. Finalmente, la membrana se revela en un equipo de detección de quimioluminiscencia a un tiempo de exposición adecuado.

6.3.8 Detección de componentes genómicos de AMV por hibridaciones moleculares tipo Northern blot

Para las detecciones por Northern blot, se cargaron las muestras de RNA total en un gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes (1.5% Agarosa, 3% Formaldehído, en buffer 1X MOPS) y se obtuvieron sus perfiles electroforéticos a 60V por aproximadamente 1:20 h. Seguido a esto, se montó el sistema de transferencia de RNA como se ilustra en la figura 14. La transferencia del RNA a la membrana de nylon cargada positivamente se dejó trabajando toda la noche y, al día siguiente, se retiró la membrana y se fijó el RNA con luz UV por 3 min. Seguido a esto, se siguió el protocolo de hibridación molecular con sonda de RNA Dig-11-UTP descrito previamente.

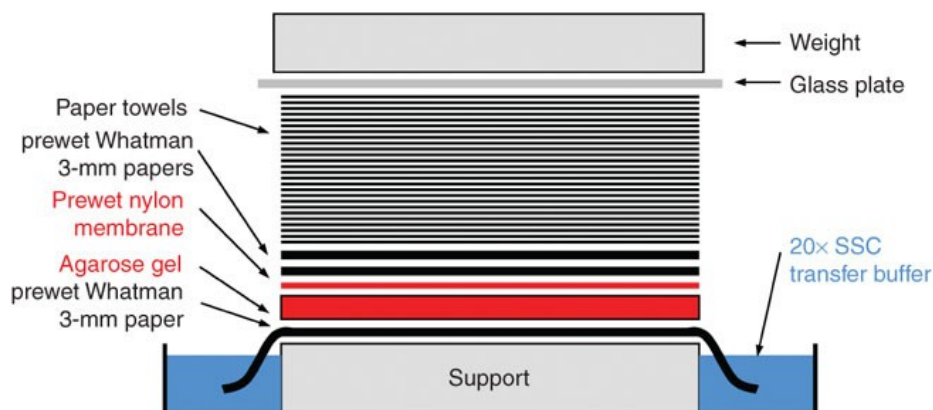


Figura 16. Sistema de transferencia de RNA para Northern blot (Adaptado de Streit et al., 2009).

6.4 Caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa

Con el fin de analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se realizó la caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa a nivel de RNA y de proteína.

6.4.1 Secuenciación de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa

Las construcciones de clones infecciosos de AMV-Alfalfa fueron enviadas al Servicio de Secuenciación de ADN de la Ciudad Politécnica de la Innovación del campus de la Universidad Politécnica de Valencia, para ser secuenciadas por el método de Sanger. Las secuencias de los electroferogramas fueron ensambladas con ayuda del programa GeneStudio y se editaron las ambigüedades manualmente para obtener las secuencias completas de cada componente genómico de AMV-Alfalfa.

6.4.2 Identificación de dominios conservados en componentes genómicos de AMV-Alfalfa

Con base en las secuencias de los componentes genómicos de AMV-Alfalfa, se analizaron las regiones 5'UTR y 3'UTR para identificar dominios importantes reportados en la bibliografía.

6.4.2.1 Alineamiento de secuencias 5'UTR y 3'UTR de AMV

Iniciando con el análisis de las regiones 5'UTR y 3'UTR, se realizaron alineamientos de las secuencias reportadas de diversos aislados de AMV, incluyendo AMV-Alfalfa, AMV-Arabidopsis y AMV-Leiden. Para esto, primero se realizaron alineamientos de RNA tipo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) por cada RNA de AMV-Alfalfa para encontrar las secuencias que más se parecieran. Los 50 primeros resultados fueron descargados en formato (.fasta) y se agregaron las secuencias de los aislados AMV-Alfalfa, AMV-Arabidopsis y AMV-Leiden a cada archivo generado. Seguido a esto, se realizó el alineamiento múltiple de cada archivo con el algoritmo ClustalW del programa MEGA XI y se analizaron los resultados.

6.4.2.2 Análisis de estructuras secundarias de regiones 3'UTR de AMV

Para estudiar las estructuras secundarias de las regiones 3'UTR de los RNAs virales de los aislados AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, estas secuencias fueron cargadas en el servidor de UNAFold RNA folding form 2.3 (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form-v2.php>) y se predijeron sus estructuras secundarias con los parámetros default. De los resultados obtenidos, se eligieron aquellos con la menor energía libre de Gibbs (ΔG) y se descargaron sus archivos en formato (.ct). Los archivos (.ct) se cargaron al programa VARNA y se visualizaron las estructuras secundarias generadas (Darty et al., 2009).

6.4.3 Identificación de dominios conservados en proteínas de AMV-Alfalfa

Las secuencias de nucleótidos de cada RNA de AMV-Alfalfa fueron traducidas en el servidor de Expasy Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>) para obtener las secuencias de aminoácidos de las proteínas P1, P2, MP y CP. Por cada secuencia, se realizó el alineamiento de aminoácidos con sus respectivas contrapartes de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Leiden en el MEGAXI. Con los alineamientos generados, se identificaron los dominios conservados reportados en la bibliografía (Vlot et al., 2002; Vlot et al., 2003; Bol, 2008).

6.5 Construcción de clones infecciosos híbridos del RNA2 de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis

Para verificar el efecto de la región 3'UTR en la diferencia de acumulación del RNA2 entre el aislado de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, se construyeron dos clones infecciosos híbridos intercambiando las regiones 3'UTR entre ambos aislados. Para esto, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar cada una de las regiones 3'UTR, así como la región 5'UTR unida a la región codificante de cada aislado y se clonaron en el vector binario pLX-B2 por medio de la estrategia de clonación previamente descrita.

6.5.1 Diseño de oligonucleótidos para la construcción de clones infecciosos híbridos

Se diseñaron dos oligonucleótidos que se alinearan al término de la región codificante y al comienzo de la región 3'UTR para poder amplificar, por un lado, la región 5'UTR unida a la región codificante y, por otro lado, la región 3'UTR de cada aislado (Figura 17).

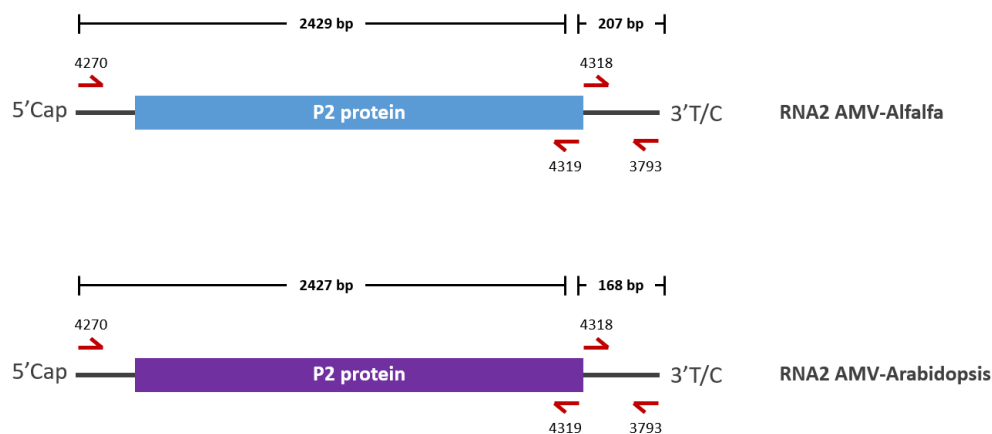


Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para la construcción de los RNAs híbridos de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis.

6.5.2 Amplificación y clonación de las secuencias híbridas en el vector binario pLX-B2

Usando los oligonucleótidos diseñados, se amplificaron los fragmentos descritos con la siguiente mezcla de reacción: 0.5 μ L de DNA molde, 4 μ L de 5X Buffer, 1.6 μ L de dNTPs (2.5 mM), 2 μ L de oligonucleótido directo específico (5 mM), 2 μ L de oligonucleótido reverso específico (5 mM), 0.2 μ L de polimerasa PrimerStar Takara (2.5 U/ μ L) y agua para 20 μ L. Adicionalmente, se amplificó la secuencia completa del RNA2 del aislado de AMV-Arabidopsis utilizando el oligonucleótido directo 4270 para verificar que el cambio de nucleótido en la posición 5 no afectara su función.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron con el kit “QIAquick PCR purification kit” de QIAGEN. Los productos purificados se cortaron con la enzima de restricción BsmBI con el procedimiento previamente descrito y se purificaron los productos por fenolización. Los fragmentos se ligaron intercambiando las regiones 3'UTR entre cada aislado de AMV y las construcciones generadas se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5 α . Se extrajo el DNA plasmídico de las células transformantes y se transformaron células de *A. tumefaciens* C58 con las construcciones híbridas del RNA2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Construcción de clones infecciosos de AMV

Siguiendo la metodología previamente descrita, se construyeron los clones infecciosos de AMV-Alfalfa para realizar los ensayos de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*.

7.1.1 Alineamiento de secuencias reportadas de los componentes genómicos de AMV para el diseño de oligonucleótidos para la técnica de Stem-loop RACE

Primeramente, se realizó el alineamiento de las secuencias de los componentes genómicos de AMV reportadas en bases de datos. Por cada extremo 5'UTR y 3'UTR de cada componente genómico, se diseñaron dos oligonucleótidos que se alinearan entre 150 y 300 nt de cada extremo (Figuras 18-23).



Figura 18. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA1 de distintos aislados de AMV.

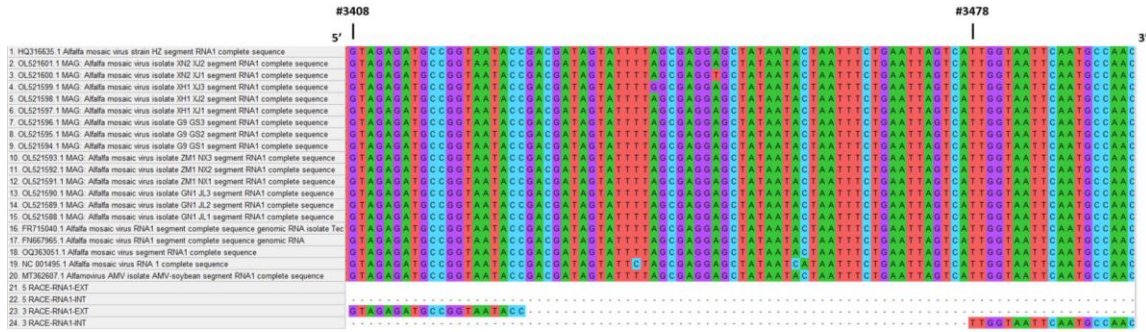


Figura 19. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA1 de distintos aislados de AMV.

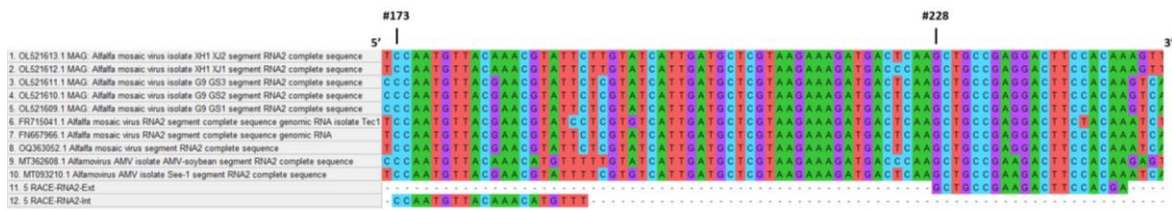


Figura 20. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA2 de distintos aislados de AMV.

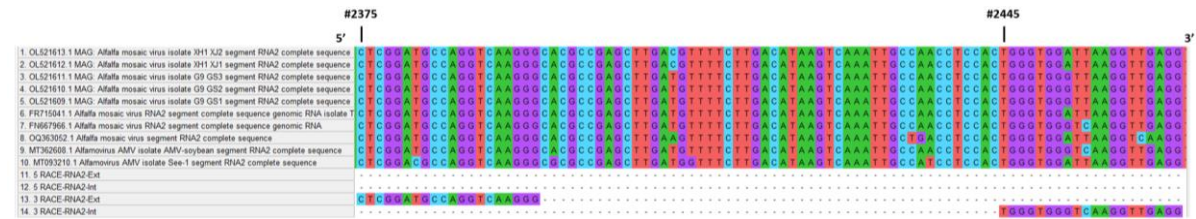


Figura 21. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA2 de distintos aislados de AMV.

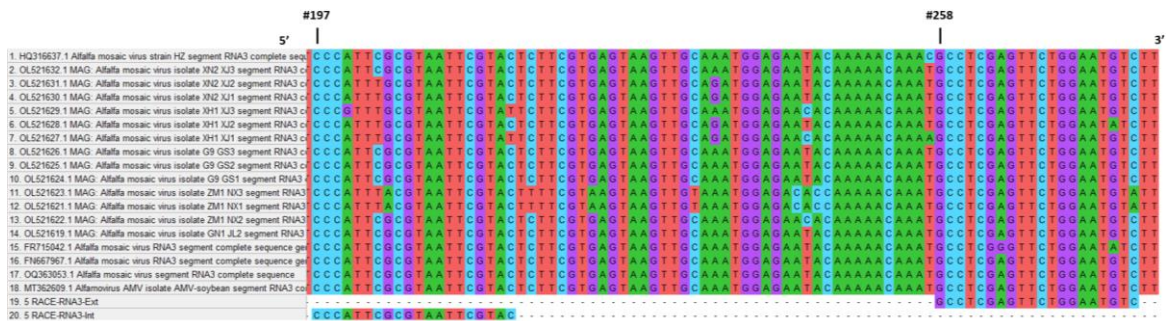


Figura 22. Alineamiento de secuencias de la región 5'UTR del RNA3 de distintos aislados de AMV.

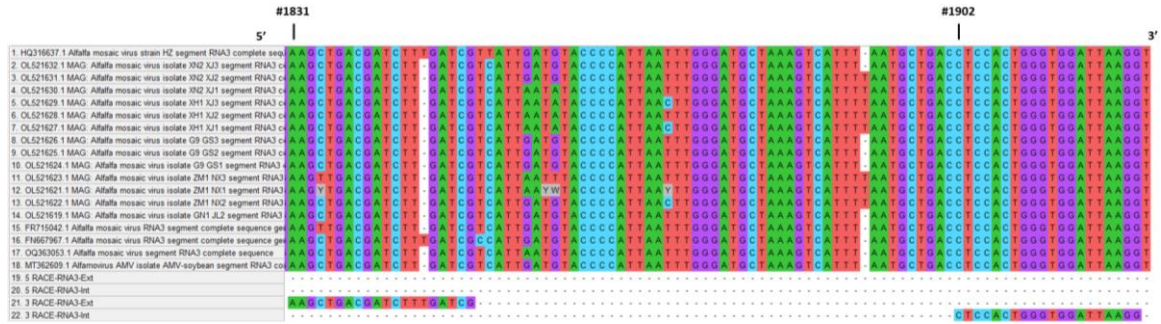


Figura 23. Alineamiento de secuencias de la región 3'UTR del RNA3 de distintos aislados de AMV.

7.1.2 Amplificación y secuenciación de los extremos 5' y 3' de los componentes genómicos del aislado de AMV-Alfalfa

Siguiendo la metodología de la técnica de Stem-loop RACE, se amplificaron y secuenciaron los extremos 5' y 3' de cada componente genómico de AMV-Alfalfa (Figuras 24 y 25). Con base en estas secuencias, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para amplificar los componentes genómicos completos y construir los clones infecciosos de AMV-Alfalfa.

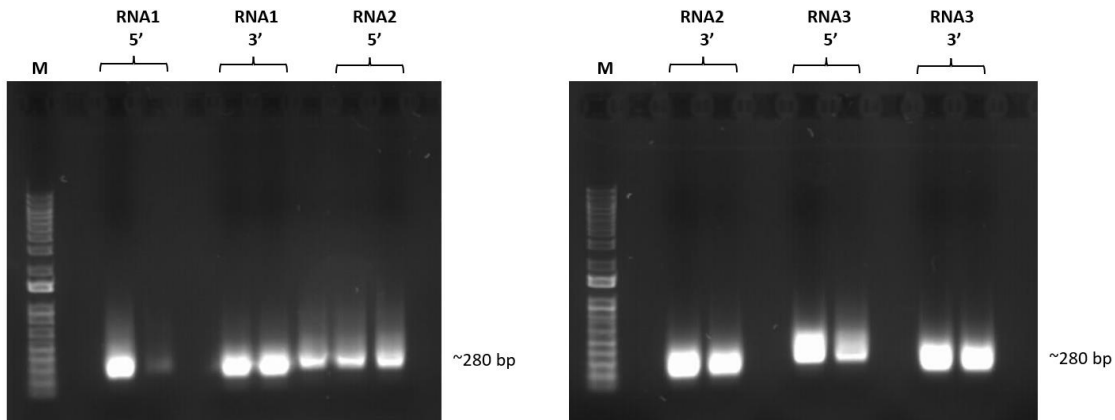


Figura 24. Perfil electroforético de los productos de PCR de los extremos 5' y 3' de cada componente genómico de AMV-Alfalfa.

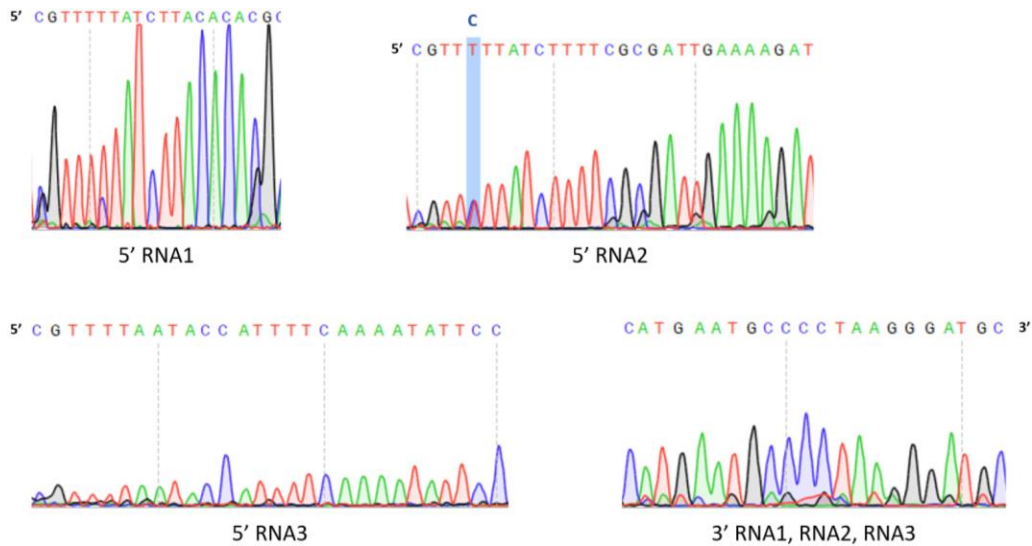


Figura 25. Secuencias de los extremos 5' y 3' de cada componente genómico de AMV-Alfalfa.

En el caso del extremo 5' del RNA2, se encontró que estaban presentes dos secuencias con una base nitrogenada distinta en la posición 5: timina y citosina. Debido a esto, se diseñaron dos oligonucleótidos distintos para la construcción del clon infeccioso del RNA2 (5'RNA2-4269 con T en la posición 5 y 5'RNA2-4270 con C en la posición 5). Por otro lado, los últimos nucleótidos de los extremos 3' de los tres componentes genómicos resultaron ser idénticos entre sí, por lo que tan sólo se diseñó un oligonucleótido reverso para la construcción de los clones infecciosos.

7.1.3 Amplificación y clonación en el vector binario pLX-B2 de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa

En la figura 26 se muestra el perfil electroforético de los productos de PCR de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa. Cada producto fue purificado y clonado en el vector binario pLX-B2 para la construcción de clones infecciosos, con los cuales se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α.

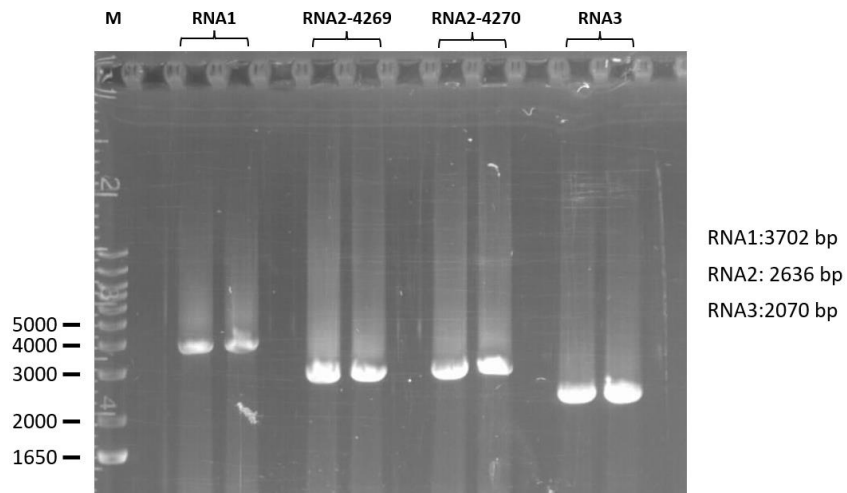


Figura 26. Perfil electroforético de los productos de PCR de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa.

7.1.4 Análisis de células transformantes de *E. coli* DH5α por PCR de colonia

Las células transformantes de *E. coli* fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la inserción de los componentes genómicos completos dentro del vector binario (Figura 27). En el caso de la construcción pLX-B2-RNA1, se obtuvieron 2 de 6 clonas positivas; para la construcción pLX-B2-RNA2-4269, se obtuvieron 4 de 7 clonas positivas; para la construcción pLX-B2-RNA2-4270, se obtuvieron 5 de 6 clonas positivas y; finalmente, para la construcción pLX-B2-RNA3, se obtuvieron 6 de 8 clonas positivas.

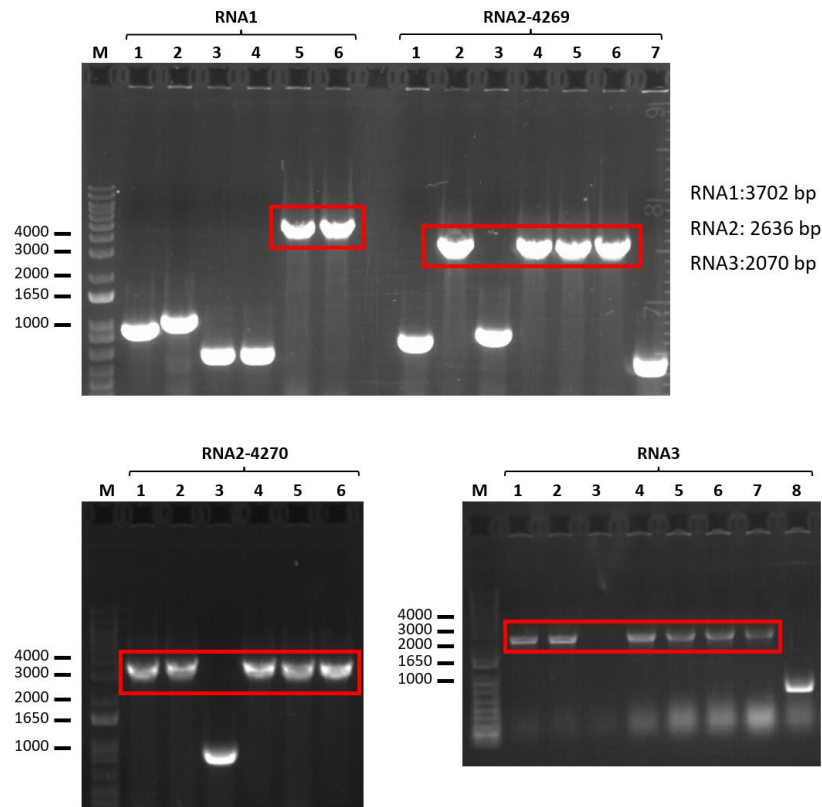


Figura 27. Perfil electroforético de los productos de PCR de colonia de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa en células transformantes de *E. coli* DH5α.

7.2 Caracterización molecular del aislado AMV-Alfalfa

Después de corroborar la inserción de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa en el vector binario pLX-B2, se procedió a realizar la caracterización molecular de este aislado viral.

7.2.1 Secuenciación de los componentes genómicos completos de AMV-Alfalfa

Con el ensamble de secuencias de los electroferogramas obtenidos por secuenciación, se obtuvieron las secuencias completas de los tres RNAs de AMV-Alfalfa (Ver Anexo 1). Con base en estas secuencias, se realizó la caracterización molecular de los RNAs de AMV-Alfalfa. En primera instancia, se

identificaron las regiones 5'UTR, 3'UTR, ORF e intergénicas de cada componente genómico, anotando su longitud en la tabla 4.

Categoría	RNA1 AMV-Alfalfa	RNA2-4270 AMV-Alfalfa	RNA3 AMV-Alfalfa
Longitud total (nt)	3702	2636	2070
Longitud 5'UTR (nt)	100	56	240
Longitud 3'UTR (nt)	221	207	222
Longitud ORF (nt / aa)	P1: 3381 / 1126	P2: 2373 / 790	MP: 903 / 301 CP: 657 / 219
Longitud región intergénica (nt)	-	-	48

Tabla 4. Longitud de regiones importantes de los componentes genómicos de AMV-Alfalfa.

7.2.2 Identificación de dominios conservados en componentes genómicos de AMV-Alfalfa

Seguido a la identificación de las regiones 5'UTR, 3'UTR y ORFs, se realizó la identificación de los dominios conservados a nivel de RNA de los componentes genómicos de AMV. Como primer paso, se obtuvieron los alineamientos de las regiones 5'UTR y 3'UTR de distintos aislados de AMV (incluidos AMV-Alfalfa, AMV-Arabidopsis y AMV-Leiden). Para el caso de la región 5'UTR, se encontró que no hay diferencia significativa en cuanto a longitud e identidad dentro de los primeros 80, 56 y 64 nucleótidos del RNA1, RNA2 y RNA3, respectivamente (Figuras 28, 30 y 32).

Por otro lado, para el caso de la región 3'UTR, se encontró que tampoco existe una diferencia significativa en cuanto a identidad de las secuencias analizadas. Sin embargo, los RNAs de AMV-Alfalfa tienen la peculiaridad de estar extendidos por duplicaciones de los últimos 58, 41 y 33 nucleótidos (del RNA1, RNA2 y RNA3, respectivamente; Figuras 29, 31 y 33). Esto supone un hallazgo interesante puesto que, de las secuencias reportadas de AMV, ninguna cuenta con duplicaciones del extremo 3'.

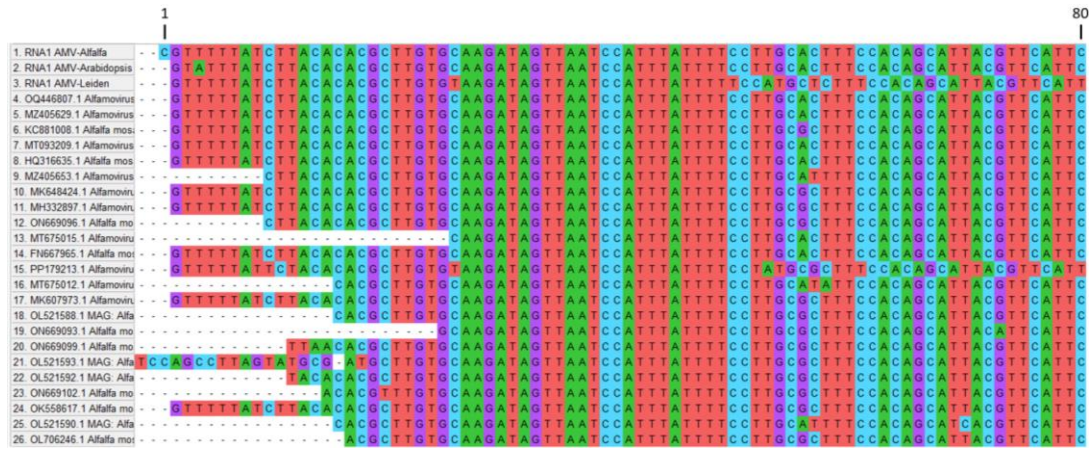


Figura 28. Alineamientos de los extremos 5' del RNA1 de distintos aislados de AMV.

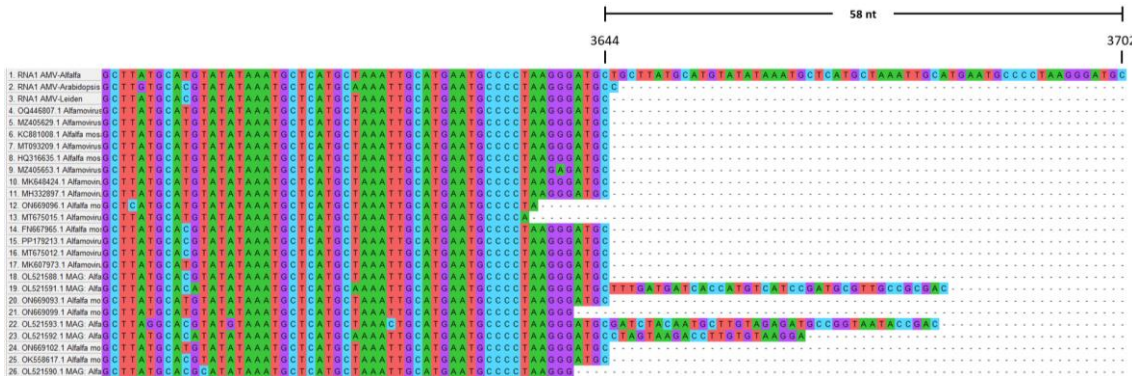


Figura 29. Alineamientos de los extremos 3' del RNA1 de distintos aislados de AMV.

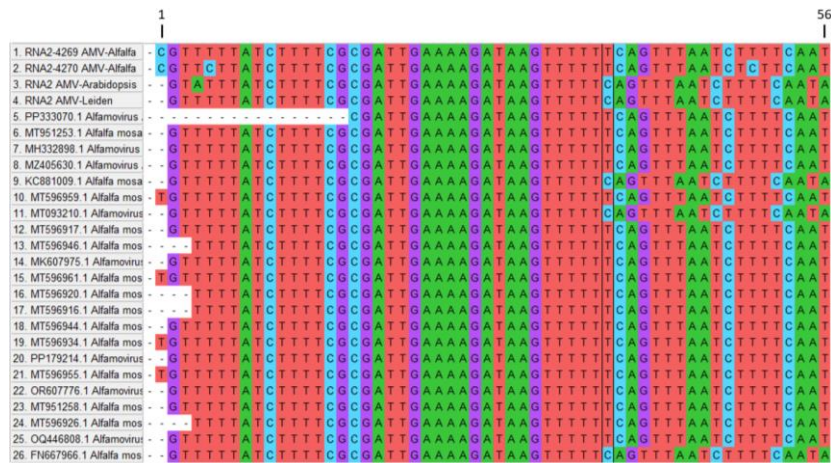


Figura 30. Alineamientos de los extremos 5' del RNA2 de distintos aislados de AMV.

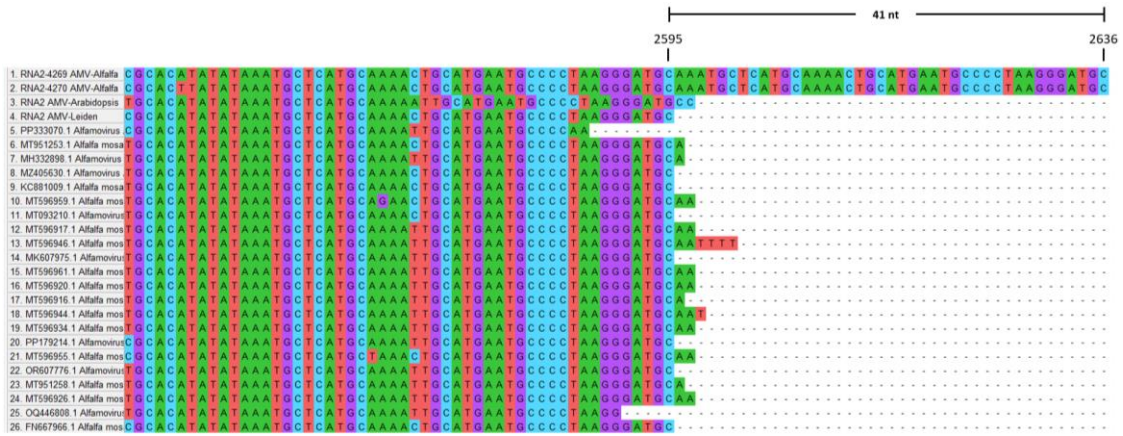


Figura 31. Alineamientos de los extremos 3' del RN2 de distintos aislados de AMV.

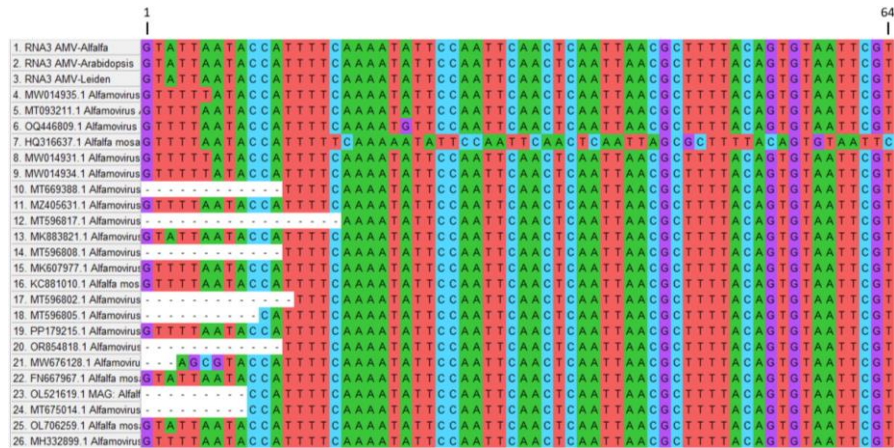


Figura 32. Alineamientos de los extremos 5' del RNA3 de distintos aislados de AMV.

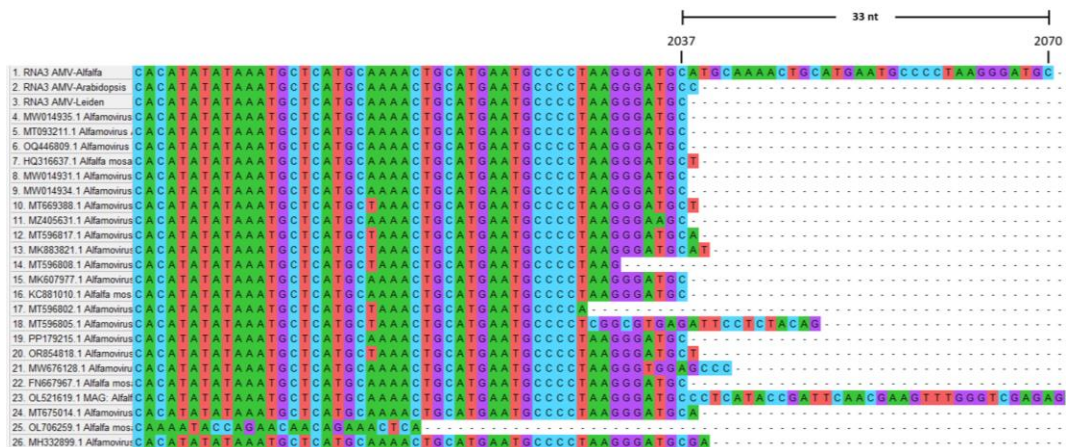


Figura 33. Alineamientos de los extremos 3' del RN3 de distintos aislados de AMV.

7.2.2.1 Análisis de estructuras secundarias de regiones 3'UTR de AMV

Viendo el resultado anterior, se modelaron las estructuras secundarias de las regiones 3'UTR de AMV-Alfalfa y se compararon con sus contrapartes de AMV-Arabidopsis para identificar los dominios conservados de la región 3'UTR y observar si, se alguna forma, el extremo 3' extendido del aislado AMV-Alfalfa modificaba la estructura de estos.

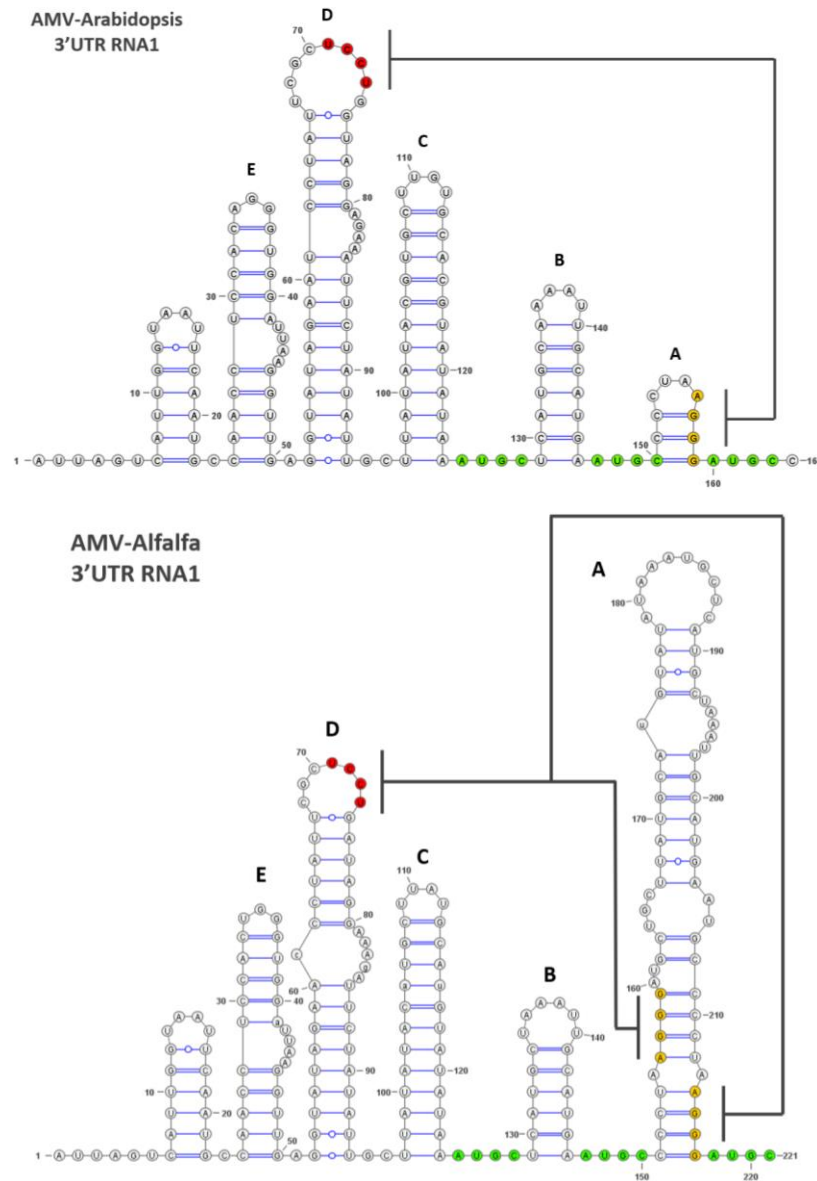


Figura 34. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA1 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa (Rojo: Secuencia 5'-UCCU-3'; Verde: Secuencia 5'-AUGC-3'; Amarillo: Secuencia 5'-AGGG-3').

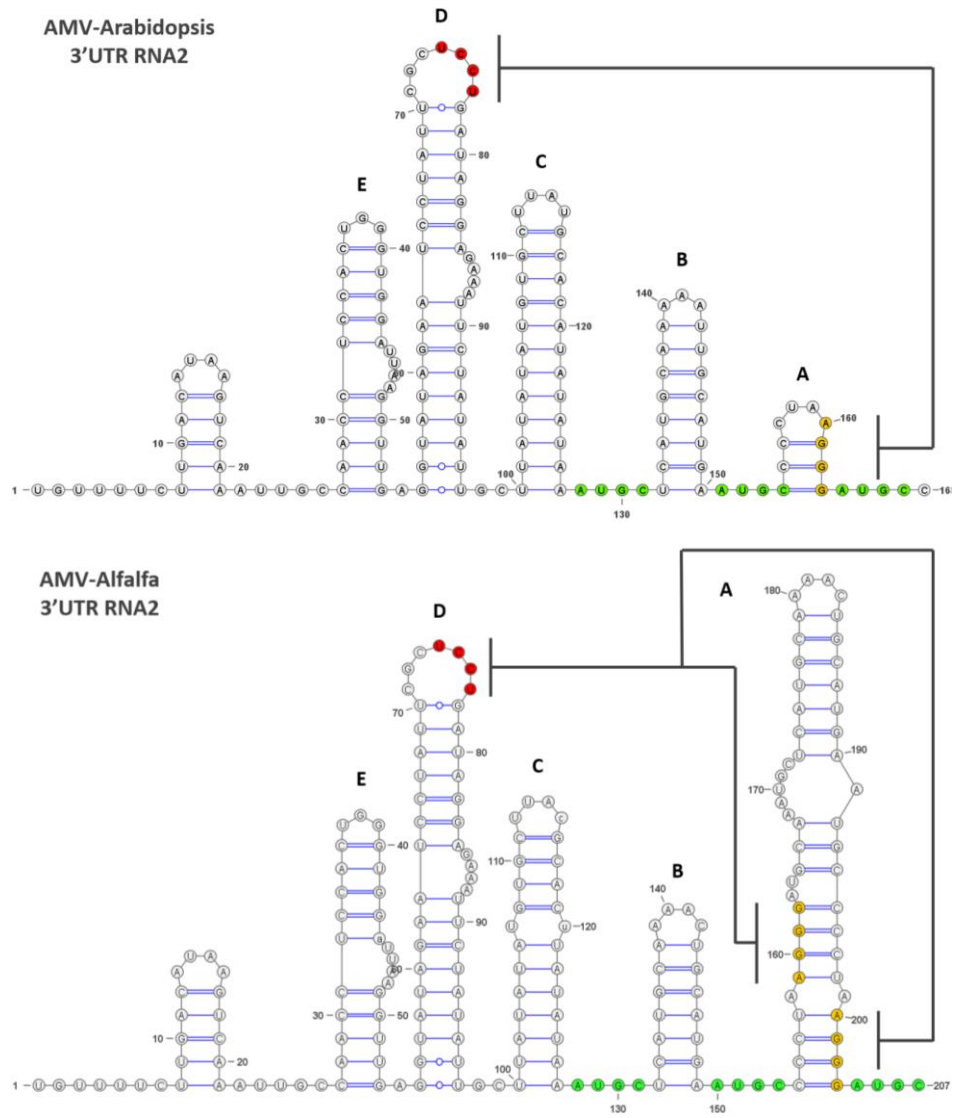


Figura 35. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA2 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa (Rojo: Secuencia 5'-UCCU-3'; Verde: Secuencia 5'-AUGC-3'; Amarillo: Secuencia 5'-AGGG-3').

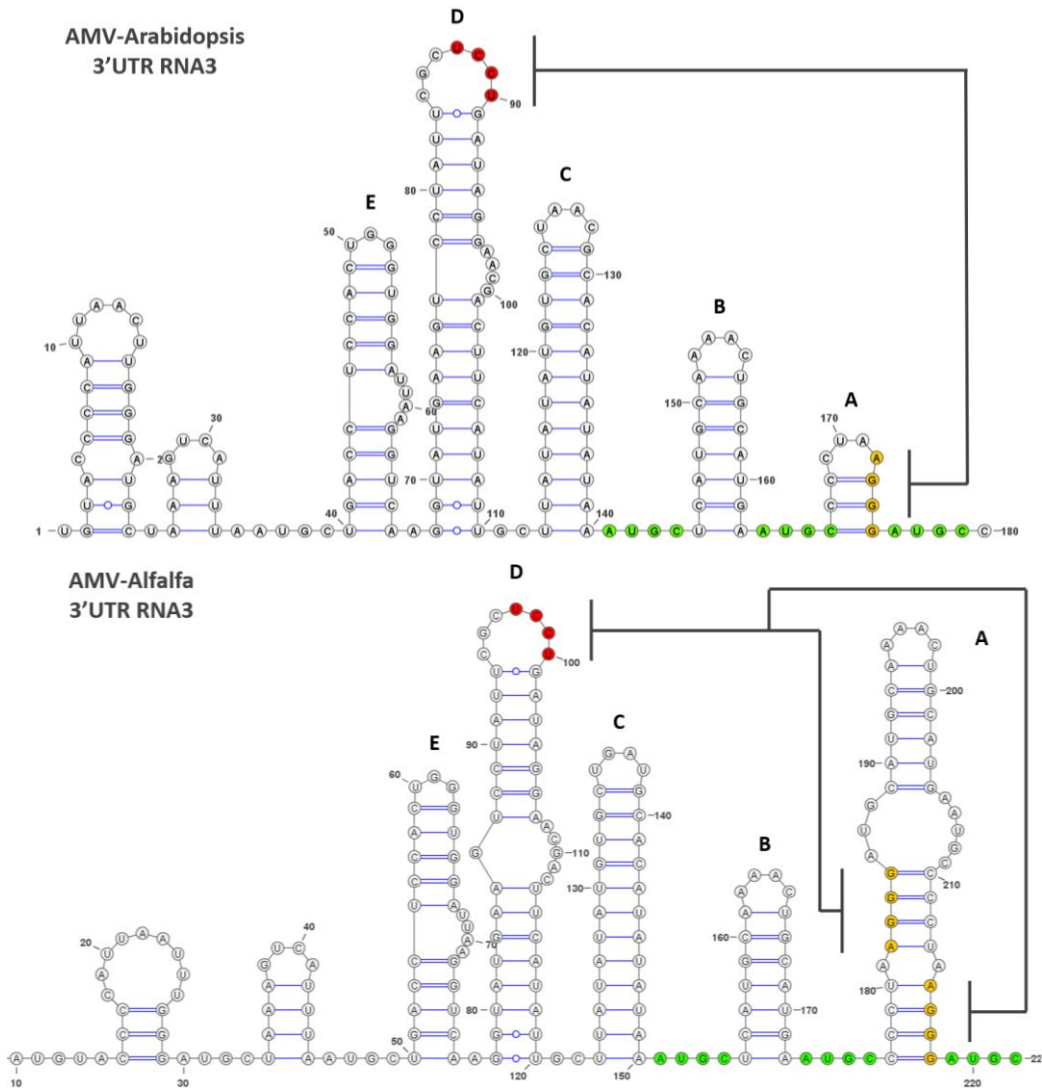


Figura 36. Estructuras secundarias de las regiones 3'UTR del RNA3 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa (Rojo: Secuencia 5'-UCCU-3'; Verde: Secuencia 5'-AUGC-3'; Amarillo: Secuencia 5'-AGGG-3').

En los tres componentes genómicos se observaron las mismas estructuras secundarias que concuerdan con las estructuras reportadas en la bibliografía (Bol, 2008; Figuras 34, 35 y 36). Contando desde el extremo 3' hacia el 5', se observan cinco estructuras tipo hairpin denotadas como A, B, C, D y E. El primer dominio importante identificado es el sitio CPB, el cual es un sitio de anclaje de la proteína CP y está involucrado en la traducción y encapsidación de los RNAs de AMV. El sitio CPB consenso está dado por la estructura 5'-AUGC-[hairpin B]-

AUGC-[hairpin A]-AUGC-3' (ilustrado en verde), el cual se puede ver en los tres RNAs de ambos aislados de AMV-Arabidopsis. Para el caso de los RNAs de AMV-Alfalfa, se puede ver cómo la extensión del extremo 3' provoca una conformación más grande del hairpin A, lo cual podría estar relacionado con los resultados observados más adelante.

Siguiendo con la observación del hairpin A, se puede identificar la secuencia 5'-AGGG-3' (ilustrada en amarillo) al final de esta estructura, la cual interactúa con la secuencia 5'-UCCU-3' (ilustrada en rojo) del hairpin D para conformar la estructura de TLS que está involucrada en el proceso de replicación de AMV (Bol, 2008). La estructura de TLS, junto con el hairpin E, son reconocidos por el complejo de replicación de AMV para sintetizar una cadena negativa de RNA. Para el caso de AMV-Arabidopsis, se puede observar la presencia de las secuencias 5'-UCCU-3' y 5'-AGGG-3' como está reportado en la bibliografía (Bol 2003). Para el caso de AMV-Alfalfa, también se puede observar la presencia de ambas secuencias involucradas en la formación de la estructura TLS, sin embargo, debido a la extensión del hairpin A, se puede observar la presencia de dos copias de la secuencia 5'-AGGG-3'.

La duplicación de secuencias de la región 3'UTR no parece ser un fenómeno común en virus de plantas, sin embargo, este tipo de modificación podría ser una estrategia para modular la replicación y virulencia como se ha observado en otros modelos virales (Zhang et al., 2022). Estos resultados sugieren que la extensión del hairpin A en los componentes genómicos de AMV-Alfalfa podría estar involucrada con las observaciones realizadas más adelante referentes a la limitación de infección del RNA1 y la diferencia de acumulación del RNA2 de AMV-Alfalfa (Figura 41).

7.2.3 Identificación de dominios conservados en proteínas de AMV-Alfalfa

Adicionalmente a la identificación de los dominios importantes a nivel de RNA, se identificaron los dominios conservados de las proteínas de AMV para intentar dar explicación a los resultados del presente trabajo.

Para el caso de la proteína P1, primero se identificaron los motivos conservados del dominio N-terminal MT (Metil-Transferasa). De esta forma, se identificaron los cuatro motivos conservados (numerados del 1 al 4 en números romanos) reportados en la bibliografía (Vlot et al., 2002; Figura 37).

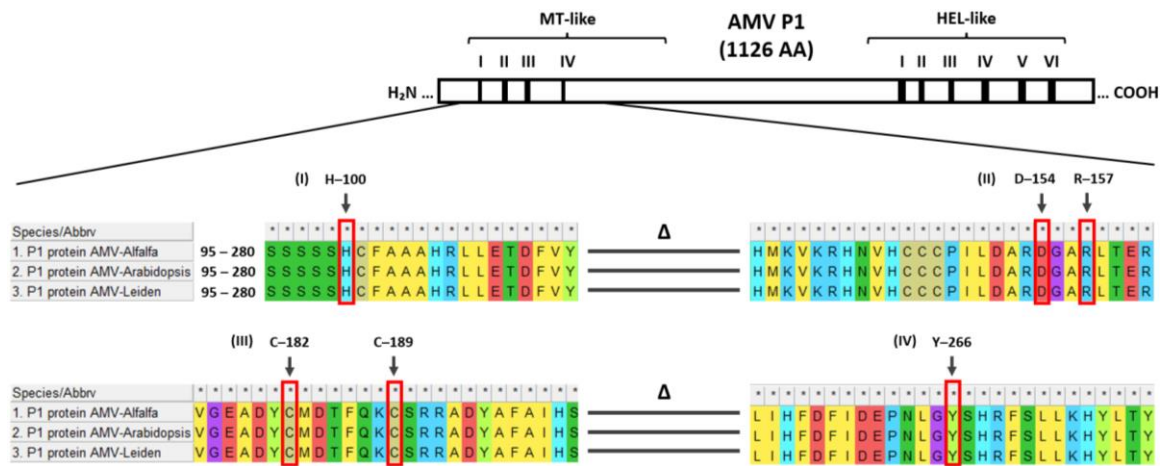


Figura 37. Identificación de los motivos conservados del dominio MT de la proteína P1 de AMV-Alfalfa.

Después, se identificaron los motivos conservados del dominio C-terminal HEL (Helicasa), encontrando los seis motivos reportados en la bibliografía (Vlot et al., 2003; Figura 38). En este caso, se encontró que en el motivo IV del dominio HEL-like de AMV-Alfalfa, hay una sustitución del primer aminoácido (K-Lisina por R-Arginina). Esta sustitución podría tener implicaciones en la acumulación y la infectividad de los RNAs virales de AMV-Alfalfa ya que, en otros trabajos, se ha comprobado que dichos procesos son afectados cuando se inducen mutaciones en los motivos I, III y VI (Vlot et al., 2003).

Analizando ahora la proteína P2 (RdRp) de AMV-Alfalfa, en esta se ha identificado el dominio conservado GDD, el cual constituye el sitio catalítico con actividad de polimerasa. Para los tres aislados de AMV, se identificó el dominio GDD sin diferencias significativas en las secuencias upstream o downstream (Figura 39).

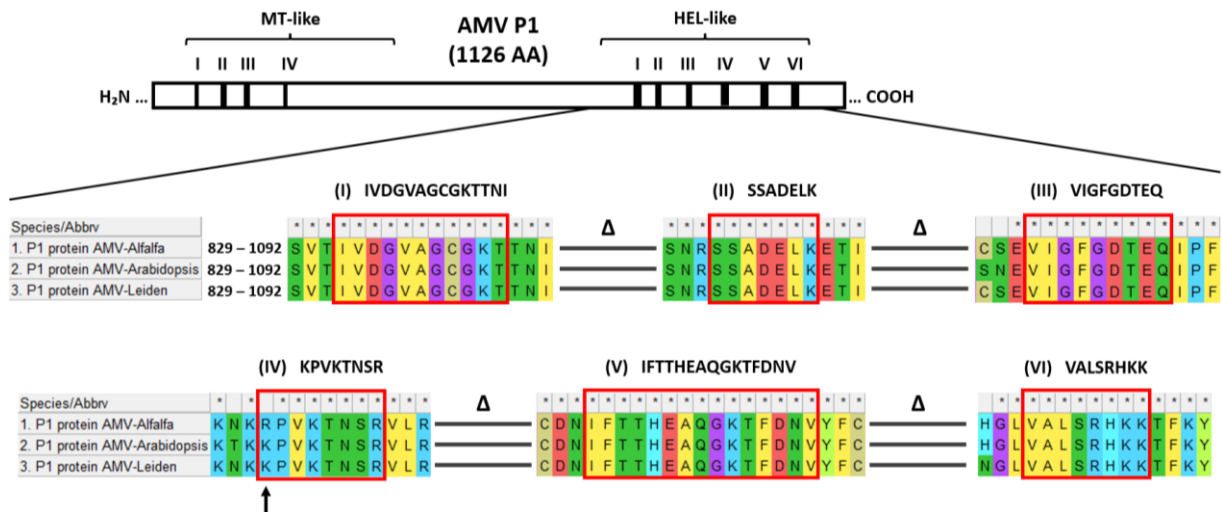


Figura 38. Identificación de los motivos conservados del dominio HEL de la proteína P1 de AMV-Alfalfa.

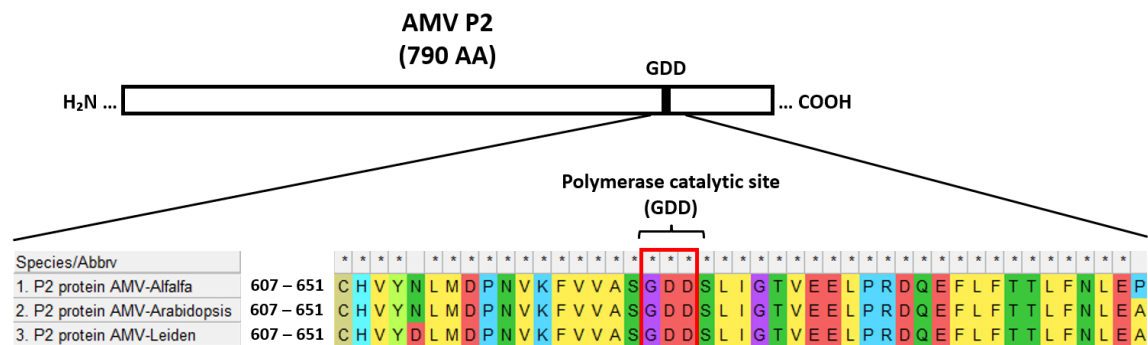


Figura 39. Identificación del dominio GDD de la proteína P2 de AMV-Alfalfa.

Por último, se identificaron los dominios conservados de las dos proteínas codificadas en el RNA3 de AMV-Alfalfa. La primera proteína, la proteína de movimiento MP, cuenta con 44 aminoácidos en su extremo C-terminal, los cuales han sido reportados como un sitio de anclaje de la proteína CP y que están involucrados en los movimientos célula a célula y sistémico de los componentes

genómicos de AMV (Sánchez-Navarro et al., 2006). Este dominio fue identificado en AMV-Alfalfa sin diferencias significativas en su secuencia con respecto a los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Leiden (Figura 40). Por otro lado, en el extremo N-terminal de la proteína CP, se encuentra un dominio de unión a RNA que está representado por aminoácidos de naturaleza básica en las posiciones 5, 6, 10, 13, 16, 17, 25 y 26, constituyendo una secuencia conservada PTxRSxxY (bol, 2008). Esta secuencia es idéntica para los tres aislados de AMV analizados como se puede observar en la figura 40.

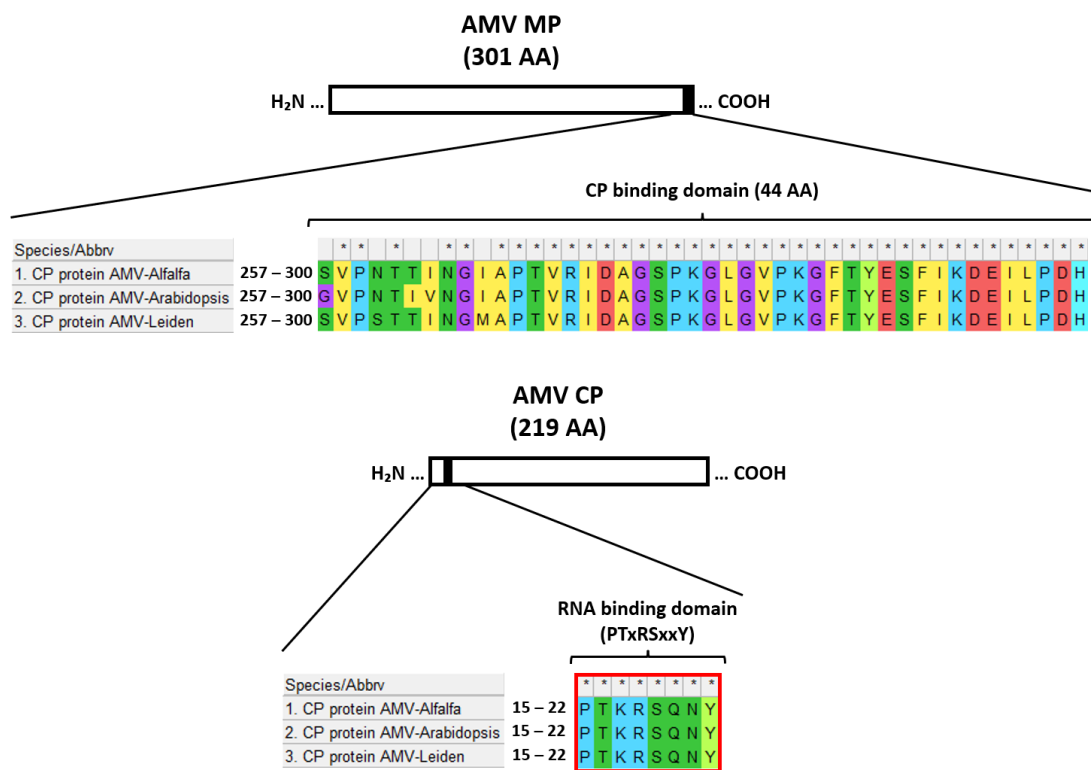


Figura 40. Identificación de los dominios conservados de las proteínas MP y CP de AMV-Alfalfa.

De esta forma, se puede ver que las principales diferencias estructurales de los componentes genómicos y proteínas de AMV-Alfalfa se encuentran en los extremos 3' de cada RNA y en el motivo IV del dominio HEL de la proteína P1. Sus posibles implicaciones en los procesos virales se discuten más adelante.

7.3 Ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de *N. benthamiana*

Como se mencionó en materiales y métodos, en el presente trabajo se realizaron 4 ensayos de agroinfiltración de clones infecciosos de AMV en plantas de *N. benthamiana*:

1. Ensayo 1: Evaluación de funcionalidad de clones infecciosos de AMV-Alfalfa.
2. Ensayo 2: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV en ausencia de replicación viral.
3. Ensayo 3: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV co-inoculados en distintas hojas.
4. Ensayo 4: Estudio de la acumulación diferencial del RNA2 de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis.

7.3.1 Ensayo 1: Evaluación de funcionalidad de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa

Para garantizar que los ensayos de agroinfiltración con los clones infecciosos de AMV-Alfalfa en hojas de *N. benthamiana* fueran exitosos, primero se evaluó la funcionalidad de los clones infecciosos probando distintas combinaciones.

7.3.1.1 Detección por hibridación molecular tipo Dot blot y Northern blot de los componentes genómicos de AMV en plantas de *N. benthamiana* infectadas con distintas combinaciones de clones infecciosos

En un inicio, se analizaron las combinaciones posibles utilizando los clones infecciosos del aislado AMV-Alfalfa (intercambiando las dos variantes del RNA2: RNA2-4269 y RNA2-4270; Figura 41, plantas 1-5) encontrando que, tras 6 dpi, no había síntomas visibles de infección sistémica en las plantas agroinfiltradas.

Aunado a esto, la detección por hibridación molecular dio señal por Dot blot utilizando una sonda específica para el RNA3, mientras que no fue posible detectar los componentes genómicos por Northern blot. Debido a esto, se probaron combinaciones de clones infecciosos entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis (Figura 41, plantas 6-11) para intentar complementar funcionalmente al primer aislado y encontrar cuál era el posible factor limitante de infección sistémica.

De las plantas 6-11, tan sólo dos plantas (6 y 8) mostraron síntomas de infección sistémica tras 6 dpi, además de haber sido detectados los componentes genómicos de AMV por Dot blot y Northern blot a partir de extracciones de RNA total de hojas sistémicas. Ambas combinaciones tienen en común la inoculación del clon infeccioso correspondiente al RNA1 de AMV-Arabidopsis y el RNA3 de AMV-Alfalfa, siendo diferente el RNA2 inoculado (RNA2 de AMV-Arabidopsis y RNA2-4270 de AMV-Alfalfa en las plantas 6 y 8, respectivamente). Analizando este resultado junto con las demás combinaciones en las que el RNA2 o RNA3 de AMV-Arabidopsis es intercambiado por su contraparte de AMV-Alfalfa, se puede inferir que el RNA1 de AMV-Alfalfa limita de alguna forma la infección sistémica en plantas de *N. benthamiana*. Además, los resultados para la planta 7 (que tiene el RNA2-4269 en lugar del RNA2-4270 de AMV-Alfalfa) sugieren que el nucleótido de diferencia en la posición 5 del RNA2 (timina en RNA2-4269 y citosina en RNA2-4270) podría ser importante para su infectividad.

Por otro lado, es importante notar que en la planta 8, aparentemente, no es detectado el RNA2, lo cual plantea la interrogante de si está presente el RNA2 o se trata de una diferencia de acumulación con respecto al RNA2 de AMV-Arabidopsis en la planta 6. Por lo tanto, para comprobar la presencia del RNA 2 en la planta 8, se amplificó la secuencia completa del RNA2 a partir del mismo RNA total utilizado para las hibridaciones moleculares (Figura 42).

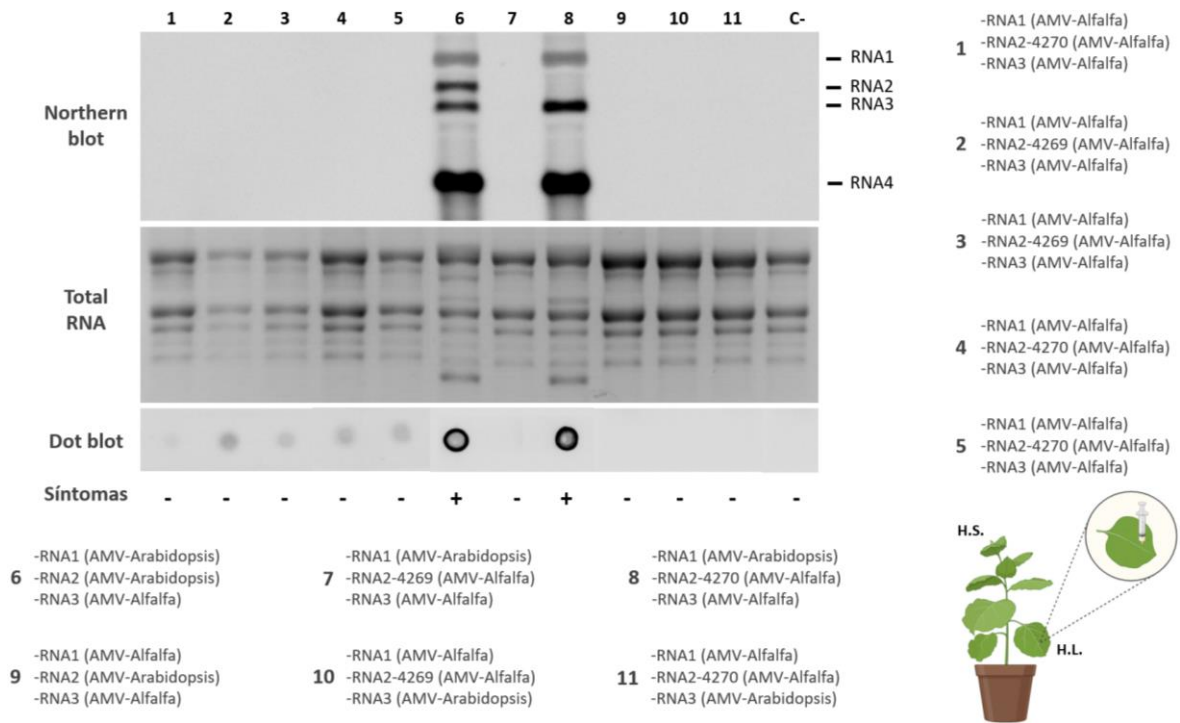


Figura 41. Evaluación de funcionalidad de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa en distintas combinaciones.

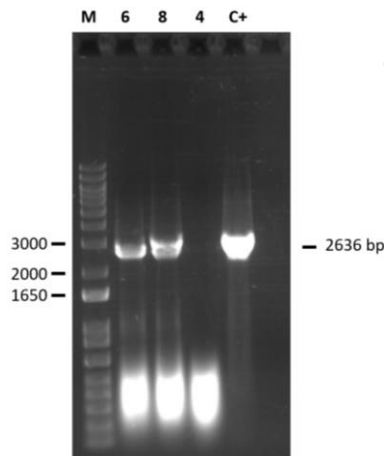


Figura 42. Amplificación de la secuencia completa del RNA2 de las plantas 6 y 8.

Al comprobar que el RNA2 sí estaba presente en el RNA total de la planta 8, se procedió a sintetizar una sonda específica para el RNA2 de AMV-Alfalfa y repetir las hibridaciones moleculares tipo Northern blot para las plantas 6 y 8 para descartar que la ausencia del RNA2 en el Northern blot se debiera a un problema

de especificidad. Además, se probaron clonas diferentes del RNA1 de AMV-Alfalfa con la finalidad de obtener alguna clona funcional (Figura 43).

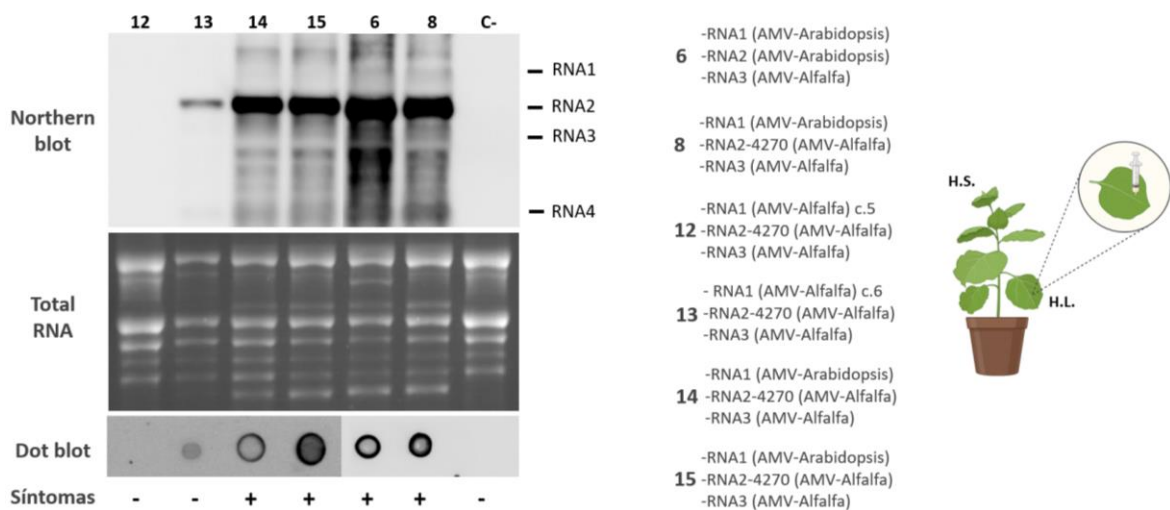


Figura 43. Evaluación de funcionalidad de distintos clones infecciosos del RNA1 de AMV-Alfalfa y prueba de sonda específica para RNA2 de AMV-Alfalfa.

Usando dos clonas diferentes del RNA1 de AMV-Alfalfa (c.5 y c.6) tampoco se logró obtener plantas con síntomas de infección sistémica tras 6 dpi, sin embargo, usando la sonda específica del RNA2 de AMV-Alfalfa, se pudo detectar señal en las hibridaciones moleculares tipo Northern blot de la planta 13 (con RNA1 AMV-Alfalfa c.6), por lo que se seleccionó esta clona para futuros análisis y ensayos. Por otro lado, al analizar las plantas 6 y 8, se puede observar que ahora sí hay señal del RNA2 en ambas muestras. Desafortunadamente, este resultado no es concluyente para determinar si existe una diferencia de acumulación del RNA2 en ambas plantas puesto que, al utilizar una sonda recién sintetizada para el RNA2 en la mezcla de sondas antes utilizada, la señal de quimioluminiscencia se ve saturada y no permite dar una estimación real de los niveles de acumulación de una muestra con respecto a la otra. Debido a esto, se diseñó un experimento para construir híbridos del RNA2 y observar su comportamiento en plantas de *N. benthamiana* (Ensayo 4 de agroinfiltración).

7.3.2 Ensayo 2: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV en ausencia de replicación viral

Una vez seleccionados los clones infecciosos funcionales de AMV (RNA1 AMV-Arabidopsis, RNA1 AMV-Alfalfa c.6, RNA2-4270 AMV-Alfalfa, RNA3 AMV-Alfalfa), se procedió a realizar las agroinfiltraciones de los clones infecciosos individuales para evaluar su capacidad de movimiento sistémico en ausencia de replicación viral.

7.3.2.1 Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (en ausencia de replicación viral)

En primer lugar, se evaluó la capacidad de movimiento sistémico del RNA1 de los aislados AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa. Para esto, se amplificó un fragmento corto (116 nt) y uno largo (1186 nt) en hojas locales y sistémicas como se describe en el punto 6.3.5 de Materiales y Métodos.

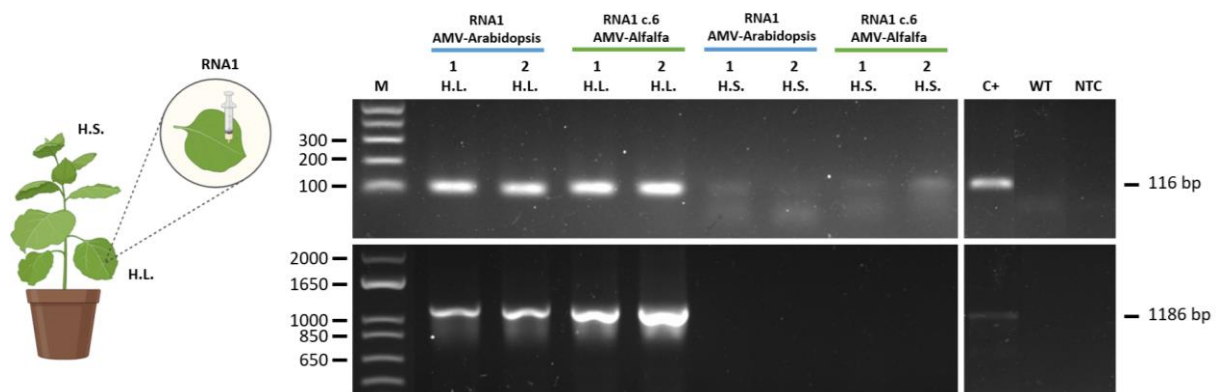


Figura 44. Detección por PCR del RNA1 de AMV-Arabidopsis y AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral).

Como se muestra en la figura 44, tanto en hojas locales como en hojas sistémicas se pudieron detectar ambos RNA1 cuando se amplificó el fragmento corto de 116 nt. Para corroborar que, en efecto, fuera un transcrito del RNA1 completo que fue

transportado a larga distancia desde la hoja local hasta una hoja sistémica, se procedió a amplificar un fragmento más grande (1186 nt), sin embargo, para ambos aislados no se observó amplificación. Esto supone algunas posibles razones por las que se detectó un fragmento específico corto de 116 nt, pero no un fragmento más largo de 1186 nt. En primer lugar, se plantea la posibilidad de que haya ocurrido un rearrreglo de la secuencia del RNA1 similar a la observación realizada por Calderón-Pérez et al., en 2021, al caracterizar el aislado de AMV-Leonotis en plantas de jitomate. Si bien, esta explicación encaja de cierta manera con el posible movimiento del RNA1 en este trabajo, hace falta información para determinar si algún fragmento del RNA viral se perdió o fue reemplazado por algún componente del hospedero durante el movimiento sistémico. Siendo así, se plantea una segunda posibilidad en la que la secuencia corta detectada correspondiera a un producto del mecanismo de silenciamiento génico del hospedero. Se sabe que, durante este mecanismo de defensa, los RNAs virales de doble cadena pueden ser escindidos por proteínas DCL dando lugar a cadenas cortas de RNA de 21-24 nt que, al ser incorporados a complejos de silenciamiento RISC, dirigen esta maquinaria molecular hacia sus blancos (Pallas & García, 2011). Sin embargo, considerando que el producto del RNA1 amplificado es una secuencia de 116 nt, la posibilidad de que corresponda a un producto de silenciamiento génico es menos favorable. De esta forma, se plantea una tercera posibilidad que reside en el hecho de que, en distintos tejidos de la planta, la presencia de ribonucleasas funge como un mecanismo de homeostasis de las concentraciones de RNA intracelulares (MacIntosh & Castandet, 2020). Debido a que el RNA1 de AMV fue inoculado sin la presencia de los demás RNAs virales, al no tener al alcance las proteínas accesorias como MP y CP, su supervivencia a lo largo de todo el trayecto recorrido a través de distintos tejidos se podría ver comprometida, dando lugar a una mínima concentración en tejidos distantes en comparación con su concentración en el

tejido local, además de poder ser reducido a fragmentos más pequeños por efecto de la degradación por ribonucleasas.

Por otro lado, en el caso del RNA2-4270 de AMV-Alfalfa, en la figura 45 se puede observar que también hubo amplificación del fragmento corto (108 nt) en hojas locales y sistémicas, pero en esta ocasión, se pudo amplificar el fragmento largo (811 nt) en una hoja sistémica. La presencia del fragmento largo en la hoja sistémica sugiere que el movimiento sistémico del RNA2 es posible en plantas de *N. benthamiana* en ausencia de replicación viral. Como se mencionó para el caso del RNA1, el RNA2 tampoco cuenta con las proteínas accesorias MP y CP para moverse sistémicamente, por lo que la intervención de proteínas de movimiento de RNA del hospedero es una explicación posible para este resultado. Se ha reportado que proteínas con capacidad de moverse dentro del floema son capaces de unirse a moléculas de RNA y transportarlas hasta tejidos distantes. Un ejemplo es CmPP16 que puede unirse al RNA de RCNMV y moverlo a través de los plasmodesmos (Xoconostle-Cázares et al., 1999).

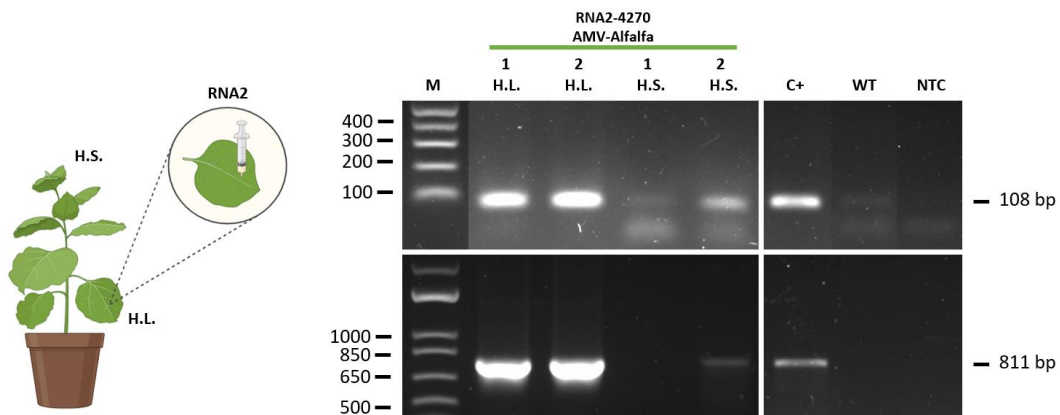


Figura 45. Detección por PCR del RNA2-4270 de AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral).

Por último, se evaluó la capacidad de movimiento sistémico del RNA3 de AMV-Alfalfa siguiendo la misma metodología. Sin embargo, en este caso no se detectó

la presencia del fragmento corto (204 nt) ni del fragmento largo (501 nt) como se observa en la figura 46.

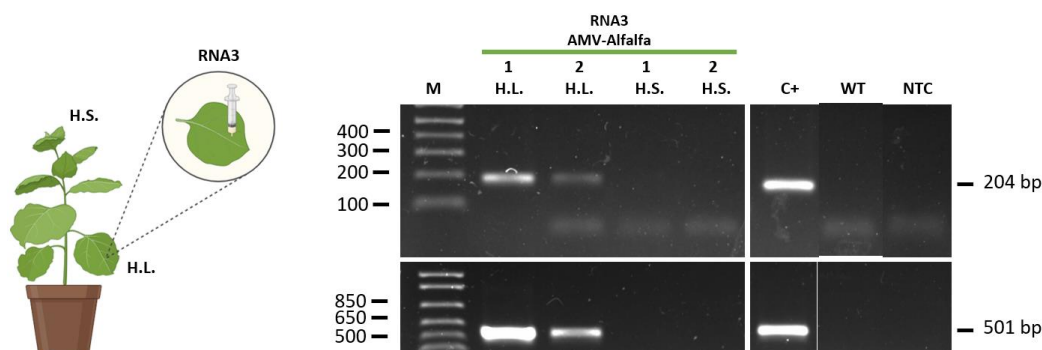


Figura 46. Detección por PCR del RNA3 de AMV-Alfalfa en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (movimiento sistémico en ausencia de replicación viral).

El resultado para el RNA3 representa un punto de inflexión en el entendimiento del movimiento sistémico de los RNAs de AMV. Similar al trabajo con BMV de Gopinath y Kao de 2007, en este ensayo realizado con AMV se esperaba observar el mismo patrón de movimiento, siendo el RNA3 el RNA móvil (al codificar para las proteínas MP y CP), mientras que el RNA1 y RNA2 no tuvieran esta capacidad. Sin embargo, es importante aclarar que la traducción de los RNAs de AMV requiere a la CP, por lo que la inoculación independiente del RNA3 no garantiza la presencia de CP y, por tanto, la síntesis de las proteínas MP y CP.

7.3.2.2 Evaluación sintomática de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con clones infecciosos de AMV (en ausencia de replicación viral)

Las plantas inoculadas con los RNAs individuales de AMV (en ausencia de replicación viral) no mostraron síntomas visibles de infección por AMV en comparación con una planta control. No son visibles síntomas de infección como patrón de mosaico, enrollamiento foliar o enanismo (Figura 47).

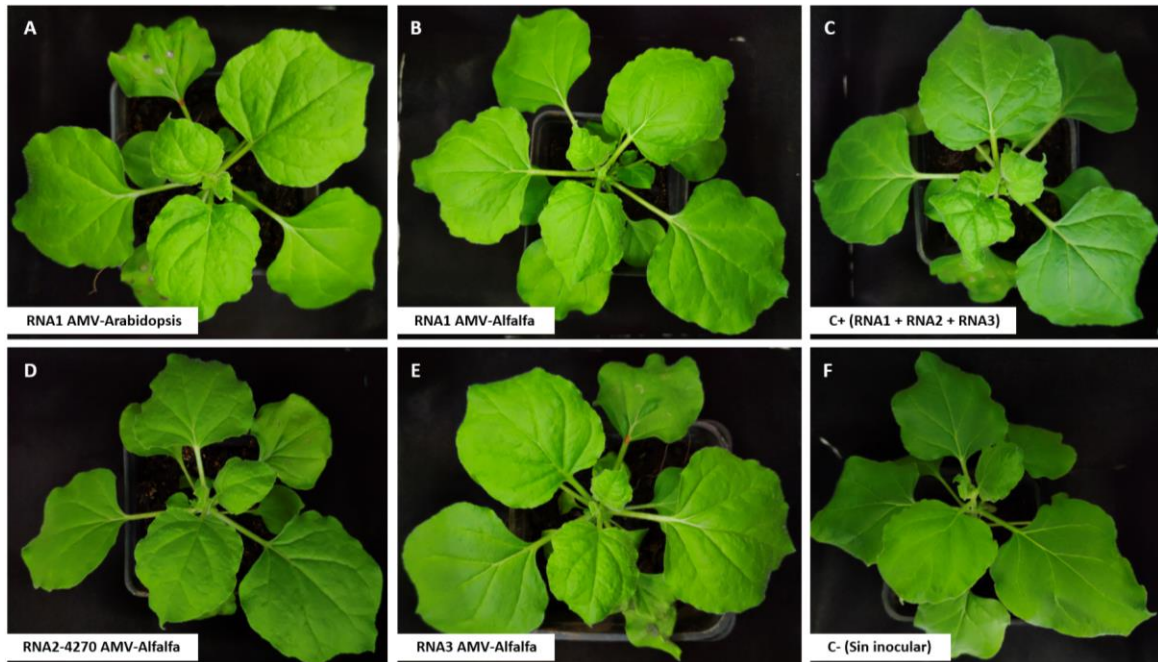


Figura 47. Síntomas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con clones infecciosos individuales de AMV tras 6 dpi (en ausencia de replicación viral).

7.3.3 Ensayo 3: Evaluación de capacidad de movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV co-inoculados en distintas hojas

Teniendo en cuenta la posible capacidad del RNA1 y RNA2 de AMV para moverse largas distancias dentro de *N. benthamiana*, se planteó la pregunta de si podría establecerse una infección sistémica cuando los clones infecciosos son inoculados en distintas hojas.

7.3.3.1 Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas agroinfiltradas (en co-inoculación de distintas hojas)

Primeramente, se agroinfiltraron los tres componentes genómicos necesarios para inducir síntomas (RNA1 AMV-Arabidopsis, RNA2-4270 AMV-Alfalfa y RNA3 AMV-Alfalfa) en hojas distintas y se realizó la detección por PCR de cada

componente genómico tras 6 dpi (Figura 48). El único RNA detectado en alguna hoja distinta a la inoculada fue el RNA1, el cual fue detectado en la hoja inoculada con el RNA3 en la planta 1, y en la hoja inoculada con el RNA2 en la planta 3. Es importante mencionar que no hubo aparición de síntomas de infección en estas plantas agroinfiltradas (Figura 51). Esto sugiere que la inoculación de cada componente genómico en hojas distintas podría establecer una infección sistémica si se incubaba el suficiente tiempo para que todos los componentes genómicos de AMV se encuentren en el mismo tejido. Siguiendo este razonamiento, se montó el mismo experimento, pero colectando tejido tras 10 dpi para evaluar si, con un mayor tiempo de incubación, se podía establecer una infección sistémica.

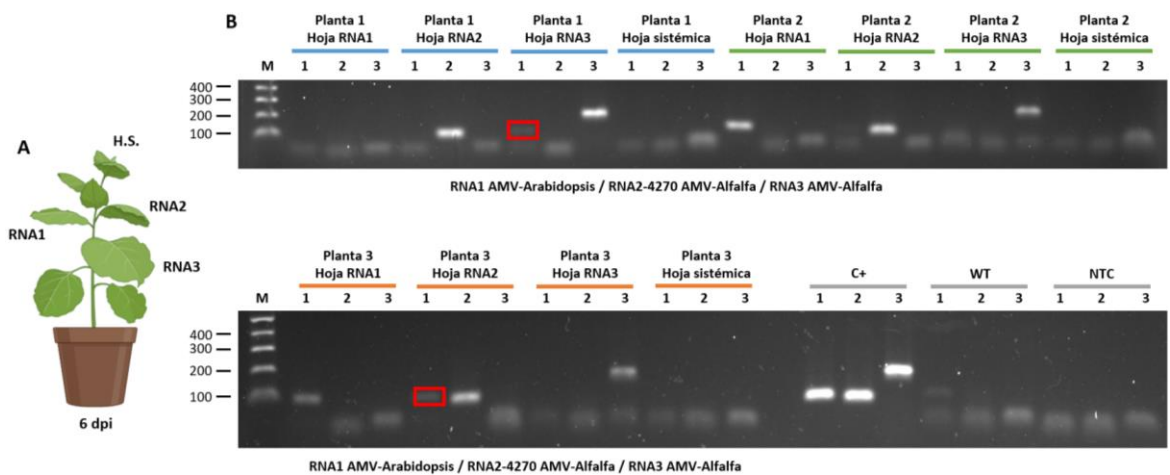


Figura 48. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas tras 6 dpi (co-inoculación en distintas hojas).

Tras 10 dpi, los tres componentes genómicos fueron detectados en todas las hojas locales y sistémicas analizadas (Figura 49, B), lo cual sugiere que este tiempo fue suficiente para que hubiera movimiento sistémico de los RNAs virales (posiblemente el RNA1 y RNA2, por los resultados anteriores) hasta que, en algún tejido específico, la presencia de los tres componentes genómicos comenzó el proceso de infección sistémica. Sin embargo, la aparición de síntomas tampoco

fue visible en estas plantas (Figura 51), por lo que se podría inferir que, tras 10 dpi, el ciclo de infección apenas comenzó, siendo poco tiempo para la aparición de síntomas (en el presente trabajo, se ha probado que la aparición de síntomas claros de infección sistémica comienza alrededor del día 5 después de inocular los tres componentes genómicos de AMV en una misma hoja). Viendo estos resultados, se montó el mismo experimento, pero ahora utilizando el RNA1 c.6 de AMV-Alfalfa en lugar de su contraparte de AMV-Arabidopsis, para ver si también era capaz de establecer una infección sistémica tras 10 dpi inoculando cada uno de sus componentes genómicos en hojas distintas. De igual forma, cada RNA viral fue detectado en todas las hojas locales y sistémicas, soportando el hecho de que es posible el movimiento de los RNAs virales hacia tejidos distantes (Figura 49, C). En estas plantas tampoco se observaron síntomas de infección sistémica (Figura 51).

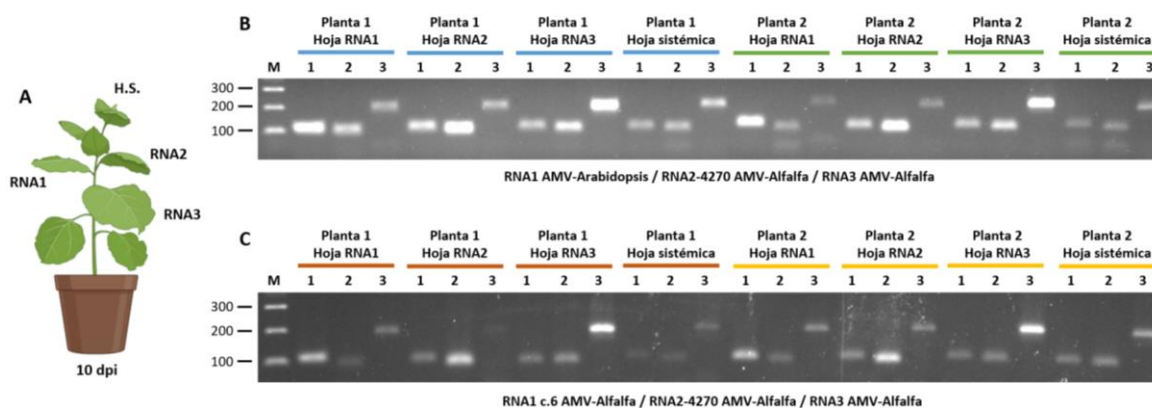


Figura 49. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas tras 10 dpi (co-inoculación en distintas hojas).

Puesto que la evidencia apunta al hecho de que el RNA1 y RNA2 de AMV tienen capacidad de movimiento sistémico por sí solos, se planteó un experimento para ver si se podía facilitar el establecimiento de una infección sistémica cuando el RNA1 y RNA2 fueran inoculados en una misma hoja y el RNA3 en otra hoja distante. Para esto, se probaron dos combinaciones: 1) RNA1-Arabidopsis + RNA2-4270 AMV-Alfalfa en una hoja y, RNA3 AMV-Alfalfa en otra hoja (Figura 50,

B); 2) RNA1 c.6 AMV-Alfalfa + RNA2-4270 AMV-Alfalfa en una hoja y, RNA3 AMV-Alfalfa en otra hoja (Figura 50, C). Para ambas combinaciones, se detectaron todos los RNAs virales en todas las hojas locales y sistémicas tras 6 dpi, lo cual podría indicar que, en efecto, se facilitó la infección sistémica al estar presentes el RNA1 y RNA2 en una misma hoja. Este resultado es similar al estudio con BMV de Gopinath y Kao, en 2007. Cuando el RNA 1 y RNA2 se encuentran en el mismo sitio, la infección sistémica se ve facilitada.

Por otro lado, en cuanto a la aparición de síntomas de infección sistémica en estas dos últimas combinaciones, para el caso de la combinación con el RNA1 de AMV-Arabidopsis, se lograron observar síntomas como enrollamiento foliar de las hojas apicales (Figura 51), lo cual sugiere que la co-inoculación del RNA1 AMV-Arabidopsis y el RNA2-4270 AMV-Alfalfa en la misma hoja sí facilitó el establecimiento de una infección sistémica, reduciendo el tiempo para la aparición de síntomas. Contrariamente, la combinación con el RNA1 de AMV-Alfalfa no mostró síntomas claros de infección, lo cual ya había sido observado anteriormente en el ensayo de clones infecciosos funcionales.

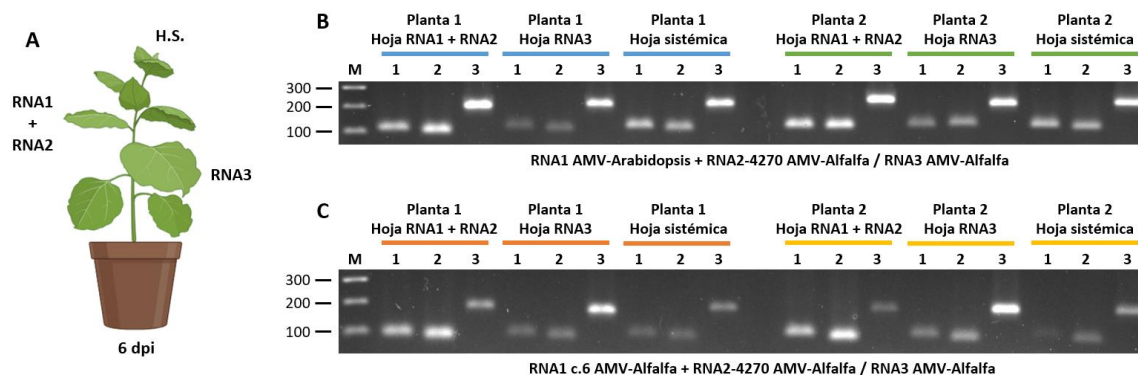


Figura 50. Detección por PCR de los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas tras 6 dpi (co-inoculación de RNA1 y RNA2 en una misma hoja, y RNA3 en una hoja distinta).

7.3.3.2 Evaluación sintomática de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con clones infecciosos de AMV (en co-inoculación de distintas hojas)

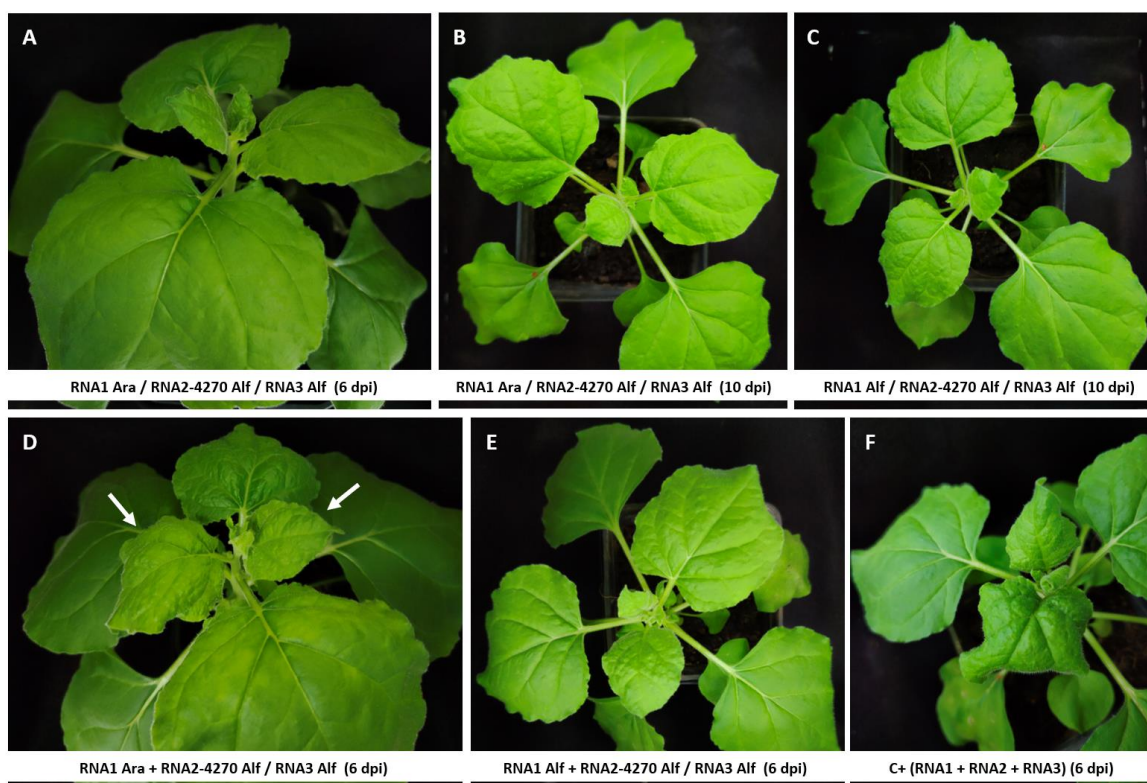


Figura 51. Síntomas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con clones infecciosos en co-inoculación.

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos de co-inoculación se lograron detectar los componentes genómicos de AMV en hojas locales y sistémicas a diferentes tiempos después de inoculación. Esto sugirió que los RNAs de AMV (sólo RNA1 y RNA2, posiblemente) pueden moverse sistémicamente y establecer una infección sistémica. Pero, al evaluar la aparición de síntomas, se obtuvo que tan sólo la combinación de RNA1 de AMV-Arabidopsis y RNA2-4270 de AMV-Alfalfa inoculados en una misma hoja, y RNA3 de AMV-Alfalfa inoculado en una hoja distante, mostró inicio de síntomas de infección sistémica (Figura 51, D).

7.3.4 Ensayo 4: Estudio de la acumulación diferencial del RNA2 de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis

Retomando el tema de la acumulación diferencial del RNA2 de AMV-Alfalfa con respecto a su contraparte de AMV-Arabidopsis, se ha planteado que la extensión del hairpin A de las regiones 3'UTR del aislado AMV-Alfalfa podría estar involucrada la diferencia de acumulación e infectividad de los RNAs de este aislado. Debido a esto, se construyeron las construcciones híbridas del RNA2 intercambiando las secuencias de los 3'UTR entre sí de tal forma que, al infiltrar estos clones híbridos junto con el RNA1 de AMV-Arabidopsis y el RNA3 de AMV-Alfalfa, se pudiera observar una inversión del patrón de acumulación del RNA2.

7.3.4.1 Amplificación y clonación de las construcciones híbridas del RNA2 en el vector binario pLX-B2

En un inicio, se construyeron los clones híbridos del RNA2 al amplificar la región del 5'UTR unida a la región ORF y, por separado, la región 3'UTR de cada aislado. (Figura 52). Los productos de PCR fueron purificados, digeridos y ligados en el respectivo orden y se transformaron células de *A. tumefaciens* C58 para realizar las agroinfiltraciones en plantas de *N. benthamiana*.

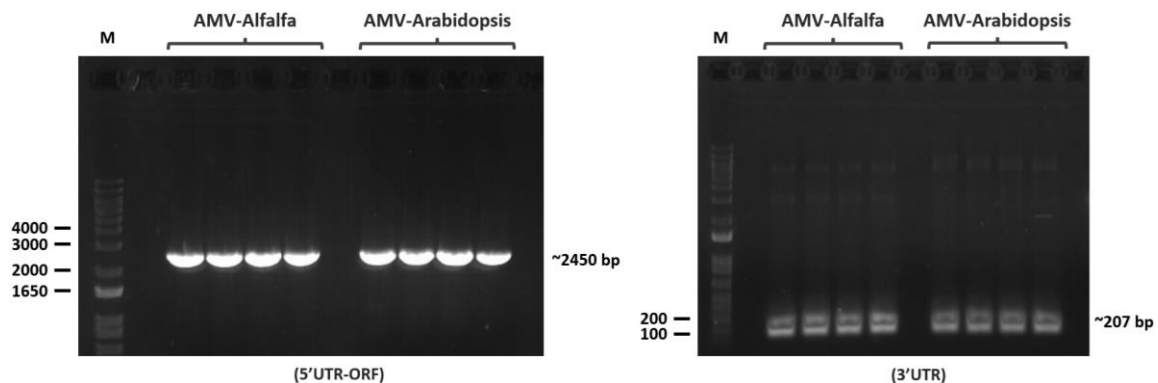


Figura 52. Amplificación de las regiones 5'UTR-ORF y 3'UTR de los aislados de AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis para la construcción de los RNA2 híbridos.

Se agroinfiltraron las siguientes combinaciones: A) RNA1 AMV-Arabidopsis / RNA2 5'UTR-ORF (AMV-Alfalfa) + 3'UTR (AMV-Arabidopsis) / RNA3 AMV-Alfalfa; B) RNA1 AMV-Arabidopsis / RNA2 5'UTR-ORF (AMV-Arabidopsis) + 3'UTR (AMV-Alfalfa) / RNA3 AMV-Alfalfa; C) RNA1 AMV-Arabidopsis / RNA2 AMV-Arabidopsis / RNA3 AMV-Alfalfa; D) RNA1 AMV-Arabidopsis / RNA2 AMV-Alfalfa / RNA3 AMV-Alfalfa.

7.3.4.2 Evaluación sintomática de plantas de *N. benthamiana* infectadas con clones infecciosos híbridos del RNA2 de AMV

Tras 6 dpi, las plantas fueron analizadas para observar la aparición de síntomas de infección sistémica. Los síntomas más severos corresponden a las plantas A y C de la figura 53, las cuales mostraron patrón de mosaico y enrollamiento foliar de las hojas apicales, mientras que las plantas B y D mostraron síntomas apenas perceptibles como un ligero enrollamiento foliar. Las plantas A y C fueron inoculadas con el RNA2 híbrido con el 3'UTR de AMV-Arabidopsis, y el RNA2 completo de AMV-Arabidopsis, respectivamente, mientras que las plantas B y D fueron inoculadas con el RNA2 híbrido con el 3'UTR de AMV-Alfalfa, y el RNA2 completo de AMV-Alfalfa, lo cual sugiere que la secuencia 3'UTR de AMV-Arabidopsis es más infectiva que su contraparte de AMV-Alfalfa.

Esta diferencia de infectividad relacionada a la región 3'UTR podría deberse a la extensión del hairpin A de AMV-Alfalfa, lo cual, a su vez, podría implicar un impedimento estérico para la correcta formación de la estructura TLS, el reconocimiento de esta estructura por parte de la proteína P2 (RdRp), o el reconocimiento del dominio CPB por parte de la proteína CP. Para dar respuesta a esta incógnita es necesario plantear experimentos adicionales, además de medir la acumulación relativa del RNA2 de estas combinaciones por hibridación molecular tipo Northern blot o PCR-tiempo real.

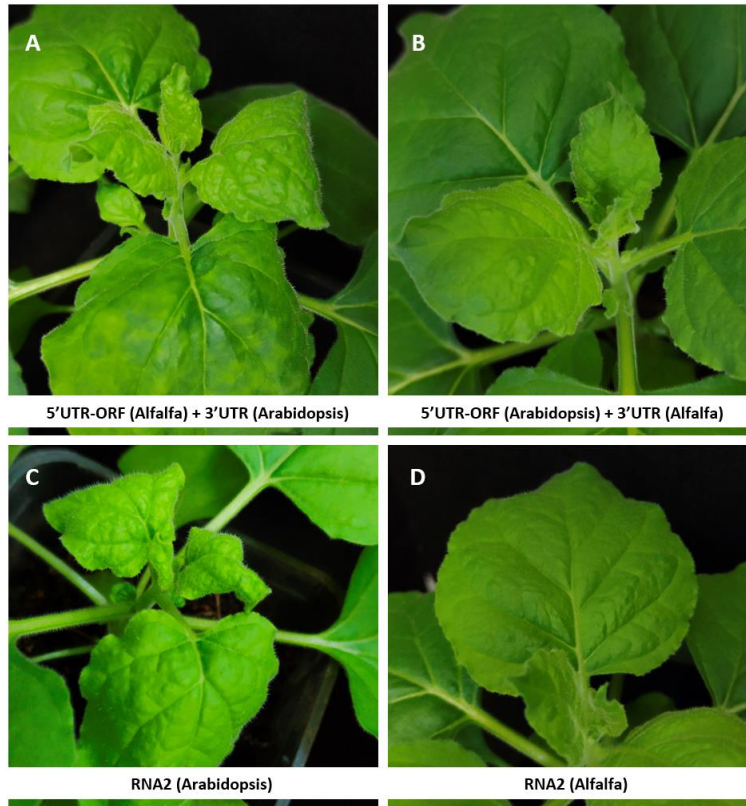


Figura 53. Síntomas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con clones infecciosos híbridos del RNA2 (Cada planta fue agroinfiltrada con una mezcla del RNA1 AMV-Arabidopsis, RNA3 AMV-Alfalfa y el respectivo RNA2).

CONCLUSIONES

Se secuenciaron los extremos 5' y 3' de los componentes genómicos del aislado AMV-Alfalfa por la técnica de Stem-loop RACE, con lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los componentes genómicos completos y clonarlos en el vector binario pLX-B2, dando lugar a las construcciones de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa.

Los clones infecciosos se utilizaron para transformar células de *A. tumefaciens* C58 para los ensayos de agroinfiltración. Inoculando únicamente los clones infecciosos del aislado AMV-Alfalfa, se encontró que no se podían observar síntomas claros de infección sistémica en plantas de *N. benthamiana* tras 6 y 10 dpi. Probando distintas combinaciones intercambiando los clones infecciosos entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, se encontró que el clon infeccioso del RNA1 de AMV-Alfalfa limitaba de alguna forma la infección sistémica y la aparición de síntomas. Aunado a esto, se observó una diferencia de acumulación del RNA2 de AMV-Alfalfa con respecto a su contraparte de AMV-Arabidopsis, el primero no pudiendo ser detectado por hibridación molecular tipo Northern blot. Debido a esto, se realizó la caracterización molecular para intentar encontrar la razón de esta diferencia.

Primeramente, se analizaron las secuencias de los componentes genómicos de AMV-Alfalfa a nivel de RNA en las regiones reguladoras 5' UTR y 3' UTR. Realizando alineamientos de estas regiones con distintos aislados reportados en bases de datos, se encontró que no existe una diferencia significativa en las regiones 5' UTR, sin embargo, las regiones 3' UTR del aislado AMV-Alfalfa están extendidas 58, 41 y 33 nt en el RNA1, RNA2 y RNA3, respectivamente. Estas extensiones corresponden a duplicaciones de los respectivos tamaños que generan, a su vez, una extensión del hairpin A de cada RNA viral. Se tiene reportado que la región 3' UTR de AMV puede adoptar dos conformaciones estructurales: una estructura de

unión a CP (CPB) y una estructura similar a un RNA de transferencia (TLS), las cuales están involucradas en los procesos de replicación, traducción, encapsidación y movimiento. Debido a esto, la extensión en el hairpin A podría ocasionar un impedimento estérico que afecta la infectividad de los clones infecciosos de AMV-Alfalfa.

A nivel de proteína, se identificaron los dominios conservados en cada una de las proteínas codificadas en los tres RNAs de AMV. En este caso, no se observaron diferencias a excepción del motivo 4 del dominio HEL de la proteína P1, en el cual, el primer residuo de lisina (K) está sustituido por arginina (R). Las implicaciones de esta diferencia podrían no ser significativas debido a que la diferencia de acumulación de los RNAs virales no es homogénea, por lo que esta diferencia se atribuyó a las regiones 3' UTR extendidas del aislado AMV-Alfalfa.

Siguiendo con el estudio de acumulación diferencial de RNAs entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, se construyeron RNA2 híbridos, intercambiando la región 3' UTR entre ambos aislados. Al hacer los ensayos de agroinfiltración junto con el RNA1 de AMV-Arabidopsis y el RNA3 de AMV-Alfalfa, se encontró que el RNA2 híbrido con la región 3' UTR de AMV-Arabidopsis reproducía síntomas más severos a comparación del RNA2 híbrido con la región 3' UTR de AMV-Alfalfa. Son necesarios ensayos adicionales para determinar cuantitativamente la diferencia de acumulación de estos RNAs híbridos.

Por otro lado, en los ensayos de agroinfiltración para analizar el movimiento sistémico de los componentes genómicos de AMV, se encontró que el RNA1 y RNA2, posiblemente, tienen capacidad de movimiento a larga distancia, mientras que el RNA3 carece de esta capacidad. Esto pudo ser comprobado en los ensayos de inoculación de los RNAs virales individuales y en co-inoculación. Esto implica la posible intervención de factores de la planta que están facilitando el movimiento de estos RNAs sistémicamente.

PERSPECTIVAS

Como experimentos de soporte para el estudio del movimiento sistémico de los RNAs de AMV, se recomienda generar construcciones del RNA viral fusionado al RNA codificante de la proteína reportera GFP, de tal forma que se pueda visualizar la localización y movimiento del RNA dentro de la planta. De igual forma, para elucidar los factores de la planta que transportan a los RNAs de AMV, se pueden llevar a cabo métodos para la estudiar la interacción RNA-proteína (centrada en el RNA) *in vivo* como RAP (Purificación de Afinidad por RNA), PAIR (Identificación de RBPs asistida por péptidos-ácidos nucleicos), TRIP (Procedimiento de Aislamiento de RNA en Tándem) o RaPID (Detección de Interacción de RNA-Proteína).

Por otro lado, para el estudio de la acumulación diferencial de los componentes genómicos entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, se sugiere realizar un análisis de interacción molecular entre las estructuras CPB y TLS de cada extremo 3' UTR con su respectiva proteína de AMV (CP para la estructura CPB y P2 para la estructura TLS). De esta forma, se podría observar si existe algún impedimento estérico en la interacción debida a la extensión y duplicación del hairpin A en los RNAs del aislado AMV-Alfalfa. Adicionalmente, se recomienda realizar reacciones de RT-PCR para cuantificar la acumulación de los RNAs híbridos construídos.

Si se comprueba la diferencia de acumulación entre el RNA2 del aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis, se podrían construir otras variantes híbridas intercambiando las regiones 3' UTR entre número de RNA, de tal forma que se pueda dar respuesta también a la diferencia de infectividad del RNA1 entre el aislado AMV-Alfalfa y AMV-Arabidopsis.

BIBLIOGRAFÍA

Bol, J. F. (s/f). *Alfalfa Mosaic Virus*.

Calderón-Pérez, B., Piedra-Ibarra, E., de la Torre-Almaráz, R., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2019). Host-specific loss of sequences of an alfalfa mosaic virus isolate during systemic infection. *Virus Research*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197703>

Calil, I. P., & Fontes, E. P. B. (2017). Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. En *Annals of Botany* (Vol. 119, Número 5, pp. 711–723). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw200>

Carmen Herranz, M., Pallas, V., & Aparicio, F. (2012). Multifunctional Roles for the N-Terminal Basic Motif of Alfalfa mosaic virus Coat Protein: Nucleolar/Cytoplasmic Shuttling, Modulation of RNA-Binding Activity, and Virion Formation. *Pallas and Garcia*, 25(8), 1093–1103. <https://doi.org/10.1094/MPMI>

Choudhary, N., Kumari, P., & Panda, S. (2020). RNA plant viruses: biochemistry, replication and molecular genetics. En *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies* (pp. 183–195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00014-1>

Dana, H., Mahmoodi Chalbatani, G., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Menati Rashno, M., Jan Abadi, S., Gharagouzlo, E., & Mar-mari, V. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. En *Int J Biomed Sci www.ijbs.org 48 INTERNATIONAL JOURNAL of BIOMEDICAL SCIENCE* (Vol. 13, Número 2). www.ijbs.org

Fajardo, T. V. M., Peiró, A., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *Journal of*

General Virology, 94(PART3), 677–681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.048793-0>

- Folimonova, S. Y., & Tilsner, J. (2018). Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem. En *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 43, pp. 82–88). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.001>
- Gopinath, K., & Kao, C. C. (2007). Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 19(4), 1179–1191. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050088>
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. En *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Número 1, pp. 259–270). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Número MAY). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
- Hong, J. S., & Ju, H. J. (2017). The plant cellular systems for plant virus movement. En *Plant Pathology Journal* (Vol. 33, Número 3, pp. 213–228). Korean Society of Plant Pathology.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.09.2016.0198>
- Huang, M., Wu, Z., Li, J., Ding, Y., Chen, S., & Li, X. (2023). Plant Protection against Viruses: An Integrated Review of Plant Immunity Agents. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/ijms24054453>

- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications . *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Ishwara, A., Govind, B., & Rao, P. (s/f). *Characterization of Plant Viruses Methods and Protocols*. <http://www.springer.com/series/8623>
- Katis, N. I., Tsitsipis, J. A., Katis, N. I., Stevens, M., & Powell, G. (2007). 4 *Transmission of Plant Viruses*. <https://www.researchgate.net/publication/234881359>
- Kwon, M. J., Kwon, S. J., Kim, M. H., Choi, B., Byun, H. S., Kwak, H. R., & Seo, J. K. (2023). Visual tracking of viral infection dynamics reveals the synergistic interactions between cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus 2. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34553-6>
- Lefeuvre, P., Martin, D. P., Elena, S. F., Shepherd, D. N., Roumagnac, P., & Varsani, A. (2019). Evolution and ecology of plant viruses. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Número 10, pp. 632–644). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3>
- Liu, J. Z., Li, F., & Liu, Y. (2017). Editorial: Plant immunity against viruses. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Número MAR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00520>
- Mahmoudabadi, G., & Phillips, R. (s/f). *A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes*. <https://doi.org/10.7554/eLife.31955.001>
- Mandadi, K. K., & Scholthof, K. B. G. (2013). Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? En *Plant Cell* (Vol. 25, Número 5, pp. 1489–1505). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>

- Marintcheva, B. (2018). Introduction to Viral Structure, Diversity and Biology *
*Parts of this chapter were originally published in Marintcheva B. A box of paradoxes: the fascinating world of viruses. *Bridgew Rev* 2013;32(2):25–8. http://vc.bridgew.edu/br_rev/vol32/iss2/8 and are reproduced here with the permission of the editor. En *Harnessing the Power of Viruses* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810514-6.00001-5>
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2013). Viruses: Definition, Structure, Classification. En *Molecular Virology* (pp. 17–30). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_2
- Moeder, W., & Yoshioka, K. (2008). Lesion mimic mutants. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 764–767. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.6545>
- Ng, J. C. K., & Falk, B. W. (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. En *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 44, pp. 183–212). <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>
- Pallas, V., & García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. En *Journal of General Virology* (Vol. 92, Número 12, pp. 2691–2705). <https://doi.org/10.1099/vir.0.034603-0>
- Park, M. R., Seo, J. K., & Kim, K. H. (2013). Viral and Nonviral Elements in Potexvirus Replication and Movement and in Antiviral Responses. En *Advances in Virus Research* (Vol. 87, pp. 75–112). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407698-3.00003-X>
- Piedra-Ibarra, E., De La Torre-Almaráz, R., Zúñiga, G., Xoconostle-Cázares, B., & Ruíz-Medrano, R. (2005). Leonotis nepetaefolia: An important plant virus reservoir in central Mexico. *Phytoparasitica*, 33(5), 480–494. <https://doi.org/10.1007/BF02981397>
- Raoult y Forterre, 2008. (s/f).

- Sacristán, S., Díaz, M., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2011). Contact Transmission of Tobacco Mosaic Virus: a Quantitative Analysis of Parameters Relevant for Virus Evolution. *Journal of Virology*, 85(10), 4974–4981. <https://doi.org/10.1128/jvi.00057-11>
- Sánchez-Navarro, J. A., Carmen Herranz, M., & Pallás, V. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology*, 346(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.024>
- Scholthof, H. B. (2001). Molecular plant-microbe interactions that cut the mustard. En *Plant Physiology* (Vol. 127, Número 4, pp. 1476–1483). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.010789>
- Scholthof, H. B. (2005). Plant virus transport: Motions of functional equivalence. En *Trends in Plant Science* (Vol. 10, Número 8, pp. 376–382). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.002>
- Sharma, P. (2023). Epidemiology of potyviruses infecting crops of cucurbitaceae. En *Plant RNA Viruses: Molecular Pathogenesis and Management* (pp. 213–227). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95339-9.00016-8>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Número 2, pp. 89–100). <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Suman, R., Rishi, N., & Chandel, V. (2023). Molecular approaches in plant host-virus interaction studies. En *Plant RNA Viruses: Molecular Pathogenesis and Management* (pp. 349–360). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95339-9.00003-X>
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., & Mise, K. (2004). The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance

movement. *Journal of General Virology*, 85(6), 1751–1761.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.79976-0>

Tamborindeguy, C., Hata, F. T., Molina, R. de O., & Nunes, W. M. de C. (2023). A

New Perspective on the Co-Transmission of Plant Pathogens by

Hemipterans. En *Microorganisms* (Vol. 11, Número 1). MDPI.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010156>

Tran, P. T., Vo Phan, M. S., & Citovsky, V. (2022). Gain-of-function mutant of

movement protein allows systemic transport of a defective tobacco mosaic

virus. *iScience*, 25(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105486>

Villar-Álvarez, D., Pallás, V., Elena, S. F., & Sánchez-Navarro, J. A. (2022). An

Evolved 5' Untranslated Region of Alfalfa Mosaic Virus Allows the RNA

Transport of Movement-Defective Variants. *Journal of Virology*, 96(22).

<https://doi.org/10.1128/jvi.00988-22>

Wang, X., Sager, R., & Lee, J. Y. (2020). Evaluating molecular movement through

plasmodesmata. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 160, pp. 99–117).

Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.04.008>

Wieczorek, P., & Obrępańska-Stęplowska, A. (2015). Suppress to Survive—

Implication of Plant Viruses in PTGS. En *Plant Molecular Biology Reporter*

(Vol. 33, Número 3, pp. 335–346). Springer New York LLC.

<https://doi.org/10.1007/s11105-014-0755-8>

Xavier, C. A. D., & Whitfi Eld, A. E. (2023). Plant virology. En *R478 Current Biology*

(Vol. 33).

Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 1971

Sep;35(3):235-41. doi: 10.1128/br.35.3.235-241.1971. PMID: 4329869; PMCID:

PMC378387.

Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020). Development of Infectious Clone of Virus. In: Characterization of Plant Viruses . Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_46

Bol J.F. (2008) Alfalfa mosaic virus. B.W.J. Mahy, M.H.V. Van Regenmortel (Eds.). Encyclopedia of Virology (third ed.). Academic Press. Massachusetts. pp. 81-87.

Bol, J.F., Linthorst, H.J.M. (2011). Alfamovirus. In: Tidona, C., Darai, G. (eds) The Springer Index of Viruses. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-95919-1_24

Calderón-Pérez B, Piedra-Ibarra E, de la Torre-Almaráz R, Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R. Host-specific loss of sequences of an alfalfa mosaic virus isolate during systemic infection. *Virus Res.* 2019 Oct 15;272:197703. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197703. Epub 2019 Aug 11. PMID: 31412275.

Calil IP, Fontes EPB. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Ann Bot.* 2017 Mar 1;119(5):711-723. doi: 10.1093/aob/mcw200. PMID: 27780814; PMCID: PMC5604577.

Carbonell, A., García, J.A., Simón-Mateo, C. and Hernández, C. (2016). Plant Virus RNA Replication. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022338>

Carrasco JL, Sánchez-Navarro JA, Elena SF. Exploring the role of cellular homologous of the 30K-superfamily of plant virus movement proteins. *Virus Res.* 2019 Mar;262:54-61. doi: 10.1016/j.virusres.2018.02.015. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29475053.

Choudhary, Nandlal & Kumari, Pooja & Panda, Soumya. (2020). RNA plant viruses: biochemistry, replication and molecular genetics. 10.1016/B978-0-12-818654-1.00014-1.

Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci.* 2017 Jun;13(2):48-57. PMID: 28824341; PMCID: PMC5542916.

Fajardo TVM, Peiró A, Pallás V, Sánchez-Navarro J. Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *J Gen Virol.* 2013 Mar;94(Pt 3):677-681. doi: 10.1099/vir.0.048793-0. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23136366.

Folimonova SY, Tilsner J. Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem. *Curr Opin Plant Biol.* 2018 Jun;43:82-88. doi: 10.1016/j.pbi.2018.02.001. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29476981.

Gopinath K, Kao CC. Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* 2007 Apr;19(4):1179-91. doi: 10.1105/tpc.107.050088. Epub 2007 Apr 6. PMID: 17416731; PMCID: PMC1913753.

Guo M, Ye J, Gao D, Xu N, Yang J. Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnol Adv.* 2019 Jan-Feb;37(1):259-270. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.12.008. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30579929.

Herranz MC, Pallas V, Aparicio F. Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 Aug;25(8):1093-103. doi: 10.1094/MPMI-04-12-0079-R. PMID: 22746826.

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci.* 2013 May 24;4:154. doi: 10.3389/fpls.2013.00154. PMID: 23745125; PMCID: PMC3662875.

Hong JS, Ju HJ. The Plant Cellular Systems for Plant Virus Movement. *Plant Pathol J.* 2017 Jun;33(3):213-228. doi: 10.5423/PPJ.RW.09.2016.0198. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28592941; PMCID: PMC5461041.

Huang M, Wu Z, Li J, Ding Y, Chen S, Li X. Plant Protection against Viruses: An Integrated Review of Plant Immunity Agents. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 23;24(5):4453. doi: 10.3390/ijms24054453. PMID: 36901884; PMCID: PMC10002506.

Hull R. 2002. *Mathews' Plant Virology*. Fourth edition. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1001 p.

Hull R. Replication of Plant Viruses. *Plant Virology.* 2014:341–421. doi: 10.1016/B978-0-12-384871-0.00007-8. Epub 2013 Nov 18. PMCID: PMC7184227.

Hwang HH, Yu M, Lai EM. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book.* 2017 Oct 20;15:e0186. doi: 10.1199/tab.0186. PMID: 31068763; PMCID: PMC6501860.

Karthik, Chinnannan & Arulselvi, Padikasan & AU, Sathiya & Subramaniyan, Govindaraju. (2018). *Agricultural Biotechnology: Engineering Plants for Improved Productivity and Quality*. 10.1016/B978-0-12-815870-8.00006-1.

Katis, N. & TSITSIPIS, JOHN & Stevens, Mark & Powell, Glen. (2007). Transmission of plant viruses by aphids.

Kwon MJ, Kwon SJ, Kim MH, Choi B, Byun HS, Kwak HR, Seo JK. Visual tracking of viral infection dynamics reveals the synergistic interactions between cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus 2. *Sci Rep.* 2023 May 4;13(1):7261. doi: 10.1038/s41598-023-34553-6. PMID: 37142679; PMCID: PMC10160061.

Lefeuvre, P., Martin, D.P., Elena, S.F. *et al.* Evolution and ecology of plant viruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 632–644 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3>

Liu JZ, Li F, Liu Y. Editorial: Plant Immunity against Viruses. *Front Microbiol.* 2017 Mar 29;8:520. doi: 10.3389/fmicb.2017.00520. PMID: 28424667; PMCID: PMC5372787.

Lucas WJ, Ham B-K, Kim J-Y (2009) Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol* 19(10):495–503. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.07.003>

Mahmoudabadi G, Phillips R. A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *Elife.* 2018 Apr 19;7:e31955. doi: 10.7554/eLife.31955. PMID: 29624169; PMCID: PMC5908442.

Mandadi KK, Scholthof KB. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell.* 2013 May;25(5):1489-505. doi: 10.1105/tpc.113.111658. Epub 2013 May 24. PMID: 23709626; PMCID: PMC3694688.

Marintcheva, Boriana. (2018). Introduction to Viral Structure, Diversity and Biology * *Parts of this chapter were originally published in Marintcheva B. A box of paradoxes: the fascinating world of viruses. *Bridgew Rev* 2013;32(2):25–8. http://vc.bridgew.edu/br_rev/vol32/iss2/8 and are reproduced here with the permission of the editor.. 10.1016/B978-0-12-810514-6.00001-5.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Viruses: Definition, Structure, Classification. *Molecular Virology.* 2013 Aug 12:17–30. doi: 10.1007/978-3-642-20718-1_2. PMCID: PMC7123905.

Moeder, Wolfgang & Yoshioka, Keiko. (2008). Lesion mimic mutants. *Plant signaling & behavior.* 3. 764-7. 10.4161/psb.3.10.6545.

Ng JC, Falk BW. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:183-212. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325. PMID: 16602948.

Pallas V, García JA. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol.* 2011 Dec;92(Pt 12):2691-2705. doi: 10.1099/vir.0.034603-0. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21900418.

Park MR, Seo JK, Kim KH. Viral and nonviral elements in potexvirus replication and movement and in antiviral responses. *Adv Virus Res.* 2013;87:75-112. doi: 10.1016/B978-0-12-407698-3.00003-X. PMID: 23809921.

Piedra-Ibarra, Elías & Almaráz, Rodolfo & Zúñiga, Gerardo & Xoconostle-Cázares, Beatriz & Ruiz-Medrano, Roberto. (2005). *Leonotis nepetaefolia*: An important plant virus reservoir in central Mexico. *Phytoparasitica.* 33. 480-494. 10.1007/BF02981397.

Pooja Sharma, Chapter 10 - Epidemiology of potyviruses infecting crops of cucurbitaceae, Editor(s): Rajarshi Kumar Gaur, Basavaprabhu L. Patil, Ramasamy Selvarajan, *Plant RNA Viruses*, Academic Press, 2023, Pages 213-227, ISBN 9780323953399, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95339-9.00016-8>.

Raoult D, Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Apr;6(4):315-9. doi: 10.1038/nrmicro1858. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18311164.

Sacristán S, Díaz M, Fraile A, García-Arenal F. Contact transmission of Tobacco mosaic virus: a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. *J Virol.* 2011 May;85(10):4974-81. doi: 10.1128/JVI.00057-11. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21367909; PMCID: PMC3126215.

Sánchez-Navarro, Jesús & Herranz, M. & Pallás, Vicente. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of

ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology*. 346. 66-73. 10.1016/j.virol.2005.10.024.

Scholthof HB. Molecular plant-microbe interactions that cut the mustard. *Plant Physiol*. 2001 Dec;127(4):1476-83. PMID: 11743091; PMCID: PMC1540180.

Scholthof HB. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci*. 2005 Aug;10(8):376-82. doi: 10.1016/j.tplants.2005.07.002. PMID: 16023398.

Sharma, Pooja. (2023). Epidemiology of potyviruses infecting crops of cucurbitaceae. 10.1016/B978-0-323-95339-9.00016-8.

Spoel SH, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jan 25;12(2):89-100. doi: 10.1038/nri3141. PMID: 22273771.

Suman, Rashmi & Rishi, Narayan & Chandel, Vanita. (2023). Molecular approaches in plant host-virus interaction studies. 10.1016/B978-0-323-95339-9.00003-X.

Takeda A, Kaido M, Okuno T, Mise K. The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *J Gen Virol*. 2004 Jun;85(Pt 6):1751-1761. doi: 10.1099/vir.0.79976-0. PMID: 15166461.

Taliansky, M., Torrance, L., & Kalinina, N. O. (2008). *Role of Plant Virus Movement Proteins. Methods in Molecular Biology™*, 33–54. doi:10.1007/978-1-59745-102-4_3

Tamborindéguy, Cecilia, Fernando Teruhiko Hata, Rúbia de Oliveira Molina, and William Mário de Carvalho Nunes. 2023. "A New Perspective on the Co-Transmission of Plant Pathogens by Hemipterans" *Microorganisms* 11, no. 1: 156. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010156>

Tran PT, Vo Phan MS, Citovsky V. Gain-of-function mutant of movement protein allows systemic transport of a defective tobacco mosaic virus. *iScience*. 2022 Nov 3;25(12):105486. doi: 10.1016/j.isci.2022.105486. PMID: 36419850; PMCID: PMC9676214.

Villar-Álvarez D, Pallás V, Elena SF, Sánchez-Navarro JA. An Evolved 5' Untranslated Region of Alfalfa Mosaic Virus Allows the RNA Transport of Movement-Defective Variants. *J Virol*. 2022 Nov 23;96(22):e0098822. doi: 10.1128/jvi.00988-22. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36314818; PMCID: PMC9683001.

Vlot A.C., Klessig D.F., Park S.-W. (2008a). Systemic acquired resistance: The elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 436–442

Vlot AC, Neeleman L, Linthorst HJ, Bol JF. Role of the 3'-untranslated regions of alfalfa mosaic virus RNAs in the formation of a transiently expressed replicase in plants and in the assembly of virions. *J Virol*. 2001 Jul;75(14):6440-9. doi: 10.1128/JVI.75.14.6440-6449.2001. PMID: 11413311; PMCID: PMC114367.

Wang, Xu & Sager, Ross & Lee, Jung-Youn. (2020). Evaluating molecular movement through plasmodesmata. 10.1016/bs.mcb.2020.04.008.

Weimer J. (1931). Alfalfa mosaic. *Phytopathology* 21, 122–123.

Wieczorek, Przemyslaw & Obrepalska-Stepłowska, Aleksandra. (2014). Suppress to Survive—Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Molecular Biology Reporter*. 10.1007/s11105-014-0755-8.

Xavier CAD, Whitfield AE. Plant virology. *Curr Biol*. 2023 Jun 5;33(11):R478-R484. doi: 10.1016/j.cub.2023.03.038. PMID: 37279679.

ANEXOS

Secuencias de los componentes genómicos completos de los distintos aislados de AMV utilizados en el presente trabajo:

-AMV-Alfalfa:

>RNA1 c.6 AMV-Alfalfa:

```
CGTTTTTATCTTACACACGCTTGTGcAAGATAGTTAATCCATTTATTTTCcTGCaCTTTCC
ACAGCATTACGTTCAATCAACTGTGAAGaTTCACATGAATGCTGACGCCCAATCCACC
GATtCCAGCCTTAGTATGCGAGAACCTTTATCTCATGCCTCCATTCAGGAGATGCTTCGACG
TGTgGTTCGAAAAaCAAGCTGCAGACGACACAACCTGCgATCGGAAAgGTTTTcTCCGAAGCGG
GTCGTGCCTATGCCCAGGATGCTCTCCCTTCAGACAAAGGTGAAGTCTTGAAGATATCCTTT
TCCCTGGAtGCCACGCAACAAAACATACTACGCGCCAACCTTTCCTGGTCGACGtAtTGTATT
TTCAAACAGTTCGAGTTCATCTCACTGTTTTGCGGCTGCCCATCGTCTACTAGAAACCGATT
TTGTTTACCGATGTTTCGGTAATACGGTTGATAGTATTATAGACCTTGGAGGAAATTTcGTT
TCCCATATGAAGGTGAAGCGGCATAATGTACATTGCTGCTGTCCCATATTGGATGCTAGAGA
CGGAGCaAGGCTCACGGAGAGAATATTGTCTCTAAAGTCGTAtGTCCGAAAACACCCGGAAA
TTGTGGGTGAAGCAGATTACTGtATGGACACGTTTCAGAAATGCTCAAGGCGAGCTGACTAT
GCTTTTGCCATCCATTCTACTAGCGATCTCGACGTGGGAGAGTTGGCATGTAGTTTGGACCA
AAAAGGCGTTATGAAATTCATTTGCACCATGATGGTTGATGCAGATATGTTAATTCATAACG
AGGGGGAAATTCCTAACTTTAATGTTAGATGGGAGATCGATCaTAAGAAcGATCTCATTTCAT
TTCGACTTCATCGACGAGCCCAAcTTGGGATATAGTCATCGGTTTTTCATTGcTgAAACACTA
TTTGACTTACAATGCCGTTGATTTGGGTCATGCTGCTTATCGAATCGAACGTAAGCAAGATT
TTGGAGGTGTGATGGTTATTGACTTAACTTATTCCCTTGGATTTGTCCCCAAGATGCCACAC
TCCAATGGGAGGTCCTGCGCCTGGTATAATAGAGTCAAAGGACAAATGGTAGTGCACACCGT
TAACGAGGGGTACTATCATCATTACATACCAGACAGCAGTGAGGCGGAAAGTgCTTGTGCACa
AGAAAGTGCTTACCAGAGTACTGAAGTcGCcTTTAGGCAATTCAGACCTAACTcCTGATGCT
CATTCCGCAATTCAGTCCATAGCGACTATGTTATCTTCTTCAACGAATCATACCATtATCGG
TGGTGTGACTCTGATTTCCGGcAAACCTCTCAGCCCGGATGACTATATTCCAGTGGCAACAA
CGATTTATTATAGAGTaAAAAAACTCTATAACGCCATTCCAGAGATGcTATCCCTCCTAGAC
```

AAaGGAGAGAGgcTATCaACTGATGCTGTTTTAAAAGGGTCTGAAGGTCCAAcGTGGTATTC
TGGTCCTACCTTTTTAAGcGCGCTGGATAAaGTCAATGTTCTGGTGATTTTGTGCGCCAAAG
CTCTGTTGTCGTTGCCTAAGAGAGATcTGAAATCTCTATTTTCTAGGTCAGCGACTTCTCAT
TCTGAACGGACACCGGTTCaGGAtGAGAGCCCCgTTCGATGcACAGACGGTGTCTTcTgCCC
TAcAAGGATGTTGTTGAAATGCCTAGGAAGTGACAAATTTGAGTCGGTCACTATAACTGATC
CTAGAAGTAACACGGAAACTACCGTGGATTTATACCAATCTTTcCAAAAGAAAATTGAAACG
GTTTTCTCATTtATTCTTGAAAGATTGATGGTCCTTACCTCTAATTTCTGATCCAGTATA
CTTCCAATCACTTGAAGATGTGTACTATGCTGAATGGCATCAAGGAAATGCCATcGATGCGT
CAAgTTACGCACGTACCCTGTTAGACaATATCAGGAAGCAGAAAGAAGAGAGCTTAAAAGCT
AAAGCGAAGGAAGTTGAAGATGCTCAAAAATTAATAGAGCAATTTTGCAAGTTCATGCCTA
TTTGAAGCTCATCCaGATGGAaGAAAAATCGAAGGACTGGGGTTGAGTTCTCAGTTCATCG
CgAAAATCCCCGAGCTTGCAATCCAACaCCAAAACCGTTACCTGAATTCGAGAAGAACGCA
GAAACTGGCGAAATTTTGCATCAAcCCTCATTAGATGCCATTCTTGAAGCAATTGATTA
CTTGAAGTCCACTTCAGCCAATTCTATCATTACCTTGAATAAATTGGGTGATCATTGTCAGT
GGACGACAAAAGGTCTTGATGTAGTATGGGCCGGTGACGATAAACGTGAGCTTTCATCCCA
AAGAAAAATACTTGGGTTCGACCTACTGCaAGAAGcTATCCCCTTGCAAAATATGAAAGAGC
AATGAGCAAGGACGGATAtGTAActCTGAGATGGGACGGAGAAGTTCTAGATGCTAATTGCG
TCAGGAGTTTATCTCAATACGAGATTGTCTTTGTTGACCAATCTTGCGTCTTGCCTCAGCG
GAacGTATCATTCCAAGCCTaGAGAAAGCCCTAGGTCTTGAAGCACACTTTTCAGTTACGAT
TGTTGATGGAGTTGCTGGTTGCGGAAAAACCACCAATATCAAGCAAgTAGCCCGTTCATCGG
GTCaGGATGTGGATTTGATCCTTACCAGCAATCGTAGCTCTGCCGATGAgTTaAAAGAAACC
ATCGATTGTTACCGTTGACAAAGTTGCATTACATTCgTACCTGTGATTCTTACTTGATGTC
TGCCTCGGCGGTAAAAGCACAGAGGTTAATTTTTGATGAATGTTTTTcGCAACATGCAGGTT
TAGTCTATGCCGCTGCcACTTTAGCTGGTTGcAGCGAAGTCATTGGTTTTGGTGACACGGAA
CAAATTCCTTTTGTCTCAAGGAATCCGTCATTTGTTTTTCGTCATCATAAGCTAACTGGGAA
AGTCGAGAGgAAATTAATTACCTGGAGATCCCCAGCAGATGCCACCTATTGCCTTGAAAAGT
ATTTTTACAAGAACAAGAGaCCGGTGAAGACAAATTCAGAGTACTAAGATCTATCGAAGTT
GTGCCGATAAATCCCCTGTGAGCGTTGAGAGAAATACCAACGCTCTTTATTTGTGTCATAC
TCAAGCTGAAAAgGCAGTTTTGAAAGCTCAAACACATtTAAAGGGATGtGATAATATCTTTA
CTACTCATGAAGCTCAGGGTAAGACTTTTCGACAATGTTTATTTCTGTCGTTTAACTCGTACC
TCAACGAGTCTTaCTACTGGTAGAGATCCAATAAATGGtCCATGCcATGGATTAGTTGCCTT

GTCGAGACACAAGAAGACTTTTAAATATTTTACCATCGCCCATGATAGCGATGATGTGATCT
ACAATGCTTGTAGAGATGCCGTAATACCGACGATAGTATTtTAGCGAGGAGCTATAATaCT
AATTTCTGAATTAGTCATTGGTAATTCAATGCCAACCTCCACTGGGTGGaTTAAGGTTGAGG
TATAGAAcCCTATTCGCTCCTGATAGGAAAgATTCTATATTGCTTATATACaTGCTTATGCA
tGTATATAAATGCTCATGCTAAATTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCTGCTTATGCAtGTA
TATAAATGCTCATGCTAAATTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA2-4270 AMV-Alfalfa:

CGTTcTTATCTTTTCGCGATTGAAAAGATAAGTTTTTTCAGTTTAATCTcTTCAATATGTTC
ACTCTTTTGAGATGTCTtGGaTTTGGTgTcAGTGAACCcACTgAcACTTCCTCATCAGAGTA
TGTTtCCaAGAGTTCCGTTGAgGAGATTTCCAACGAAGTtaCTGAACTCGATTcAGTaGATC
CATCATTCCgATGTTACgAACGTaTTcTcGTATCATTGATGCTCGTAAGAAAGATGACTCAA
GCTGCCGAgGACTTCCACAAATcaTTTGGGGaAGAAcTCGATAGCCCTTGTTGTAGGGTcTA
CCGTCTTTAcAGACATTTcGTTAATGAAGACGATGCACctGCTTGGGCCATACCGAAcGTCG
TGAATGAAGATTCTTACGACGAaTATGCCTACCTCCaAGAGGAGTTAGATGCCATcAAAtAaC
TCTTTTGAGTTGCTAAAtGAAGAGCGTGAGTTATCGGAgATTACGGACAGgCTCAACGCTTT
AAGATTTTTcCCTGTTTctAAAACgGAAGCGCTACCAGTGGCGAATGTCCAAGAGGTCAAAt
TCATTTCTGAGAACATAACCAGTtATTGATGACCTTTATTAtTACTCTGACGAGAATATTCCG
TCTGAAtTGCCctCACCTACTGGATGAGTTGGGGAaGTTgCCaGAGGAtCTTGGACCTCT
GAATGAAAtGAAGACATTAAGCCGGTGGCGGcTCCAATCacATTACTATCTGAGTTcAAAG
CCTCAGATAATGCTAAGCCACTCGACATAGTCGAAAttgTTCCAGACGTaAGTCTGACGAAA
CCTTATGAAGCCGTCATATCAGGTAATGATTGGATGACGTTGGGGAGGATGATACCTACCgC
TCCCATTCTACCATAAGGGATGTCTTCTTCTCTGGCCTTCTCGGCATGGATCGCCGGAAG
TGATCCAGAATGCTCTTGATGAATTcCTTCCGCTCCATCATTCAATTGATGATAgGTATTTT
CAAGAATGGGTTGAAAcTCAGATAAATCTCTCGATGTCGATCCATGTCGAATCGATCTaAG
CGTTTTCAACAActGGCAGTCTTCGAAAAGCTGCTATGAACCTCGGTTtAAAACCGGTGCAT
TATCCACACGcAAGGGCACTCAAActGAAGCCCTATTAGCGATAAAGAAACGTAATATGAAT
GTGCCTAACCTGGGGCAGATTTATGACGTGAATTCTGTTGCTAATTCCGTGGTTAATAAGtT
CTTAACAActGTTATAGATCCTGATAAGtTATGCATGTTTCCAGATTTTATATCTGAGGGTG
AAGTTTCaTATTTCCAGGACTATATAGTTGGgAAGAATCCCGACCCTGAATTATATTCAGAc

CCTCTAGGtGTcCGTTCCATCGACAGCTATAAACACATGATTAATCCGTGTTAAAGCCCGT
TGAAGATAATTCTCTaCACCTAGAACGGCCGATGCCAGCAACCATAACaTACCATGATAAAG
ATATCGTGATGTCATCTTCACCAAtTTTctTGgCTGCTGCTGCCCGCTTGATGTtGATCTTA
AGAGATAAGATAACcATACCAAGCGGAAAATTCCATCAATTGTTTTCCATCGATGCTGAAGC
CTTtGATGCAAGcTTCCaTTTTAAAGAGATAGACTTTTTCGAAGTTCGAtAAAAGTCAAAaTG
AGTTGCATCACTTGATcCAAGAAAGGcTTCTGAAATACTTAGGTATACCCAACGAATTTCTg
ACCTTATGGTTTAATGCGCATAGAAAATCCCGAATCTCAGATTCGAAGAATGGCGTTTTCTT
TAACGTGATTTCCAACGTCGTA CTGGAGATGCGCTCACATACTTGGGAAACACAATAGTGA
CATTAGCTTGTCTgTGTCATGTGTATaACTTGATGGACCCAAATGTGAAATTCGTTGTtGCT
TCCGGTGATGATTCATTGATAGGTA CTGTGGAGGAATTACCAAGAGATCAAGAGTTTCTTTT
CACGACTCTTTTTAATCTTGAGCcAAAaTTTCCTCATAACCAGCCTTTCATATGCAGTAAaT
TTTTaATTACTATGCCCACTtTgAGTGGAaGCAAAGTTGTaCTGCCgGTACCGAATCCATTG
AAACTCCTCATA CGCTTGGGTTCGAAGAAAGTCAATGCCGATATATTCGATGAATGGTATCA
ATCTTGGATTGATATAATTGGtGTTTTTAAtGAtCACCATGTCATCCGATGCGTTGCCGCGA
TGgCAGCACAcAGGTATCTtAGAAGACCGAGTTTgTACCTAGAAGctGCTTTgGAATCCCTA
GGTAAGATCTTCGCgAGTAAaACCTTGTGTAAGGAATGCCTCTTTAATGAGAAGCACGAGTC
TAATGTAAAAATTAAGCCTCGTAGAGTGAAAAAATCCCACTCGGAcGCCAGGTCAAGGGCgC
GtCGAGCTTGATGTTTTCTTGACATAAGTCAAATTGCCAACCTCCACTGGGTGGaTTAAGGT
TGAGGTATAGAATCCTATTCGCTCCTGATAGGAGAAATTCTATATTGCTTATATATGTGCTT
AcGCACtTATATAAATGCTCATGCAAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCAAATGCTCA
TGCAAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA3 AMV-Alfalfa:

GTATTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACAGTGTAATTC
GTA CTTTTCGTAAGTAAGTTTCTGTAAAAGCGTTTCTTGTTTTAATTTGGCCTAACACGTAA
TTCGTA CTCTTCGTGAGTAAGTTGTGTTAGCCATACCTATCCTTTAAATTTCTGTCAATTTA
AAAAGAAAATCATTCCCATTCGCGTAATTCGTA CTCTTCGTGAGTAAGTTGCAAATGGAGAA
TACAAAAACAAATGCCTCGAGTTCTGGAATGTCTTCTTCCAGCTTTTCAAGTGTCTTATG
CTGAGGAAATGTTACTAGCTGATGAAGTTTCAAAAATAAACTCAATGTCTATTCTGGGTCCT
AATCAGCTAAAGCTCTGCACTCAATTGGTGTGTCTAATGGAGCAGCGCCAGTAGTTTTAAG

CCTTGTGTCAAAGGAAAAGAAATCGATTTTGAATCGTATGCTTCCTAAGATTGGACAGAGGA
TGTACGTCCATCACTCGGCTATTTACCTCCTTTATATGCCAAATATACTGAAAAGTTCTTCA
GGGAGCATCACCTTGAAGCTTTTTAATGAGGCTACAGGAGAGTTAGTGGATGTTGACACCGA
CCATGATGCTACCCAGGCATGTATATTTGCTGGACGTTACCCCCGGAGTATTCTGGCGAAAG
ATGCGGCGAAAGGACACGACTTAAAATTAGTCGTCCACGCTGTTGCTTCGACCAATGCGAAC
TCCGCTGTCGGTGTCTATACCCATTTGGGAAGATGAGTTAAGCAGAAAGCAGATCCTCGA
AAGGGGTGCCGATTTCTAAAGTTTCCAATTGCTGAGACCGAACCCAGTCCGCGATCTCTTAA
ATGCTGGGAAATTGACGGACTTTGTTCTTGATAGGACAAGGTTAGGCGTGGGATCAAAGAAT
GATCCCAGTCCGTTCTTTTAGAACCAAGAGCTAAGATTACCGGAAGGCAAAGACACTTTT
TATTCGGAAGGTCCTAGTGTTCTAATAACCACTATAAATGGTATTGCACCAACGGTGCCTA
TAGATGCCGGTCTCCAAAGGGTCTTGAGTTCGAAAGGGTTTACATATGAAAGTTTTATT
AAAGATGAGATATTACCTGATCATTGATCGGTAATGGGCCGTTTTATTTTTAATTTTCTTTC
AAATACTTCCATCATGAGTTCTTCACAAAAGAAAGCTGGTGGGAAAGCTGGTAAACCTACTA
AACGTTCTCAGAACTATGCTGCTTTACGCAAAGCTCAACTGCCGAAGCCTCCGGCGTTGAAA
GTCCCGGTTGCAAACCGACGAATACTATACTGCCACAGACGGGCTGCGTGTGGCAAAGCCT
CGGGACCCCTCTGAGTCTGAGCTCTTTAATGGGCTCGGCCTGAGATTCTTTACAGTTTTTC
TGAAGGATTTGCGGGGACCTCGGATCCTCGAAGAGGATCTGATTTACAGGATGGTGTTTTCT
ATAACACCGTCCCATGCCGGCACCTTTTGTCTCACTGATGACGTGACGACTGAGGATGGTAG
GGCCGTTGCGCATGGTAATCCCATGCAAGAATTTCTCAAGGCGCGTTTCACGCCAATGAGA
AGTTCGGGTTTGAGTTGGTCTTCACAGCTCCTACCCATGCGGGAATGCAAAATCAAAATTC
AAGCATTCTATGCCGTAGCCCTCTGTCTGGACTTCGATGCGCAGCCTGAGGGATCTAAAAA
TCCCTCATACCGATTCAACGAAGTTTGGGTCGAGAGAAAGGCGTTCCCGCGAGCAGGGCCCC
TCCGCAGTTTGATTACTGTGGGGCTGCTCGACGAAGCTGACGATCTTTGATCGTTATTGATG
TACCCCATTAATTTGGGATGCTAAAGTCATTTAATGCTGACCTCCACTGGGTGGATTAAGGT
CAAGGTATGAAGTCTATTGCTCCTGATAGGAACGACTTCATATTGCTTATATATGTGCTG
ATGCACATATATAAATGCTCATGCAAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCATGCAAAAC
TGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

-AMV-Arabidopsis:

>RNA1 AMV-Arabidopsis:

GTATTTATCTTACACACGCTTGTGCAAGATAGTTAATCCATTTATTTTCCTTGCACTTTCCA
CAGCATTACGTTTCATTCGATACTGTGATGATTTCACTatgaatgctgacgcccaatccaccg
attccagccttagtatgcgagaacctttatctcatgcctcattcaggagatgcttcgacgt
gtagtcgaaaaacaagctgcagacgacacaaccgcatcggaaggttttctccgaagcggg
tcgagcctatgccaggatgctctcccttcagacaaaggtgaagtcttgaagatatcctttt
ccctggacgccacgcaaaaaacatactacgcgccaactttcctggctgacgtattgtattt
tcaaacagttcgagttcatctcactgttttgcggtgcccatcgtctactagaaaccgattt
tgtttaccgatgttttggttaatacggttgatagattatagaccttggaggaaattttgttt
cccatatgaaggtaaagcggcataatgtacattgctgctgtcccatattggatgctagagac
ggagctaggctcacggagagaatattgtctctaaagtcgtacgtccgaaaacaccggaaat
tgtgggtgaagcagattactgcatggacacgtttcagaaatgctcaaggcgagctgactatg
cttttgccatccattctactagcgatctcgatgtgggagagttagcatgtagtttgaccaa
aaaggcgttatgaaattcatttgcaccatgatggttgatgcagatatgttaattcataacga
gggggaaattcctaacttcaatgtagatgggagatcgatcataagaacgatctcattcact
tcgacttcatcgacgagcccaatttgggatatagtcacgttttctttgttaaaacactat
ctgacttataatgccgttgatttgggtcatgctgcttatcgaatcgaacgtaagcaagattt
tggaggtgtgatggttattgacttaacttattcccttggttttgtcccaagatgccacact
ccaatgggaggtcctgctgctggtataatagagtcaaaggacaaatggtagtacacaccggt
aacgaggggtattatcatcattcataccagacagcagtgaggcggaaagtacttgtcgataa
gaaagtgcttaccagagttactgaagttgcctttaggcagttcagacctaattctgatgctc
attccgcaattcagtcctatagcgactatgttatcttcttcaacgaatcataccattatcgggt
ggtgtgactctgatctcgggtaaacctctcaaccggatgactacattccagtggcaacaac
gatttattatagagtgagaaaactctataacgccattccagagatgttatccctcctagaca
aaggagagagattatcgactgatgctgttttaaaaggttctgaaagtccaacgtggtattct
ggtccgaccttttaagtgcactggataaagtcaatgttcctggtgattttgtcgccaaagc
tctgttgtcattgccaagagagatctgaaatctctatcttaggtcagtgacttctcctt
ctgaacggacaccggttcaggacgagagccccgttcgatgtacagacgggtgtcttttacct
ataaggatgttgttgaaatgcctaggaagtgacaaatcttaggtcgggtcactataactgatcc

tagaagtaacacggaaactaccgtggacttataccaatctttccaaaagaaaattgaaacgg
ttttctcatttattccttgaaaggttaatggtccttcacctctgatttctgatccagtatac
ttccaatctcttgaagatgtatactatgctgaatggcatcaaggaaatgccattgatgcgtc
aagttacgcacgtaccctgtagacaatatcaggaagcagaaagaagagagcttaagagcta
aagcgaaggaagttgaggatgctcaaaaactaaatagagcaattttgcaagttcatgcctat
ttggaagctcatccagatggaagaaaaatcgaaggattggggttgagctctcagttcatcgc
aaaaatccccgaactcgcaattccaacaccaaaccgttgcctgaattcgagaagaacgcag
aaactggcgaaattttgcgtatcaatcctcattcagatgccattcttgaagcaattgattac
ttgaagtccacttcagccaattctatcattaccttgagaaaattgggtgatcattgtcagtg
gacgacaaaaggcttctgatgtagtatgggcccggtagcagataaacgtcgagctttcatccaa
agaaaaatacttgggtcggacctactgctagaagttatcctcttgcaaaatatgaaagagca
atgagcaaggatggatacgtaacctgagatgggacggagaagtcttagatgctaattgcgt
caggagtctgtctcaatacagagattgtctttgttgaccaatcttgcgtctttgcctcagcag
aacgtatcattccaagcctagagaaaagccctaggtcttgaagcacacttttcagttacgatt
gttgatggagttgctggttgcggaaaaaccaccaatatcaagcaattagctcgtttatcggg
tcaggatgtggatttgatccttaccagcaatcgtagctctgccgatgagttaaaagaaacca
tcgattgttcaccgttgacaaagttgcattacattcgtacctgtgattcttacttgatgtct
gcctcggcggtaaaagcacagaggttaatcttcgatgaatgttttttgcaacatgcaggctc
agtctatgccgctgctactttggctggtagtaacgaagttattggatttggtgacacggaac
aaattccttttgtctcaaggaatccgtcgtttgtttccgtcaccataagctaactgggaaa
gtcgagaggaaattgattacctggagatcccagcagatgccacctactgtcttgaaaaata
tttttacaagaccaagaagccggtgaagacaaattccagagtactaagatctatcgaagtgc
tgccgataaattcccctgtgagcgttgagagaaataccaacgctctttatttgtgtcact
caagctgaaaaggctgttttgaaagctcaaacacatttaaagggatgtgataatatctttac
tactcatgaagctcagggtgaagactttcgacaatgtttatctgtcgtttaactcgtacct
caacgagcttactactggtagagatccgataaatggcccttgccatggattagttgccttg
tcgagacacaagaagacttttaaatatttaccatcgcccatgatagcagatgatgcgatcta
caatgctttagagatgccggtaataccgacgatagtattttagcgaggagctataatacta
atctctgaATTAGTCATTGGTAATCAATGCCAACCTCCACAGGGTGGATTAAGGTTGAGGT
ATAGAATCCTATTGCTCCTGGTAGGAGAAATTCTATATTGCTTATATACGTGCTTGTGCAC
GTATATAAATGCTCATGCAAAATTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA2 AMV-Arabidopsis:

GTATTTATCTTTTCGCGATTGAAAAGATAAGTTTTTCAGTTTAATCTTTTCAATatgttcac
tcttttgagatgtcttggatttgggtgtcagtgaacctgctgacacttcctcatcagagtatg
ttccaagaattccgttgaagagatttccaacgaagttactgaacttgattcagtagatcca
tcatcccaatgttacgaacgtattctcgtatcattgatgctcgtagaagaagatgactcaagc
tgccgaggacttccacaaatcatttgggggagaactcgatagcccttggtgtagggtttacc
gtctttatagacattttgttaatgaagacgatgcacccgcttgggccataccgaacgtcgtg
aatgaggattccttacgacgaatatgcctacctccaagaggagttagatgccattaataactc
ttttgagttgctaaatgaagagcgtgagttatcggaaattacgggcaggctcgacgctttga
gatttttccctgtttcaaaaacagaagcgtaccagtggcggatgtccaagaggtcaaagtc
atctctgagaacataccagttattgatgacctttattattactctgacgagaacattccgtc
tgaactgccctcaccattactggatgagttggggaagttaccggaggatcttggacctctga
atgaaatcgaagacattaagccggtggcggcctcaatcacattgctatctgagtttaaagcc
tcagataatgctaagccactcgacatagtcgaaattattccagacgtaagtctgacgaaacc
ttatgaagccgtcatatcaggtaatgattggatgacgttggggaggatgatgcctaccgctc
ccattcctaccataagggatgtcttcttctctggcctttctcggcacggatcgccggaagtg
atccagaatgctcttgatgaacttcttccgctccatcattcgattgatgacaagtattttca
agaatggggtgaaacttcagataaatctctcgatgtcgcgatccatgtcgaatcgatctgagtg
ttttcaacaactggcagtcctcggaaagctgctatgaacctcggtttaaaaccggtgcatta
tccacacgtaagggcactcaaactgaagccctattagcaataaagaacgtaatatgaatgt
gcctaacctggggcagatttatgacgtgaattctgttgctaattccgtgggttaataagttct
taacaactgttatagatcctgataagttgtgtatgtttccagattttatatctgagggtgaa
gtttcatatttccaggactatatagttgggaagaatcccgaccctgaattatattcagacc
tctaggtattcgttccatcgacagctataaacacatgattaaatccgtgttaaagcccgttg
aagataattctctacacctagaacggccgatgccagcaaccataacataccacgataaagat
atcgtgatgtcgtcttcaccaattttcttggctgctgctgcccgcttgatgttaatcttaag
agataagataactataccaagcggaaaattccatcaattgttttccatcgatgctgaagcct
ttgatgcaagttccattttaaagagatagacttttctaagtttgacaaaagtcaaaatgag
ttgcatcacttgatccaagaaggcttctgaataacttaggtataccaacgaatttctaac

cttatggtttaatgcgcatagaaaatcccgaatttcagattcgaagaatggcgttttcttta
acgtcgatttccaacgtcgtactggagatgctcacatacttgggaaacacaatagtgacc
ctagcttgtctgtgtcatgtgtataacttgatggacccaaatgtgaaattcgttggtgcttc
cggtgatgattcattgataggcactgtggaggaattaccaagagatcaagagtttcttttca
cgactcttttaatcctgaagcaaaatctcctcataaccagcctttcatatgcagtaagttt
ttaattactatgcccactttgagtggaagcaaagttgtactgccggtaccgaatccactgaa
actcctcatagccttgggttcgaagaaagtcaatgccgatatactcgatgaatgggtatcaat
cttggattgatacaattgggtgttttaacgatcaccatgttatccgatgcgttgccgcgatg
acagcacacaggtatccttagaagaccgagtttatacctagaagctgctttagaatccctagg
taagatcttcgctagtaagaccttgtgtaaggaatgcctcttttaatgagaagcacgagtcta
atgtgaaaattaagcctcgtagagtgaaaaaatcccactcggatgccagggtcaagggcacgc
cgagcttgaTGTTTTCTTGACATAAGTCAAATTGCCAACCTCCACTGGGTGGATTAAGTTG
AGGTATAGAATCCTATTCGCTCCTGATAGGAGAAATTCTATATTGCTTATATATGTGCTTAT
GCACATATATAAATGCTCATGCAAAAATTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA3 AMV-Arabidopsis:

GTATTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACAGTGTAATTC
GTACTIONTCGTAAGTAAGTTTCTGTAAAAGCGTTTCTTGTTTTAATTTGGCCTAACACGTAA
TTCGTACTIONTCGTGAGTAAGTTGTGTTAGCCATATCTATCCTTTAAATTTTTGTCAAATTT
AAAAAGAAAAATCATTCCATTTCGCGTAATTCGTACTIONTCGTGAGTAAGTTGCAAccatgg
agaatacaaaaacaaatgcctcgggttctggaatatcttcttccagcttttcagtgtct
tatgctgaggaaatgttactagctgatgaagtttcaaaaatgaactcaatgtcgattctggg
tcctaatacagctaaagctctgcactcagttgggtgctgtctaataaggagcagcacctgtagttt
taagccttgtgtcgaaggaaaagaaatcgattttaaatcgatgcttcaaaaattggacag
aggatgtatgtccatcactcggctatttacctcctttatatgccaaacatactaaaaagttc
ttcagggagcatcaccttgaaactttttaatgaagctacgggagagtttagtggatggtgaca
ccgacatgatgctaccaagcatgtatattgctggacgttaccctcgagatattctggcg
aaagatgctgcgaaaggacatgacttaaaattagttgtccacgcagttgcttcgaccaatgc
gaactctgctgtcgggtgttctataccctctgggaagatgagtttaagcagaaagcagatcc
tcgaaaggggtgccgattttctaaagtttccaattgctgagaccgaaccagtcgctgatctc

ttaa atgctggaaaattgacggacttcgttcttgataggacgaggttgggcgtgggatcaaa
aagagatcccaatccggttcttttggaaaccagagctaaagttgccgggaaagcaaagacag
tttttattcccgaaggccttggcgcttctaataccattgtaa atggatatagcaccgacggtg
cgaatagatgccggttctccaaaaggctcttggagtcccgaagggtttacgtatgaaagttt
tattaaagatgaaatattacctgatcattgaTCGGTAATGGGCCGTTTTTATTTTAAATTT
CTTCAAATACTTCCATCatgagttcttcacaaaagaaagctgggtgggaaagctggtaaacc
tactaaacgttctcagaactatgctgctctacgaaagctcaactgccgaagcctccggcgt
tgaaagtcccggttgcgaaaccgacgaatactatactgccacagacgggctgcgtgtggcaa
agcctcgggaccctctgagtctgagctcttcaa atgggctcgggtgcgagattcctctacag
ttttctgaaggatttcgtagcacctcgaatcctcgaagaggatttgattttcaggatgggtg
tttctataacaccgtcccatgccggctctttttgtctcactgatgacgtgacgactgaggat
ggtagggccggttgcgcatggtaaccccatgcaagaatttcctcatggcgtttttcacgcaa
tgagaagttcggggttgagttggctcttcacagctcctacctgcgggaatgcaaaatcaaa
atthtaaacattcctatgccgtagccctttgtttggacttcgacgctctgcctgagggatct
aagaatccctcataccgattcaacgaagtttgggtcgagagaaaggcgtttccgagcagg
gcccctccgagtttgattactgtggggctgttcgacgatgctgacgatcttgatcgtcaat
gaTGTACCCCATTA ACTTGGGATGCTAAAGTCATTTAATGCTGACCTCCACTGGGTGGATTA
AGGTCAAGGTATGAAGTCCTATTCGCTCCTGATAGGAACGACTTCATATTGCTTATATATGT
GCTAACGCACATATATAAATGCTCATGCAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

-AMV-Leiden:

>RNA1 AMV-Leiden:

GTTTTTATCTTACACACGCTTGTGTAAGATAGTTAATCCATTTATTTTTCCATGCTCTTTCC
ACAGCATTACGTTCAATCAACTGTGAAGATTTCACTATGAATGCTGACGCCCAATCCACC
GATGCCAGCCTTAGTATGCGAGAACCTTTATCTCATGCCTCCATTCAGGAGATGCTTCGACG
TGTAGTCGAAAAGCAAGCTGCAGACGACACAACCTGCAATCGGAAAAGTTTTTTCCGAAGCGG
GTCGTGCCTATGCCCAGGATGCTCTCCCTTCAGACAAAGGTGAAGTCTTGAAGATATCCTTT
TCCCTGGACGCCACGCAACAAAACATACTACGCGCCAACCTTCCTGGTCGACGCACTGTATT
TTCAAACAGTTCGAGTTCATCTCACTGTTTTGCGGCTGCCCATCGTCTACTAGAAACCGATT
TTGTTTACCGATGTTTTCGGTAATACGGTTGATAGTATTATAGACCTTGGAGGAAATTTGTTT
CCCATATGAAGGTGAAGCGGCATAATGTACATTGCTGCTGTCCCATATTGGATGCTAGAGAC
GGAGCTAGGCTCACGGAGAGAATATTGTCTCTAAAGTCGTACGTCCGAAAACACCCGGAAAT
TGTGGGTGAAGCAGATTACTGCATGGACACGTTTTAGAAATGCTCAAGGCGAGCTGACTATG
CTTTTGCCATCCATTCTACTAGCGATCTCGACGTGGGAGAGTTGGCATGTAGTTTGGACCAA
AAAGGCGTTATGAAATTCATTTGCACCATGATGGTTGATGCAGATATGTTAATTCATAACGA
GGGGGAAATTCCTAACTTTAATGTTAGATGGGAGATCGATCGTAAGAAAGATCTCATTCAAT
TCGACTTCATCGACGAGCCCAATTTGGGATATAGTCATCGGTTTTTCATTGTTAAAACACTAT
TTGACTTACAATGCCGTTGATTTGGGTCATGCTGCTTATCGAATCGAACGTAAGCAAGATTT
TGGAGGTGTGATGGTTATTGACTTAACTTATCCCTTGGATTTGTCCCAAGATGCCACACT
CCAATGGGAGGTCCTGCGCCTGGTATAATAGAGTCAAAGGACAAATGGTAGTGCACACCGTT
AACGAGGGGTACTATCATCATTACATACCAGACAGCAGTGAGGCGGAAAGTACTTGTGATAA
GAAAGTGCTTACCAGAGTTACTGAAGTTGCTTTCAGGCAATTCAGACCTAACGCTGATGCTC
ATTCCGCAATTCAGTCCATAGCGACTATGTTATCTTCTTCAACGAATCATACCATCATCGGT
GGTGTGACTCTGATTTCCGGTAAACCTCTCAGCCCGGATGACTATATTCCAGTGGCAACAAC
GATTTATTATAGAGTGAAAAACTCTATAACGCCATTCAGAGATGTTATCCCTCCTAGACA
AGGGAGAGAGATTATCGACTGATGCTGTTTTAAAGGGTCTGAAGGTCCAATGTGGTATTCT
GGTCTACCTTTTTAAGTGCCTGGATAAGGTCAATGTTCCCTGGTGAATTTGTGCGCAAAGC
TCTGTTGTCGTTGCCTAAGAGAGATTTGAAATCTCTATTTTCTAGGTCAGCGACTTCTCATT
CTGAACGGACACCGGTTCCGGACGAGAGCCCCATTGATGTACAGACGGTGTCTTTTACCCT
ATAAGGATGTTGTTGAAATGCCTAGGAAGTGACAAATTTGAGTCGGTCACTATAACTGATCC

TAGAAGTAACACGGAAACTACCGTGGATTTATACCAATCTTTTCAAAGAAAATTGAAACGG
TTTTCTCATTCAATTCTTGGAAAGATTGATGGTCCTTCACCTCTAATTTCTGATCCAGTATAC
TTCCAATCACTTGAAGATGTGTAATGCTGAATGGCATCAAGGAAATGCCATTGATGCGTC
AAATTACGCACGTACCCTGTTAGACGATATCAGGAAGCAGAAAGAAGAGAGCTTAAAAGCTA
AAGCGAAGGAAGTTGAAGATGCTCAAAAATTAATAGAGCAATTTTGCAAGTTCATGCCTAT
TTGGAAGCTCATCCGGATGGAGGAAAAATCGAAGGACTGGGGTTGAGTTCTCAGTTCATCGC
AAAAATCCCCGAGCTTGCAATCCAACGCCAAAACCGTTACCTGAATTCGAGAAGAACGCAG
AAACTGGCGAAATTTTGCATCAATCCTCATTGAGATGCCATTCTTGAAGCAATTGATTAC
TTGAAGTCCACTTCAGCCAATTCTATCATTACCTTGAATAAATTGGGTGATCATTGTCAGTG
GACGACAAAAGGTCTTGATGTAGTATGGGCCGGTGACGATAAACGTCGAGCTTTCATCCCAA
AGAAAAATACTTGGGTCCGACCTACTGCTAGAAGTTATCCCCTTGCAAAATATGAAAGAGCA
ATGAGCAAGGACGGATACGTAACCTGAGATGGGACGGAGAAGTTCTAGATGCTAATTGCGT
CAGGAGTTTATCTCAATACGAGATTGTCTTTGTTGACCAATCTTGCCTCTTGCCTCAGCGG
AGGCTATCATTCCAAGCCTGGAGAAAGCCCTAGGTCTTGAAGCACACTTTTCAGTTACGATT
GTTGATGGAGTTGCTGGTTGCGGAAAAACCACCAATATCAAGCAAATAGCCCCTTCATCGGG
TCGGGATGTGGATTTGATCCTTACCAGCAATCGTAGCTCTGCCGATGAGTTGAAAGAAACCA
TCGATTGTTACCGTTGACAAAGTTGCATTACCTCGTACCTGTGATTCTTACTTGATGTCT
GCCTCGGCGGTAAGAACACAGAGGTTAATTTTTGATGAATGTTTTTTGCAACATGCAGGTTT
AGTCTATGCCGCTGCTACTTTAGCTGGTTGTAGCGAAGTCATTGGTTTTGGTGACACGGAAC
AAATTCCTTTTGTCTCAAGGAATCCGTCAATTTGTTTTTCGTCATCATAAGCTAACTGGGAAA
GTGAGAGAAAGTTAATTACCTGGAGATCCCCAGCAGATGCCACCTATTGCCTTGAAAAGTA
TTTTTACAAGAACAAGAAGCCGGTGAAGACAAATTCAGAGTACTAAGATCTATCGAAGTTG
TGCCGATAAATCCCCTGTGAGCGTTGAGAGAAATACCAACGCTCTTTATTTGTGCATACT
CAAGCTGAAAAAGCAGTTTTGAAAGCTCAAACACATCTAAAGGGATGCGATAATATCTTTAC
TACTCATGAAGCTCAGGGTAAGACTTTGACAATGTTTTATTTCTGTCGTTAACTCGTACCT
CAACGAGTCTTGCTACTGGTAGAGATCCAATAAATGGCCCATGCAATGGATTAGTTGCCTTG
TCGAGACACAAGAAGACTTTTAAATATTTTACCATCGCCCATGATAGCGATGATGTGATCTA
CAATGCTTGTAGAGATGCCGGTAATACCGACGATAGTATTCTAGCGAGGAGCTATAATCATA
ATTTCTGAATTAGTCATTGGTAATCAATGCCAACCTCCACTGGGTGGGTTAAGGTTGAGGT
ATAGAATCCTATTGCTCCTGATAGGAGAAATCTATATTGCTTATATACGTGCTTATGCAC
GTATATAAATGCTCATGCTAAATTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA2 AMV-Leiden:

GTTTTTATCTTTTCGCGATTGAAAAGATAAGTTTTTCAGTTTAATCTTTTCAATATGTTTAC
TCTTTTGAGATGTCTCGGATTCGGTGTTAATGAACCTACTAACACTTCCTCATCAGAGTATG
TTCCCGAGTATTCCGTTGAAGAGATTTCCAACGAAGTCGCTGAACTCGATTAGTGGATCCA
TTATTCCAATGTTACAAACATGTTTTTGTATCATTGATGCTCGTAAGAAAGATGACTCAAGC
TGCCGAAGACTTCCTCGAGAGTTTTGGGGGAGAATTCGATAGCCCTTGTTGTAGGGTTTACC
GTCTTTATAGACATTTTGTAAATGAAGACGATGCACCCGCTTGGGCCATACCGAATGTCGTG
AATGAAGATTCTTACGACGATTATGCCTACCTCCGAGAGGAGTTAGATGCCATAGACAGCTC
TTTTGAGTTGCTAAACGAAGAGCGTGAGTTATCGGAAATTACGGACAGACTCAACGCTTTAA
GATTTTTCCCTGTTTCTAAAACAGAAGCGCTACCAGTGGCGAATGTCCAAGAGGTCAAACCTC
ATTTCTGAGACATAACCAGTTATTGATGACCTTTATTAATACTCTGACGAGAATATTCCGTC
TGAAATGCCCGCACCATTACTGGATGAGTTGGGGATGTTACCGGAGGAACTTGGACCTCTGA
ATGAAATTGAAGACATTAAGCCGGTGGCGGCTCCAATCACATTACTATCTGAGTTTAGAGCC
TCAGATAATGCTAAGCCACTCGACATAGTCGAAATCATTCCAGACGTAAGTCCGACGAAACC
TTATGAAGCCGTCATATCAGGTAATGATTGGATGACGTTGGGGAGGATCATACCTACCACTC
CCGTTCTACCATAAGGGATGTCTTCTTCTCTGGTCTTTCTCGGCACGGATCGCCGGAAGTG
ATCCAGAATGCTCTTGATGAATTTCTTCCGCTCCATCATTCAATTGATGATAAGTATTTTCA
AGAATGGGTTGAAACCTCAGATAAATCTCTCGATGTCGATCCATGTCGAATCGATCTGAGTG
TTTTCAACAACCTGGCAGTCTTCGGAAAACCTGCTATGAACCTCGGTTTAAAACCGGTGCATTA
TCCACACGTAAGGGCACTCAAACCTGAAGCCCTATTAGCGATAAAGAAACGTAATATGAATGT
GCCTAACCTGGGGCAGATTTATGACGTGAATTCTGTTGCTAATTCCGTGGTTAATAAGCTCT
TAACAACCTGTTATAGATCCTGATAAGCTGTGCATGTTTCCAGATTTTCAATCTGAGGGTGAA
GTTTCGATTTCCAGGACTATATAGTTGGGAAGAATCCCGACCCTGAATTATATTAGATCC
TCTAGGTGTTTCGTTCCATCGATAGCTATAAACACATGATTAAATCCGTGTTAAAGCCCGTTG
AAGATAATTCTCTGCACCTAGAACGGCCGATGCCAGCAACCATAACATACCATGATAAAGAT
ATCGTGATGTCATCTTACCAATTTTTTTGGCTGCTGCTGCCCGCTTGATGTTAATCTTAAG
AGATAAGATAACCATAACCAAGCGGAAAATTCATCAATTGTTTTCCATCGATGCTGAAGCCT
TTGATGCAAGTTTCCATTTTAAAGAGATAGACTTTTCGAAGTTTGACAAAAGTCAAATGAG
TTGCATCACTTGATCCAGGAAAGTTTTCTGAAATACTTAGGTATACCCAACGAATTTCTAAC

CTTATGGTTTAATGCGCATAGAAAATCCCGAATCTCAGATTCGAAGAATGGCGTTTTTTTTTA
ACGTCGATTTCCAACGTCGTA CTACTGGAGATGCGCTCACGTA CTGGGAAACACAATAGTGACA
TTAGCTTGTCTGTGTACGTTGATGACTTGATGGACCCAAATGTGAAATTCGTTGTTGCTTC
CGGTGATGATTCATTGATAGGCACTGTGGAGGAATTACCAAGAGATCAAGAGTTTCTTTTCA
CGACTCTTTTAAATCTTGAAGCAAAGTTTCCTCATAACCAGCCTTTCATATGCAGTAAGTTT
TTGATTACTATGCCCACTACAAGTGGAGGCAAAGTTGTCCTGCCGATACCGAATCCATTGAA
ACTCCTCATACGCTTGGGTTTGAAGAAAGTCAATGCCGATATATTCGATGAATGGTATCAAT
CTTGGATTGATATAATTGGTGGTTTTAACGACCACCATGTCATCCGATGCGTTGCCGCGATG
ACAGCACATAGGTATCTCAGAAGACCGAGTTTATACCTAGAAGCTGCTTTGGAATCCCTAGG
TAAGATCTTCGCTGGTAAGACCTTGTGTAAGGAATGCCTCTTTAATGAGAAGCACGAGTCTA
ATGTAAAAATTAAGCCTCGTAGAGTGAAAAAATCCCACTCGGATGCCAGGTCAAGGGCACGC
CGAGCTTGATGTTTTCTTGACATAAGTCAAATTGCCAACCTCCACTGGGTGGGTCAAGGTTG
AGGTATAGAATCCTATTGCTCCTGATAGGAGAAATTCTATATTGCTTATATATGTGCTTAC
GCACATATATAAATGCTCATGCAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC

>RNA3 AMV-Leiden:

GTATTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACAGTGTAATTC
GTA CTTTTCGTAAGTATGTTTCTGTAAAAGCGTTTCTTGTTTTAATTTGGCCTAACACGTAA
TTCGTA CTCTTCGTGAGTAAGTTGTGTTAGCCATACCTATCCTTTAAATTTCTGTCAATTTG
GCCTAACACGTAATTCGTA CTCTTCGTGAGTAAGTTGTGTTAGCCATACCTATCCTTTAAAT
TTCTGTCAATTTAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAACAAAAGGAAAAAATCATTCCCAT
TCGCGTAATTCGTA CTCTTCGTGAGTAAGTTGCAAATGGAGAATACAAAACAAATGCCTCG
AGTTCTGGAATGTCTTCTCCTCTAGCTTTTTCAGTGTCTTATGCTGAGGAAATGTTACTAGC
TGATGAAGTTTCAAACAAACTCAATGTCTATTCTGGGTCCTAATCAGCTAAAGCTCTGCA
CTCAATTGGTGTGTCTAATGGAGCAGCGCCAGTAGTTTTAAGCCTTGTGTCAAAGGAAAAG
AAGTCGATTTTGAATCGTATGCTTCTAAGATTGGACAGAGGATGTACGTCCATCACTCGGC
TATTTACCTCCTTTATATGCCAACATACTGAAAAGTTCTTCAGGGAGCATCACCTTGAAAC
TTTTCAATGAAGCTACAGGAGAGTTAGTGGATGTTGACACCGACCATGATGCTACCCAGGCA
TGTATATTTGCTGGACGTTACCCCGGAGTATTCTGGCGAAAGATGCAGCGAAAGGACACGA
CTTAAAATTAGTCGTCCACGCTGTTGCTTCGACCAATATGAACTCTGCTGTGCGGTGTTCTAT

ACCCATCTGGGAAGATGAGTTAAGCAGAAAGCAGATCCTCGAAAGGGGTGCCGATTCCTA
AAGTTTCCAATTGCTAAGACCGAACCAGTCCGCGATCTCTTAAATGCTGGGAAATTGACGGA
TTTTGTTCTTAATAGGACAAGATTAGGTGTGGGGTCAAAGAGTGATCCCAGTCCGGTTCTTT
TAGAACCAAGAGCTAAGATTGCCGGGAAGGCAAAGACACTTTTTATTCCCGAAGGTCTAGT
GTTCTAGTACCACTATAAATGGTATGGCACCAACGGTGCATATAGATGCCGGTTCTCCAAA
GGGTCTTGGAGTCCCGAAAGGGTTTACATATGAAAGTTTTATTAAAGATGAAATATTACCTG
ATCATTGATCGGTAATGGGCCGTTTTTATTTTTAATTTTCTTTCAAATACTTCCATCATGAG
TTCTTACAAAAGAAAGCTGGTGGGAAAGCTGGTAAACCTACTAAACGTTCTCAGAACTATG
CTGCTTTACGCAAAGCTCAACTGCCGAAGCCTCCGGCGTTGAAAGTCCCGTTGAAAACCG
ACGAATACTATACTGCCACAGACGGGCTGCGTGTGGCAAAGCCTCGGGACCCCTCTGAGTCT
GAGCTCTTTAATGGGCTCGGCGCGAGATTCCTCTACAGTTTTCTGAAGGATTCGTGGGAC
CTCGGATCCTCGAAGAGGATCTGATTTACAGGATGGTGTTCATAACACCGTCCCATGCC
GGCACCTTTTGTCTCACTGATGACGTGACGACTGAGGATGGTAGGGCCGTCGCGCATGGTAA
TCCCATGCAAGAATTCCTCATGGCGCGTTTACGCCAATGAGAAGTTCGGGTTTGAGTTGG
TCTTACAGCTCCTACCCATGCGGGAATGCAAATCAAATTTCAAGCATTCTATGCCGTA
GCCCTCTGTCTGGACTTCGATGCGCAGCCTGAGGGATCTAAAAATCCCTCATTCCGATTCAA
CGAAGTTTGGGTCGAGAGAAAGGCGTTCCCGCGAGCAGGGCCCCTCCGCAGTTTGATTACTG
TGGGGCTGTTCGACGAAGCTGACGATCTTGATCGTCATTGATTTACCCATTAATTTGGGAT
GCTAAAGTCATTTAATGCTGACCTCCACTGGGTGGATTAAGGTCAAGGTATGAAGTCCTATT
CGCTCCTGATAGGATCGACTTCATATTGCTTATATATGTGCTAACGCACATATATAAATGCT
CATGCAAACTGCATGAATGCCCTAAGGGATGC