



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFICIENCIA DEL RNAi, USANDO dsRNA HETERÓLOGAS
DE *Tomato Chino La Paz virus* PARA LA RESISTENCIA A
Pepper golden mosaic virus Y ANÁLISIS DE LA
COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL
TRANSCRIPTOMA DE *Nicotiana benthamiana*

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

DIANA MEDINA HERNÁNDEZ

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2014

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 16 horas del día 12 del mes de febrero de 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Eficiencia del RNAi usando dsRNA heterólogas de *Tomato Chino la Paz Virus* para la resistencia a *Pepper Golden mosaic virus* y análisis de la comparación en la expresión diferencial del transcriptoma de *Nicotiana benthamiana*"

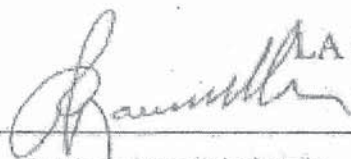
Presentada por el alumno:

DIANA MEDINA HERNÁNDEZ

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON

ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



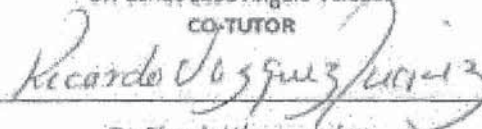
Dr. Ramón Jaime Hólguín Peña
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
CO-TUTOR



Dr. Carlos Elud Angulo Valadez
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vázquez Juárez
CO-TUTOR



Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISORES DE TESIS

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña Director de Tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Ricardo Vázquez Juárez Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante Co-Tutor	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Ricardo Vázquez Juárez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato

SUPLENTES

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Irasema Elizabeth Luis Villaseñor	Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

RESUMEN

Tomato chino La Paz virus (ToChLPV) y el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV, *Pepper golden mosaic virus*) son begomovirus que se han adaptado a un amplio rango de hospederos y se han encontrado coinfectando, con otros begomovirus, al mismo hospedero, causando enfermedades en los principales cultivos de interés agronómico. El mecanismo de silenciamiento génico o RNA de interferencia (RNAi) se ha utilizado con éxito en el control de enfermedades ocasionadas por begomovirus; las estrategias de ingeniería genética para resistencia a este tipo de virus han contemplado el uso de construcciones con secuencias homólogas al virus retado. Sin embargo, la presencia de infecciones mixtas hace necesario desarrollar y demostrar la eficiencia de construcciones que activen el RNAi, no solo con secuencias homólogas, sino también con secuencias heterólogas.

En el presente estudio se analizó la eficacia de la resistencia inducida a PepGMV en plantas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración de dos construcciones: la primera expresa una dsRNA de la secuencia AV1-IR-AC1 de PepGMV, denominada homóloga (CIRP); la segunda expresa la secuencia AV1-IR-AC1, derivada de ToChLPV y nombrada heteróloga (CIRT).

Las plantas protegidas con CIRT presentaron un 45% de eficacia para disminuir la severidad de los síntomas, mientras que las plantas protegidas con CIRP, un 80%. Por otra parte, las plantas protegidas con CIRT mostraron una reducción en la incidencia de 42.86%, mientras que la eficacia en la incidencia en las plantas protegidas con CIRP fue de 57.2%. En cuanto a la eficacia para la carga viral, ésta fue del 95.6% en las plantas protegidas con CIRT y 99.56% en las plantas protegidas con CIRP. En lo referente a la comparación del transcriptoma por efecto del uso de ambas construcciones, se encontraron sobre regulados componentes clave de la vía de RNAi, pero también se observó que cada construcción utilizó rutas diferentes para la activación del sistema de protección RNAi.

Lo anterior demuestra que la eficacia de las construcciones se debió a la activación del mecanismo de silenciamiento génico, y se refleja en la disminución de copias del genoma viral, así como en la recuperación del fenotipo. Con este trabajo se presenta evidencia de que ambas construcciones son funcionales y que se puede inducir eficazmente la resistencia transitoria contra PepGMV u otros begomovirus similares. Estos resultados brindan una posibilidad hacia la búsqueda de estrategias para el control de enfermedades mixtas begomovirales en el campo.

Palabras clave: RNAi, CIRT, CIRP, PepGMV, ToChLPV, Transcriptoma.

ABSTRACT

Tomato chilo La Paz virus (ToChLPV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) are Begomoviruses that have adapted to a wide range of hosts and have been found co-infecting, with others begomoviruses, the same host causing diseases in major crops of agronomic interest. The gene silencing mechanism or RNA interference (RNAi) has been used successfully to control diseases caused by these begomoviruses. Strategies of genetic engineering to induce resistance to begomoviruses have used constructions with sequences homologous to the challenged virus. However, the presence of mixed infections, need the development of type RNAi construct to activate the efficiency not only with homologous sequences but also with heterologous sequences. This study analyzed the efficacy of induced resistance to PepGMV in *Nicotiana benthamiana* plants by agroinfiltration of two constructs: a homologous construct (CIRP) that expresses the dsRNA type hairpin of the sequence AC1-IR-AV1 of PepGMV and a heterologous construct (CIRT) with the sequence AC1-IR-AV1 derived of ToChLPV. Plants protected with CIRT showed an efficacy of 45% at decreasing the severity of symptoms, whereas plants protected with CIRP showed an efficacy of 80%. Plants protected with CIRT showed a reduction of 42.86% in the incidence, while the incidence in plants protected with CIRP was 57.2%. The efficacy for reducing viral load was 95.6 % in plants protected with CIRT and 99.56 % in plants protected with CIRP. Comparing the transcriptome after using both constructs we observed the overexpression of key components of the RNAi pathway and also noted that each construct used a different route to activate the RNAi protection system. This shows that the effectiveness of the constructs was due to the activation of the gene silencing mechanism, and this effectiveness is reflected in a decreased number of copies of the viral genome and the recovery of the phenotype. This work proves that both constructs are functional and can efficiently induce transient resistance to PepGMV or similar begomoviruses and as such, these results can be used for further research on strategies to control mixed begomoviral diseases in the field.

Key words: RNAi, CIRT, CIRP, PepGMV, ToChLPV, Transcriptome

DEDICATORIA

A mis **ÁNGELES** celestiales y terrenales

La primera vez que alguien me dijo que tenía tres ángeles no lo creí; la segunda vez que me comentaron lo mismo lo pensé, y la tercera nadie me lo dijo pues, ahora, lo compruebo día a día: gracias **DIOS** por prestármelos y ponerlos en mí camino.

Este documento está forjado por el amor, amistad y paciencia de muchas personas:

Mis padres y mi hermano, que sin su apoyo no estaría haciendo lo que me gusta; gracias por enseñarnos, como el Ave Fénix, a resurgir de sus cenizas. Los quiero mucho, aunque a veces sea más agria que un limón.

Mis niños lindos, Isaac, Perla y Javier, que si no fueran un amor y unas ternuritas tampoco habría logrado finiquitar esta tesis. Espero ser un ejemplo para que ahora ellos logren la Torre Ifel. Gracias por estar en mi vida y ser mí motor.

Mi martirio, mi maridín, quien ha aguantado una licenciatura, una maestría y un doctorado; pero sobre todo, quien en aquellos momentos en que el corazón llora sangre, siempre me dice: “Si no fuera porque te quiero”. Gracias por tu amor y paciencia.

Roberto Carlos, que me susurro en un sueño: “Ponte debajo de las escaleras”. Seguí su consejo con miedo y lágrimas en el corazón, hice mis estancias donde obtuve experiencia, resultados y conocí a gente experta en el tema.

Mil gracias, Paco, por todo tu apoyo en los momentos más difíciles de esta investigación, fuiste como un salvavidas en el inmenso mar.

Mi amiga Irasema (Ñoñis), que siempre ha estado ahí, escuchándome hablar sobre problemas académicos y emocionales. Vivan nuestras inolvidables vacaciones de cada año.

Mis amigos: Eugenia que siempre llena mi vida de dulzura (cafecito, galletitas, chocolatitos); a Julio, Cristi, EST's (Esteban), Anita's Claudia y Ruth, Gore, Angi, Adriana.

Mis hijos adoptados David, Mayela, Ramsés y Mirella, que realmente aprendes a formarte con ellos (PACIENCIA).

Dr. Holguín-Peña (HOLPE), gracias por creer en mí, por la confianza depositada, por dirigirme en este arduo camino del desconocimiento y por motivarme a valerme por mí misma, eso es la mejor de las enseñanzas; gracias. ¡Sí se puede!

Finalmente, a todos aquellos que en algún día de estos ocho años me regalaron una sonrisa o me hicieron reír (taxi, sigue ese avión; voy y regrecho; violentómetro, nitrógeno frío, abstracta). Siempre estarán en mi corazón.

“Lo peor es hacer lo correcto con la persona equivocada y hacer lo equivocado con la persona correcta”.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) por permitirme realizar mi maestría y doctorado en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (204179) otorgada.

Un agradecimiento muy especial para el Dr. Francisco Tenllado Peralo, que no formó parte de mi Comité, pero su apoyo fue siempre como si formara parte de él.

Al Comité revisor por sus atinados comentarios, sugerencias y observaciones emitidas en la redacción de esta tesis.

A los técnicos de cada uno de los laboratorios que me abrieron la puerta con tanta amabilidad: Delia Rojas Posadas, Margarito Rodríguez Álvarez, Mario Arce Montoya, Martha Reyes Becerril, Julio Antonio Hernández González, Arturo Sierra Beltrán, Martín Aguilar García, Griselda Gallegos Simental, Neftalí Gutiérrez Rivera, Susana Ávila Álvarez, Ángel Carrillo García, María de Jesús Romero Geraldo y Martín Ramírez Orozco.

Al personal de posgrado: Dra Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Tania Nuñez Valdez, Sánchez Vázquez Ma. Guadalupe, Claudia Olachea León y Horacio Sandoval Gómez.

Al Personal de la biblioteca Ana María Talamantes Cota y Susana Luna García.

A Héctor Acosta Salmón por su valiosa ayuda en la traducción de mis documentos.

A Brenda Y. Martínez Avilés y Martha H. Bedolla Torres asistentes del programa de agricultura en zonas áridas.

A los Doctores Felipe Ascencio Valle y Gracia Gómez Anduro, por aceptarme como agroinfiltrada en sus instalaciones y en su grupo de Patobanda, donde aprendí mucho.

A la Dra. Fabiola Arcos, porque aun sin ser parte de esta tesis, contribuyó ampliamente en mi formación y porque sus comentarios siempre fueron acertados.

Dra. Arevik Poghosyan Melkoyan, por sus amables comentarios a lo largo de mi trabajo.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características e importancia de la familia <i>Geminiviridae</i>	1
1.2. Características del género <i>Begomovirus</i>	3
1.2.1. Genes localizados en el genoma A	4
1.2.2. Genes localizados en el genoma B	7
1.2.3. Alfasatélites y Betasatélites	7
1.3. Ciclo replicativo	8
1.4. Importancia de los geminivirus en la biotecnología	10
1.5. Sintomatología y detección de begomovirus	10
1.6. Los begomovirus <i>Tomato chino La Paz virus</i> (ToChLPV) y <i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV) como modelo de estudio.	12
1.6.1. <i>Tomato chino La Paz Virus</i> (ToChLPV)	12
1.6.2. <i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV)	12
1.7. RNA de interferencia (RNAi)	13
1.8. El silenciamiento génico como herramienta biotecnológica	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. El silenciamiento génico como herramienta biotecnológica en el control de infecciones mixtas begomovirales	14
2.2. PCR tiempo real en la terapia antiviral	19
2.3. Transcriptoma de los geminivirus y su relación con el mecanismo de silenciamiento génico	20
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22

6.1. Primer objetivo: diseño de construcciones que desencadenan el sistema de RNAi de la región AC1-IR-AV1 de los virus ToChLPV y PepGMV	22
6.1.2. Inserción de las construcciones en la planta	23
6.2. Segundo objetivo: evaluación de la eficacia de las construcciones.	24
6.2.1. Diseño del bioensayo de expresión transitoria con las construcciones CIRT y CIRP, en planta <i>de N. benthamiana</i> como defensa ante la infección viral	24
6.2.2. Integración de las construcciones e inoculación del virus en las pruebas de reto	25
6.2.3. Evaluación de la severidad, incidencia y carga viral	25
6.2.3.1 Severidad	25
6.2.3.2. Incidencia	25
6.2.3.3. Determinación de la carga viral	26
6.2.3.4. Determinación de la eficacia de las construcciones CIRT y CIRP	27
6.3. Tercer objetivo: análisis de la expresión diferencial generada al activar el sistema RNAi con secuencias homólogas y heterólogas	27
7. RESULTADOS	28
7.1. Primer objetivo: diseño de construcciones que desencadenan el sistema de RNAi, de la región AC1-IR-AV1 de los virus ToChLPV y PepGMV	28
7.1.2. Inserción de la secuencia de interés en el vector de entrada pDONOR 201	30
7.1.3. Inserción del vector de entrada en el vector de expresión pHGWIWG2(II),0	31

7.1.4. Inserción del vector expresión pHGWIWG2(II),0 con la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV, en <i>A. tumefaciens</i>	31
7.1.5. Inserción de las construcciones en la planta	33
7.2. Segundo objetivo: evaluación de la eficacia de las construcciones	33
7.2.1. Bioensayo para evaluación de la funcionalidad de las construcciones	33
7.2.2. Evaluación de la severidad, incidencia y carga viral	35
7.2.2.1. Severidad	35
7.2.2.2. Incidencia	36
7.2.2.3. Carga viral	36
7.2.2.4. Eficacia	40
7.3 Tercer objetivo: análisis de la expresión diferencial generada al activar el sistema RNAi con secuencias homólogas y heterólogas	41
7.3.1. Obtención de RNA total y elaboración de los microarreglos	41
7.3.2 Caracterización funcional de la expresión diferencial de los Genes	43
7.3.3 Análisis de homologías y anotación funcional en la ontología génica	44
7.3.4. Análisis de sobre regulación de los componentes del RNAi por efecto de CIRP y CIRT	48
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	56
11. LITERATURA CITADA	57
12. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Páginas
Figura 1. Taxonomía y características de la familia <i>Geminiviridae</i>	2
Figura 2. Representación de la organización del genoma de begomovirus	5
Figura 3. El ciclo replicativo de begomovirus	9
Figura 4. Tres enfoques de la aplicación de RNAi en plantas para generar resistencia a las enfermedades	15
Figura 5. Comparación entre la sensibilidad de Dot-Blot y PCR en tiempo real	20
Figura 6. Representación del genoma A de ToChLPV	29
Figura 7. Tamaño de la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV	30
Figura 8. Confirmación de la secuencia AC1-IR-AV1 en el vector de entrada pDONOR	30
Figura 9. Patrón de digestión con la enzima <i>Xba</i> I para el vector PH7GWIWG2(II),0	31
Figura 10. Esquema de las dos construcciones CIRP y CIRT	32
Figura 11. Representación del protocolo de agroinfiltración	33
Figura 12. Ejemplo de agroinfiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
Figura 13. Comparación de los síntomas de las plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con PepGMV, en los diferentes grupos del bioensayo	34
Figura 14. Gráficas de la temperatura de fusión	38
Figura 15. Tiempo real curva estándar y curvas problema	38
Figura 16. Electroforesis de RNA del bioensayo	41
Figura 17. Perfil de expresión de los dos arreglos realizados	41
Figura 18. Datos del arreglo CIRT Y CIRP después del análisis Z-score	42
Figura 19. Diagrama de Venn	43

Figura 20. Ontología de genes para procesos biológicos expresados en CIRT y CIRP	45
Figura 21. Procesos biológicos para CIRP	46
Figura 22. Procesos biológicos para CIRT	47
Figura 23. Alineamiento de la región AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV	52
Figura 24. Ruta del RNAi usada en la metilación del DNA	53
Figura 25. Modelo especulativo de RDR asociado a siRNAs secundarios	54

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Páginas
Tabla 1. Taxonomía de la familia <i>Geminiviridae</i> basada en el tipo de hospedante, vector y estructura genómica	2
Tabla 2. Comparación de número de virus de plantas entre 1991 y 2005. En paréntesis se muestra el número de especies de virus asignados a cada familia de virus	3
Tabla 3. Descripción del bioensayo	24
Tabla 4. Escala de severidad de síntomas	26
Tabla 5. Clasificación de incidencia	26
Tabla 6. Datos crudos obtenidos por efecto de CIRT y CIRP, ante la infección causada por PepGMV en plantas de <i>N. benthamiana</i>	35
Tabla 7. Concentración de DNA viral con respecto al ciclo de amplificación de la curva estándar y de los cuatro grupos del bioensayo	39
Tabla 8. Resumen y comparación de la eficiencia de las dos construcciones CIRT y CIRP para reducir la severidad de síntomas, la incidencia de transcritos y la acumulación de DNA viral en la infección de PepGMV	40
Tabla 9. Lista de genes sobre regulados (Z-score 1.5) involucrados en la ruta RNAi del transcriptoma de <i>N. benthamiana</i> por efecto de CIRT y CIRP, en respuesta a la infección de PepGMV	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características e importancia de la familia *Geminiviridae*

Es de llamar la atención que la mayoría de los virus que infectan a las plantas tienen genoma de RNA, mientras que la presencia de virus con genoma de DNA es menor. En contraste, las procariontes, invertebrados y vertebrados son infectados por una gran variedad de virus de DNA. Lo anterior, sugiere que las plantas han impuesto restricciones estrictas para la evolución de los virus de DNA.

En la actualidad, están descritas tres familias de virus de DNA que infectan plantas: la familia *Caulimoviridae*, que tiene su genoma de DNA en doble cadena (dsDNA, por sus siglas en inglés: double-stranded DNA) y su replicación la realiza por transcripción inversa; así como las familias *Nanoviridae* y *Geminiviridae*, que se caracterizan por tener su genoma constituido de DNA circular, de cadena sencilla (ssDNA, por sus siglas en inglés: single-stranded DNA), empaquetado dentro de una sola partícula, que al microscopio luce como un poliedro unido por una de sus caras (Padidam *et al.*, 1995).

La familia *Geminiviridae* se encuentra dividida en cuatro géneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* y *Topocovirus* (Fauquet y Stanley, 2005; Fauquet *et al.*, 2008). De éstos, el género *Begomovirus* se ha convertido en el grupo más destructivo de los virus de plantas en zonas tropicales y regiones subtropicales del mundo.

Los geminivirus representan una familia de virus de DNA que ha eludido aquellos impedimentos que buscan evitar su evolución, emergiendo como patógenos virales que causan graves pérdidas económicas a la producción agrícola en todo el mundo. El éxito de su dispersión y la aparición de nuevos geminivirus se debe a la interacción que tienen con sus insectos vectores (Tabla 1), lo cual facilita su movilidad y dispersión; aunque actualmente este factor se ha visto alterado por diversos agentes antropogénicos, como son los monocultivos y los sistemas agrícolas basados en pesticidas (Rojas *et al.*, 2005).

En la Tabla 2 se puede observar que los geminivirus se han incrementado hasta 4 veces más que otras especies de virus (Rodoni, 2009). El éxito de su aparición e incidencia está relacionada con sus habilidades de mutación, recombinación y pseudorecombinación;

lo cual se facilita por la presencia de co-infecciones o infecciones mixtas (Seal *et al.*, 2006).

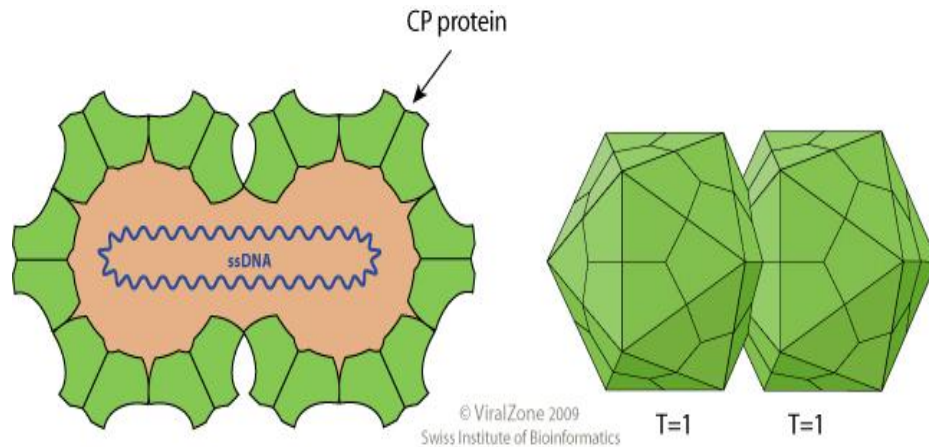


Figura 1. Taxonomía y características de la familia *Geminiviridae*.

Pertencen al grupo II, virus ssDNA. A esta familia pertenecen cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* y *Topocuvirus*. Son partículas geminadas, con simetría icosaédrica T=1. La cápside contiene 22 capsómeros pentaméricos hechos de 110 proteínas de la cápside (CP). Cada partícula geminada contiene únicamente un ssDNA circular.

Tabla 1. Taxonomía de la familia *Geminiviridae* basada en el tipo de hospedante, vector y estructura genómica.

	Tipo de hospedante	de Vector/familia	Tipo de genoma
<i>Mastrevirus</i>	Monocotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Monopartita
<i>Curtovirus</i>	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i> , <i>Membracidae</i>)	Monopartita
<i>Begomovirus</i>	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	Bipartita y monopartita
<i>Topocuvirus</i>	Dicotiledóneas	Escamas (<i>Membracidae</i>)	Monopartita

Tabla 2. Comparación de número de virus de plantas entre 1991 y 2005. En paréntesis se muestra el número de especies de virus asignados a cada familia de virus.

	1991 (5 th reporte ICTV) ^a	2005 (8 th reporte ICTV) ^b
<i>Geminiviridae</i>	35(18)	132(61)
<i>Potyviridae</i>	73(73)	133(88)
<i>Criniviruses</i>	0(1)	8(2)
Todos los virus de plantas	<380 especies	>900 especies (2006)

^a Número de virus registrado por Francki *et al.* (1991)

^b Número de virus registrados por Fauquet *et al.* (2005)

1.2. Características del género *Begomovirus*

Su nombre proviene de *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que fue la primera especie de virus identificada en este género, en 1981 (Haber, 1981). Se transmite por su insecto vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (*Hemiptera: Aleyrodidae*), la cual posee un amplio rango de hospederos, abarcando aproximadamente 74 familias vegetales y 500 especies mediante un proceso circulatorio, persistente pero no propagativo (Morales y Anderson, 2001).

La mayoría de los begomovirus tiene genomas bipartitos (componentes DNA A y DNA B). Los que presentan genomas monopartitos son originarios del Viejo Mundo; toda su maquinaria de replicación y movimiento están presentes en el genoma A, mientras que en los bipartitas, en el componente A se encuentran los genes requeridos para la encapsulación de la progenie o viriones y los genes asociados a la replicación. En el componente B se encuentran los únicos dos genes requeridos para el movimiento, el tamaño de su genoma es de 2.5 a 3 kb y presentan genes tanto en las bandas virales (V) como en las bandas complementarias (C), producto de la duplicación (Figura 2) (Lazarowitz, 1992).

Los parámetros que se emplean para nombrar los genes de los geminivirus son: en qué componente se encuentran (A o B), su dirección y localización, dónde (V) es asignada para el DNA encapsidado en el virión y (C) si la banda es complementaria al

DNA, la posición del gen con respecto al extremo 5' de la región intergénica, que puede ser a la derecha (R) o izquierda (L).

En el genoma de los geminivirus, los ORFs están organizados bidireccionalmente a ambos lados de la región intergénica (IR, del inglés intergenic region) (Figura 2), que contiene entre 280 y 350 nt, y en la cual se encuentran dos promotores divergentes y las señales en *cis* necesarias para la replicación del virus. En la IR se encuentra una secuencia de 30 nt en los virus bipartitas, y de 46 nt en los monopartitas, denominada “región común” (RC), rica en GC, que forman el tallo de una horquilla (Figura 2). Esta estructura y la presencia de un nonanucleotido (5'-TAATATTAC-3' en la mayoría de los casos) en el asa de dicha horquilla son conservadas en todos los geminivirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

A su vez, en la IR se encuentran elementos reguladores tanto para la transcripción como para la replicación (Eagle *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994a). En esta región se encuentran los promotores y las secuencias de reconocimiento y de unión de varias proteínas reguladoras. También se han identificado elementos típicos de promotores como son las cajas TATA y elementos activadores o represores de la transcripción de los genes virales (Eagle y Hanley-Bowdoin, 1997).

1.2.1. Genes localizados en el genoma A

El gen *AC1* o *CI* codifica para la proteína asociada a la replicación (Rep), la cual está localizada en el núcleo de las células vegetales infectadas (Nagar *et al.*, 1995), donde se realiza la replicación del genoma viral, a través de un mecanismo de círculo rodante (Stenger *et al.*, 1991). Este mecanismo reconoce específicamente el origen de replicación del virus al cual pertenece e inicia la síntesis de la cadena. La proteína responsable de este proceso es una endonucleasa/ligasa sitio-específica que hidroliza y liga la cadena viral dentro de la secuencia TAATATT/AC, ubicada en la horquilla complementaria. Además, posee afinidad por el DNAdc y la unión se realiza a una secuencia específica dentro de la región intergénica (IR) (Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996; Fontes *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b; Lazarowitz *et al.*, 1992).

Por su parte, el gen *C3*, *AC3* o *AL3* codifica para la proteína REn (siglas del inglés

“Replication Enhancement”). Dicha proteína es el segundo factor viral involucrado en la replicación de los begomovirus y curtovirus.

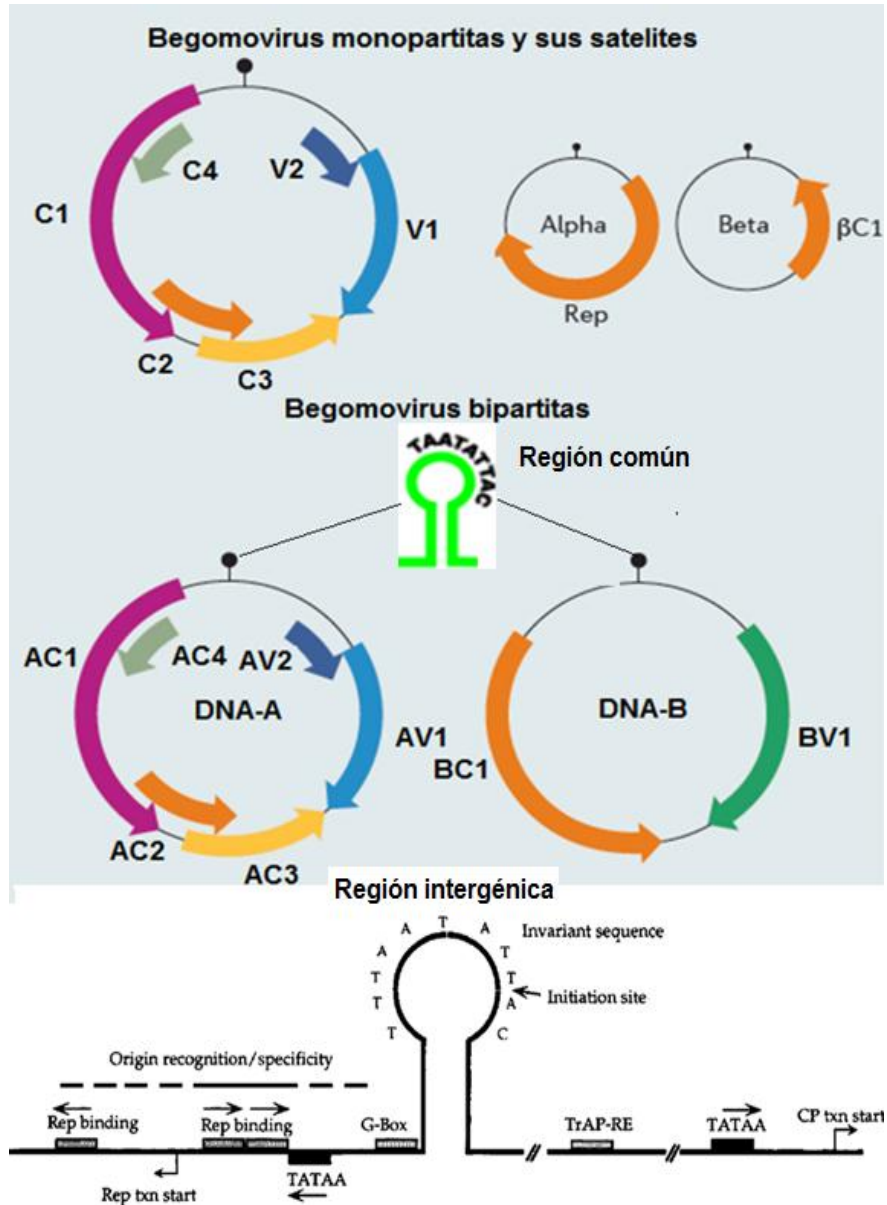


Figura 2. Representación de la organización del genoma de *Begomovirus*. Se indican los genomas A, B y sus satélites. Las flechas representan la localización y dirección de la transcripción de los genes, la nomenclatura que se utiliza para denominarlos, la región común para el genoma A y B de monopartitas, y la región intergénica del genoma A para monopartitas y bipartitas.

Al igual que la proteína Rep, la proteína REn se localiza en el núcleo de las células vegetales infectadas. Esta última actúa como potenciador de la replicación durante la acumulación de DNA viral y es probable que esta función se realice a través de la interacción con la proteína Rep, ya sea porque la proteína REn incrementa la afinidad de la proteína Rep, por el origen de replicación; o porque un factor dirige a la proteína Rep hacia su sitio de corte en la horquilla, una vez que ésta ha reconocido su secuencia diana. El complejo REn/Rep puede también potenciar la actividad corte-ligación y la posible actividad helicasa de la proteína Rep (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Settlage *et al.*, 2005). Se ha demostrado que en la ausencia de este gen, las plantas infectadas no muestran síntomas o estos son más atenuados (Elmer *et al.*, 1988)

El gen *AC2*, *AL2* o *C2* codifica la proteína asociada a la transcripción de su genoma TrAP (siglas del inglés “Transactivator protein”), el cual es una proteína nuclear y es necesaria para una transcripción eficiente de los genes virales tardíos (*AVI/VI* y *BVI*). Cabe señalar que esta proteína es altamente conservada entre las especies del género y puede regular la actividad de los genes tardíos de dos formas diferentes: por activación en células del mesófilo o por la no represión en células del floema (Sunter y Bisaro, 1997). La proteína TrAP interactúa débilmente con DNAdc y relativamente fuerte con DNAsc; en ambos casos lo hace por secuencia inespecífica (Sung y Coutts, 1996). Las proteínas TrAP y C2 están involucradas en la supresión del silenciamiento génico posttranscripcional (PTGS, del inglés “Posttranscriptional Gene Silencing”) (Voinnet *et al.*, 1999).

El producto del gen *AVI* o *VI* codifica para la proteína de la cubierta del virión CP (siglas del inglés “Coat protein”), misma que determina la especificidad del insecto vector y confiere propiedades para cada género. Si la transmisión es mediada por los insectos vectores, la presencia de la proteína CP es indispensable; pero si la inoculación se hace por biobalística, mecánicamente o mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, no se requiere su presencia. La proteína CP tampoco se requiere cuando la infección ocurre sobre hospedantes bien adaptados o permisivos, mientras que en los hospedantes subóptimos sí se requiere del gen *AVI* funcional para la infección sistémica (Höfer *et al.*, 1997a; Guevara-González *et al.*, 1999).

En cuanto a los genes AC4 y C4, para ambos tipos de begomovirus, se ha visto que modulan la intensidad de los síntomas producidos de forma específica a cada hospedante (Krake *et al.*, 1998). En los begomovirus monopartitos, el gen C4 participa en el movimiento y activa la maquinaria replicativa del hospedante. El producto génico C4 no guarda relación con la proteína AC4 de los begomovirus bipartitos. En los begomovirus monopartitos, las proteínas V1 y C4 tienen funciones que en algún grado asemejan el papel de las proteínas MP de los bipartitos (Rojas *et al.*, 2001). Recientemente se conoce que C4 (o AC4 en algunos virus) contrarresta PTGS.

Por otro lado, los genes AC2 y C2 funcionan como un transactivador de la transcripción viral y un supresor de silenciamiento de RNA (Vanitharani *et al.*, 2004; Kon *et al.*, 2007).

Finalmente, el gen AV2 o V2 codifica para la proteína R2, la cual facilita el ensamblaje del virión, en cuyo caso es la encapsidación el principal mecanismo para generar ssDNA durante la replicación (Hormuzdi y Bisaro, 1993).

1.2.2. Genes localizados en el genoma B

El gen BVI, BLI codifica la proteína NSP (del inglés “Nuclear Shuttle Protein”), misma que se acumula en el núcleo de las células infectadas y mueve el DNA viral a través de los poros nucleares.

El gen BCI, BRI, que codifica para la proteína MP (del inglés “Movement Protein”), cumple su función en el movimiento célula a célula del genoma viral. La proteína MP se localiza en la membrana plasmática y en la pared celular de las células infectadas (Hehnle *et al.*, 2004).

1.2.3. Alfasatélites y Betasatélites

Los Alfasatélites DNA- α son moléculas autorreplicantes asociadas a los begomovirus monopartitas. No existe una función específica atribuida a alfasatélites. Éstos tienen una organización del genoma altamente conservada que abarca una proteína de replicación, una región rica en adenina de cerca de 200 nts y un origen de replicación (ori) (incluyendo la región conservada TAGTATT/CA), similar a la de nanovirus.

Por su parte, los betasatélites DNA- β son moléculas determinantes de patogenicidad asociadas con varias enfermedades de plantas causadas exclusivamente por begomovirus monopartita. Los betasatélites son completamente dependientes del componente A para su replicación, encapsidación y la transmisión por el vector (mosca blanca) (Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009).

1.3. Ciclo replicativo

El ciclo de infección inicia con la llegada del virus a la planta (Figura 3). La transmisión del virus por mosca blanca ocurre en forma circulativa; las partículas virales pasan a través del estilete, hacia la garganta, y luego a la hemolinfa y glándulas salivales del insecto (Harrison, 1985). Una vez en la planta, el virus ingresa por el floema, los viriones interactúan con la pared celular y llegan al citoplasma, donde ingresa al núcleo de la célula, iniciándose el proceso de replicación viral.

La replicación consiste en dos fases. La primera inicia con la desencapsidación del virión de DNA, dejando un DNA de cadena sencilla (ssDNA) como templado para la producción de la doble cadena de DNA (dsDNA), la cual es generada porque, posiblemente, se unen en la región común, jugando un rol clave la estructura tipo horquilla (hairpin-loop); finalmente, una DNA polimerasa del hospedero sintetiza la dsDNA (Saunders *et al.*, 1992). En la segunda etapa, el DNA de doble cadena se asocia con las histonas y otras proteínas celulares para ensamblarse con los nucleosomas y formar estructuras llamadas algunas veces minicromosomas; el dsDNA es transcrito por la RNA polimerasa II del huésped, lo que permite la producción de la proteína iniciadora de la replicación (Rep).

Más tarde, durante el progreso de la infección, Rep reprime su propia transcripción, lo que lleva a la activación de la proteína activadora de la transcripción (TRAP), que a su vez activa la proteína de cubierta (CP) y la proteína de enlace nuclear (NSP). ssDNA en viriones puede entonces ser encapsidado por CP, quedando disponibles para la adquisición de la mosca blanca. NSP se une al DNA viral y se mueve a través del núcleo hacia el citoplasma, donde la proteína del movimiento (MP) dirige las partículas virales a través de los plasmodesmos. Aún no se sabe si el DNA viral se mueve como

ssDNA, dsDNA o molécula lineal (Figura 3) (Jeske *et al.*, 2001; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Gutiérrez C., 1999; Pooggin, 2013).

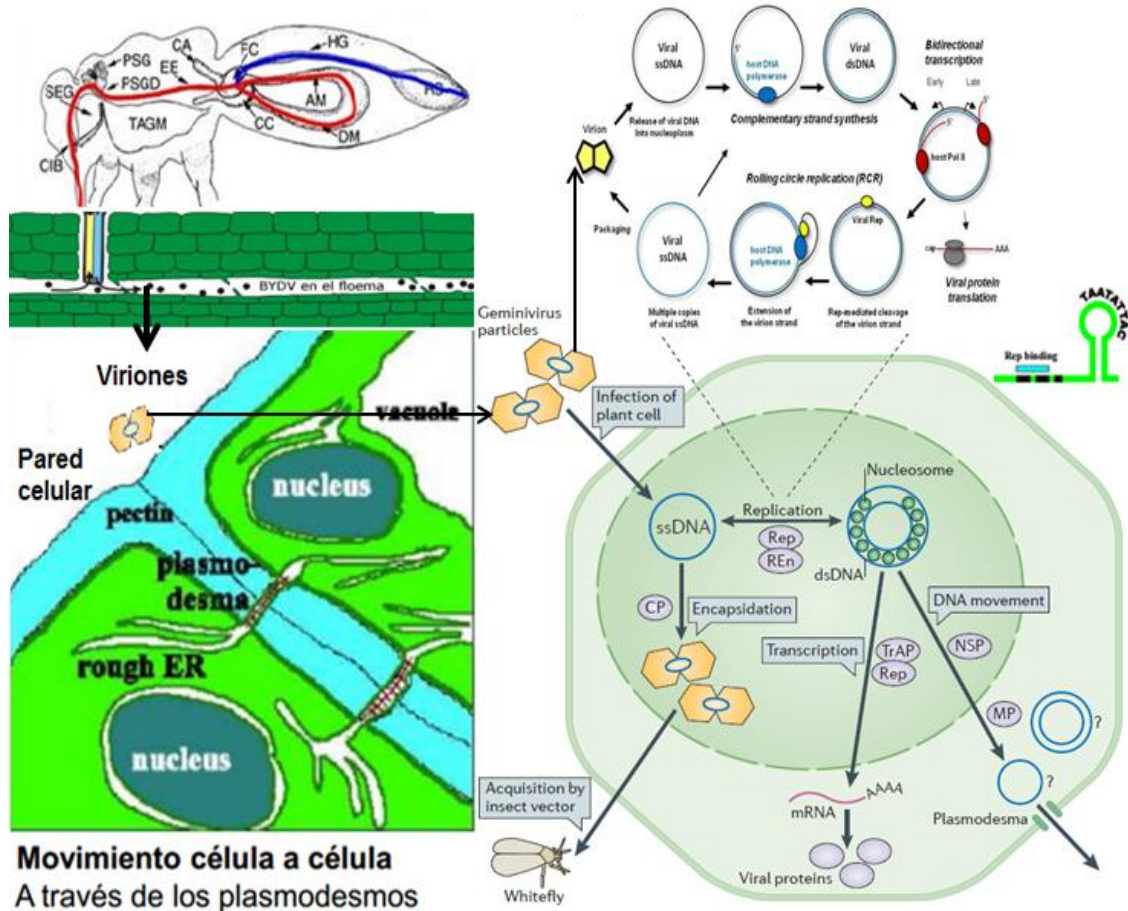


Figura 3. El ciclo replicativo de begomovirus.

El proceso de infección inicia cuando el vector inocular a la planta con el virus, el cual ingresa al citoplasma, donde antes de ingresar al núcleo se despoja de la cápside proteica, iniciándose el proceso de replicación viral, donde la cadena de DNA viral sirve como template para la formación del DNA complementario, pasando de cadena simple (DNAsc) a doble cadena (DNAdc), que servirá como molde para la transcripción de los genes de la cadena complementaria, así como para la replicación en círculo rodante.

1.4. Importancia de los geminivirus en la biotecnología

Los atributos que han permitido ampliar el estudio de estos patógenos son: su pequeño genoma de DNA, la forma en que se replican usando dsDNA (que permite su fácil manipulación en los métodos de clonación), así como el desarrollo de vectores independientes para la inoculación (Kumar y Sarin, 2013).

Estas características han llevado a los geminivirus a ser empleados como una herramienta para el estudio de la replicación del DNA y la regulación de la expresión génica, tanto en plantas monocotiledóneas, como dicotiledóneas. Lo anterior se debe a que los geminivirus generan un alto número de copias extracromosómicas (replicones); además, su potencial para la expresión o el silenciamiento de genes en plantas han generado un considerable interés.

Otra característica biotecnológica es que algunas son transmisibles por inoculación mecánica, mientras que otros solo pueden ser inoculados por *Agrobacterium tumefaciens* o biolísticamente (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

1.5. Sintomatología y detección de begomovirus

Los síntomas son los efectos visibles de la infección viral que ocasionan cambios fenotípicos en la planta. Los virus, por sí mismos, no matan a las plantas. El daño se da porque se altera su fisiología y su metabolismo, lo cual se manifiesta por: disminución de la fotosíntesis, menor producción de hormonas de crecimiento, aumento de la respiración, reducción de la producción de compuestos nitrogenados y carbohidratados, así como por el aumento de sustancias inhibidoras de crecimiento (Agrios, 2005).

Los síntomas producidos por geminivirus son muy variados y se pueden encontrar uno o más de los que a continuación se mencionan: mosaico amarillo, moteado clorótico, clorosis foliar, enrollamiento foliar, deformación de las hojas, reducción de área foliar, enanismos, abscisión floral, amarillamiento foliar y reducción del tamaño de frutos (Polston y Anderson, 1997). Se sabe que los síntomas causados por estos virus pueden variar dependiendo del geminivirus y sus mezclas, la planta infectada, el estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales (luz, temperatura, nutrición, etcétera).

La sintomatología es comúnmente un medio visual (subjetivo) de identificación, que presenta algunas limitantes; sin embargo, es un punto importante en cuanto al estudio epidemiológico de esta enfermedad. Los síntomas expresados en las plantas pueden ser muy variados y son dependientes de la interacción hospedero-vector-virus.

Existen otras formas de detectar, caracterizar y/o estudiar a los virus, incluyendo las técnicas tradicionales de microscopía electrónica, rango de hospedantes y pruebas serológicas. Actualmente son utilizadas de forma rutinaria diversas técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la hibridación molecular y otras técnicas de DNA (RFLP, RAPS, entre otras) (González-Pérez *et al.*, 2011).

Dentro de las técnicas más avanzadas se encuentra la de amplificación por círculo rodante (ACR). Para la PCR se emplean oligonucleótidos específicos o degenerados, los que permiten detectar la presencia de uno o de varios geminivirus, respectivamente (Jeske, 2007). En la detección de los begomovirus es común el empleo del par de oligonucleótidos degenerados pAL1v1978-pAR1c496, que permiten discernir entre los virus que poseen un genoma monopartita y los que poseen uno bipartita (Rojas *et al.*, 1993). Estos oligonucleótidos hibridan en regiones conservadas (en términos relativos) de los genes que codifican para las proteínas Rep y CP en los genomas begomovirales. La separación entre estas regiones, en los begomovirus bipartitas, es diferente a la que se presenta en los monopartitas.

Los fragmentos amplificados a partir de los begomovirus monopartitas son de 1,4 Kb, aproximadamente, mientras que a partir de los bipartitas se amplifica un fragmento de alrededor de 1,1 Kb. Por otra parte, en la detección de geminivirus mediante la hibridación de DNA se emplean algunas sondas que se generan a partir de genomas geminivirales conocidos.

Las técnicas de círculo rodante constituyen una alternativa eficaz y rápida para los estudios de diversidad biológica de geminivirus de diferentes regiones del mundo, además de que permiten la clonación directa de los genomas a partir de pequeñas cantidades de DNA de la planta originalmente infectada. (Haible *et al.*, 2006)

1.6. Los begomovirus *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) como modelo de estudio

1.6.1. *Tomato chino La Paz Virus* (ToChLPV)

ToChLPV fue reportado por primera vez en La Paz, Baja California Sur, infectando plantas de tomate (Holguín-Peña *et al.*, 2006) con sintomatología similar a la reportada por la enfermedad del “enchinado foliar” del tomate, que presenta características peculiares, como hojas algo acucharadas, además de que las plantas presentan un aspecto erecto con ramilletes enchinados.

La identificación y caracterización mediante técnicas moleculares y análisis bioinformáticos muestran que es un virus nativo (GenBank AY339618). Es considerado como nueva especie por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) (Fauquet y Stanley, 2005), aunque el geminivirus de BCS difiere en arreglos y secuencias de los iterones. Se encuentra estrechamente relacionado con algunos virus centroamericanos.

Este begomovirus ha sido reportado en San Luis Potosí, México, en *Solanum rostratum* (Mauricio-Castillo, 2006). Recientemente fue detectado en diversas áreas hortícolas de tomate en Baja California (Holguín-Peña *et al.*, 2010). Otro punto importante es que se ha reportado en co-infecciones con otros begomovirus y en nuevos hospederos, por ejemplo con *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en Sinaloa, México, en plantas de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) (Gámez-Jiménez, 2007). La misma co-infección se encontró en BCS, pero en plantas de chile (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010).

1.6.2. *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV)

El *Pepper golden mosaic virus* es conocido originalmente como *Texas pepper virus* (TPV), debido a que se detectó por primera vez en 1987, en Texas (Fauquet *et al.*, 2008). Actualmente se encuentra ampliamente distribuido en el sureste de Estados Unidos de América (USA), México y Centroamérica (Morales, 2010). PepGMV se ha encontrado en co-infección con *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en diferentes cultivos de chile, tomate, tomatillo y tabaco (Rentería-Canett *et al.*, 2011). Recientemente se reportó en BCS en co-infección con TYLCV en plantas de chile (Lebsky *et al.*, 2011).

1.7. RNA de interferencia (RNAi)

La búsqueda por mejorar una flor de ornamento (Napoli *et al.*, 1990) llevó a uno de los descubrimientos más interesantes y relevantes de la biología molecular en su momento, llamado en un inicio co-supresión, y posteriormente nombrado como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) y transcripcional (TGS), RNA de interferencia (RNAi). Cabe señalar que existen en la base PubMed cerca de 9000 artículos relacionados con el tema (Eamens *et al.*, 2010).

El RNAi tiene como función la regulación de la expresión de ciertos genes y se considera un sistema de defensa que proporciona inmunidad adaptativa heredable contra plásmidos, virus y otros elementos genéticos móviles. Además, se encuentra en casi todos los organismos eucariotas. Recientemente ha sido descubierto en *archaea* y bacterias (Hannon, 2002; Raja *et al.*, 2010; Terns y Terns, 2011). El silenciamiento génico se activa con la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA), que puede originarse durante una infección viral, por la acción de una RNA dependiente RNA polymerase (RdRPs) o por la introducción de un transgen. La dsRNA es reconocida y procesada por un complejo de ribonucleasas tipo III llamadas en plantas “Dicer-like” (DCL), cortando la dsRNA en fragmentos de 21-25 nucleótidos, denominados RNAs pequeños interferentes (siRNAs) y microRNAs (miRNAs).

Estos pequeños RNAs dúplex son transferidos a otro complejo enzimático de silenciamiento inducido por RNA que se encuentra en el citoplasma (RISC), o RITS, el cual se encuentra en el núcleo. Este complejo separa el RNA dúplex y entonces sirve como guía para identificar RNAs complementarios, produciendo la degradación del RNAs diana y/o promoviendo la metilación de DNA que contenga secuencias complementarias (Waterhouse *et al.*, 2001; Herr y Baulcombe, 2004).

1.8 El silenciamiento génico como herramienta biotecnológica

El mecanismo de silenciamiento se ha empleado como una herramienta de investigación para descubrir o validar las funciones de los genes, así como en el ajuste de las vías metabólicas con el fin de lograr beneficios para la sociedad: producción de aceite con

reducción de ácido palmítico (Liu *et al.*, 2002), la codiciada rosa azul (Katsumoto *et al.*, 2007) y producción de anticuerpos en plantas (Cox *et al.*, 2006).

Un problema muy importante para la sociedad, especialmente en el campo agrícola, es la pérdida causada por los patógenos en cultivos, por lo que los biólogos de plantas han buscado la manera de reducir este conflicto. Múltiples han sido las herramientas tecnológicas y biotecnológicas para proteger a los sistemas agrícolas de este problema, entre ellos, la resistencia a base del RNAi, que ha permitido generar cultivos resistentes durante las últimas dos décadas.

Basados en este mecanismo, diversos enfoques han sido desarrollados (Figura 4) para generar plantas resistentes a virus de RNA y DNA, viroides, insectos y patógenos fúngicos. Algunos ejemplos son las plantas transgénicas de papaya con resistencia al virus *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Fuchs 2007), el Grupo Monsanto que logró obtener cultivares de papa con resistencia al virus *Potato Virus Y* (PVY) y *Potato Leafroll Virus* (PLRV). La eficacia del RNAi para generar resistencia a patógenos se ha logrado por la interacción exitosa entre los factores, como secuencias similares, la selección del gen blanco, carga viral del patógeno y la temperatura del medio ambiente.

Sin embargo, considerando que las infecciones mixtas son comunes en la naturaleza, este factor generará cambios en la eficacia del sistema RNAi, por lo que algunas investigaciones científicas ya estudian este factor, presente en el campo (Duan *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. El silenciamiento génico como herramienta biotecnológica en el control de infecciones mixtas begomovirales

Los geminivirus han resultado ser un modelo de estudio muy interesante desde el punto de vista de su diversidad genética, evidenciando importantes señales de la evolución y biología de estos patógenos. Por otro lado, comprender las complejas estrategias y componentes involucrados en la interacción vector-patógeno-hospedero (Rojas *et al.*, 2005) ha generado líneas de estudio de gran interés académico y económico; además de que han sido utilizados para aplicaciones biotecnológicas como vectores virales para

inducir el silenciamiento de genes (VIGS, por sus siglas en inglés “Vectors for virus-induced gene silencing”); por ejemplo, el geminivirus *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) (Turnage *et al.*, 2002). Las dos secuencias virales más utilizadas para desencadenar el silenciamiento génico en begomovirus son las de la cubierta proteica y la de proteína de la replicación (Lomonosoff *et al.*, 1995). Esto se debe a que el porcentaje de identidad de la secuencia del gen AV1 entre geminivirus es muy alto (Padidam *et al.*, 1995), y la región intergénica es una secuencia que confiere resistencia específica, ya que en ésta se encuentran las señales de regulación para la replicación, además de ser un promotor divergente que dirige la expresión de los genes CP en un sentido (BV1, en el caso del componente B), y de Rep, TrAP y AC3 (BC1) en el sentido opuesto.

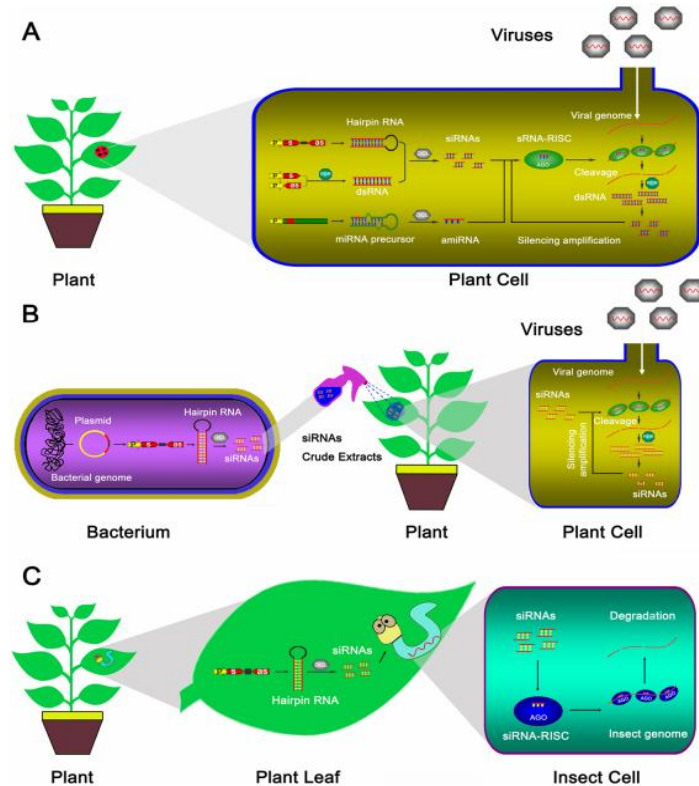


Figura 4. Tres enfoques de la aplicación de RNAi en plantas para generar resistencia a las enfermedades.

- (A) La expresión de dsRNAs genera siRNAs que desencadenan el silenciamiento antiviral.
- (B) Se rocían bacterias-procesadas que generan hcrRNA y siRNAs para conferir resistencia contra virus.
- (C) Plantas transgénicas que contienen una construcción tipo hcrRNA y que generan resistencia contra insectos. Tomado de Duan *et al.*, 2012

Un gran número de trabajos se ha centrado en el principio básico del silenciamiento, que es el reconocimiento por homología entre el transgen y el virus inoculado, trabajos que han demostrado éxito en la reducción de síntomas y en la acumulación de DNA viral. Sin embargo, la presencia de infecciones mixtas o coinfecciones en los cultivos de interés económico ha despertado la inquietud de probar si el silenciamiento génico podría funcionar como mecanismo de defensa con virus relacionados; es decir, que el transgen no sea 100% homólogo al virus inoculado.

Por ejemplo, uno de los primeros trabajos con este enfoque es el de Stanley *et al.* (1990), quienes transformaron plantas de *N. benthamiana* con un clon en tándem del geminivirus bipartita *African cassava mosaic virus* (ACMV), demostrando que las plantas transformadas mostraban menos síntomas que las plantas sin transformar retadas con el mismo virus. En oposición, cuando las transformantes fueron retadas con *Beet curly top virus* (BCTV) y *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), los síntomas y niveles de DNA viral no mostraron cambios.

Tres años más tarde, Bejarano y Lichtenstein (1994) generaron plantas transgénicas de tabaco que expresan una secuencia RNA antisentido de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), obteniendo como resultado una reducción en los síntomas y en la acumulación de DNA viral ante la infección de TGMV. Ellos usaron la región ALI o AC1, esencial para la replicación y que es conservada entre otros geminivirus, por lo que retaron las mismas plantas transformantes con ACMV y BCTV, obteniendo 4-fold de reducción para BCTV, pero no para ACMV.

Es importante resaltar que la similitud en la secuencia de interés de TGMV es de 63% para BCTV y 64% para ACMV, pero dentro de ésta, en BCTV se encuentran 280 nucleóticos con una homología de 82%, en contraste con ACMV, cuya homología es más dispersa. Sus resultados generan como conclusión que una buena complementariedad en las secuencias de interés y las del transgen es necesaria para expresar la secuencia blanco de mRNA. Este estudio indica el potencial para desarrollar vectores antisentido multifuncionales. Chellappan *et al.* (2004) reportaron la producción de plantas transgénicas de cassava aplicando toda la secuencia del gen AC1 de ACMV. Altos niveles de resistencia (disminución en la acumulación de DNA viral del 98%) fueron reportados ante

el reto de virus homólogo (ACMV) y, además, reportaron que provee fuerte protección cruzada contra dos especies heterólogas: el *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV) y *SriLankan cassava mosaic virus* (SLCMV).

En 2006, Abhary y colaboradores utilizaron secuencias de regiones conservadas no codificantes del genoma de *Tomato yellow leaf curl virus-mild* (TYLCV-MLD), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus-Spain* (TYLCSV-ES), para diseñar construcciones capaces de activar el mecanismo de silenciamiento y generar plantas resistentes de tomate y *N. benthamiana*. Los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación dot blot no lograron detectar el DNA viral en plantas asintomáticas y silenciadas, con lo que demostraron una eficaz resistencia contra los virus TYLCV egipcio (TYLCV-[EG]), TYLCV-MLD, y TYLCSV-ES. Asimismo, evidenciaron una correlación positiva entre la resistencia y la acumulación de siRNAs específicos de TYLCV en las plantas silenciadas. Estos autores concluyen que el PTGS puede ser usado para la ingeniería de plantas resistentes a geminivirus.

Gharsallah *et al.* (2008) utilizaron la técnica de agroinfiltración para la expresión de las dsRNA mediante construcciones tipo intron-hairpin (ihpRNA), con secuencias conservadas de la proteína de la cápside (CP) y de la proteína asociada a la replicación (Rep) del virus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (Sicily strain) (TYLCSV-[Sic]). Las plantas agroinfiltradas fueron retadas de forma separada con dos virus TYLCV (*sic*) y TYLCV. Sin embargo, las plantas solo mostraron resistencia a TYLCV (*sic*) y no a TYLCV relacionados, sugiriendo que el mecanismo de silenciamiento no depende de la especificidad de las secuencias virales, sino de otros factores como la diferencia en la virulencia de ambos virus.

Lin *et al.* (2011) hicieron una construcción fusionando la región parcial C2 del begomovirus *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV), con la mitad central del gen N del *Tospovirus Tomato spotted wilt virus* (TSWV) para generar plantas transgénicas de *N. benthamiana* y tomate. Cuando las plantas fueron retadas con ToLCTWV no se observaron síntomas, y cuando fueron retadas con TSWV presentaron alta resistencia. Esto confirmó que dicha resistencia fue por la activación del RNAi inducido, que genero la

presencia de siRNAs. Lo más importante por resaltar es que este estudio logró demostrar que, con la vinculación de segmentos génicos de dos virus con distinta organización genómica, uno de DNA y el otro RNA, se puede conferir resistencia a múltiples virus en plantas transgénicas a través de la vía de silenciamiento génico.

Mubin *et al.* (2011) realizaron un trabajo muy interesante y complejo para activar el RNAi y generar plantas de *N. benthamiana* resistentes: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV), *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (CLCuMB) y dos begomovirus relacionados. Ellos diseñaron tres construcciones: la primera basada en la secuencia de Rep y C4 llamada (CLCRNAiRepC4/pFGC); la segunda con la secuencia de los TrAP y REn (CLCRNAiRepTrAPREn/pFGC), y la última con la región intergénica (CLCRNAiIR/pFGC). Cuando las plantas fueron retadas con CLCuMV los resultados mostraron la eficiencia en la disminución de la infección sistemática en las plantas donde se usó la construcción CLCRNAiRepTrAPREn/pFGC; mientras que para las otras dos construcciones solo se redujeron los niveles de infectividad. Con esta primera parte del experimento los resultados mostraron lo esperado: que cuando se usan secuencias homólogas al virus retado hay un alto porcentaje de éxito.

Un experimento que destaca en este estudio es que retaron las plantas con el virus CLCuMV y su betasatellite CLCuMB, donde observaron que la construcción CLCRNAiRepTrAPREn/pFGC puede reducir los síntomas en 8 de 10 plantas, no así las otras dos construcciones, mostrando la eficiencia del silenciamiento en presencia de CLCuMB. A pesar de esto, los autores llegaron a un nivel, incluso, más interesante: el de probar estas construcciones con virus relacionados. Así, probaron la construcción que ya les había dado el mejor resultado, CLCRNAiRepTrAPREn/pFGC, contra dos virus relacionados, *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) y ACMV; para el gen Rep de estos dos begomovirus la secuencia nucleotídica fue idéntica a CLCuMV en 82% para CabLCV, mientras que para ACMV en 86%. En la inoculación de vectores que contienen el gen Rep de los tres begomovirus que producen fuerte necrosis en las plantas de *N. benthamiana*, los resultados fueron exitosos ante el reto con CLCuMV; sin embargo, la necrosis solo fue menor que la de las plantas sin protección ante el reto de los virus relacionados. Los

autores sugieren entonces que es necesario probar y buscar secuencias que puedan generar alta protección ante begomovirus heterólogos.

2.2. PCR tiempo real en la terapia antiviral

La revisión bibliográfica muestra que el nivel de éxito del RNAi en el control de enfermedades begomovirales con secuencias 100% homólogas entre el transgen y el virus retado es altamente eficiente; aunque cuando las secuencias son heterólogas o virus relacionados, el grado de éxito es variable. De este modo, es de interés seguir buscando tanto secuencias nucleotídicas que sean las mejores en activar el RNAi, como nuevas herramientas que evalúen con más precisión el nivel de protección.

La revisión bibliográfica nos permitió observar que todas estas investigaciones usan como análisis el Southern blot para medir la eficacia en la disminución de DNA viral, la severidad de síntomas y PCR punto final; estas técnicas son muy utilizadas como diagnóstico, pero solo son cualitativas porque indican presencia/ausencia. Pero, recientemente, en las investigaciones clínicas el PCR tiempo real ha permitido la cuantificación absoluta, misma que indica el número exacto de ácidos nucleicos dianas presentes en la muestra, en relación con una unidad específica, permitiendo el monitoreo del progreso de la infección. La cuantificación absoluta es útil para expresar los resultados en unidades que son comunes tanto para el ámbito científico, como médico. La carga viral es un indicador útil del grado de la infección, la interacción virus-hospedero y la respuesta a la terapia antiviral; incluso, se ha demostrado que la gravedad de algunas enfermedades está correlaciona con la carga viral (Mackay *et al.*, 2002).

PCR tiempo real ha sido empleado en el área de investigación de geminivirus para la detección, estimación y distribución de la carga viral en diferentes tejidos de las plantas, además de que se ha evaluado la carga viral en insectos. Mason *et al.* (2007) muestran claramente que PCR tiempo real fue más sensible que la hibridación dot-blot. La Figura 5 muestra que con qPCR se pueden detectar hasta 5×10^{-5} ng de DNA viral, mientras que con el blot apenas se alcanzan a detectar solo 0.11 ng.

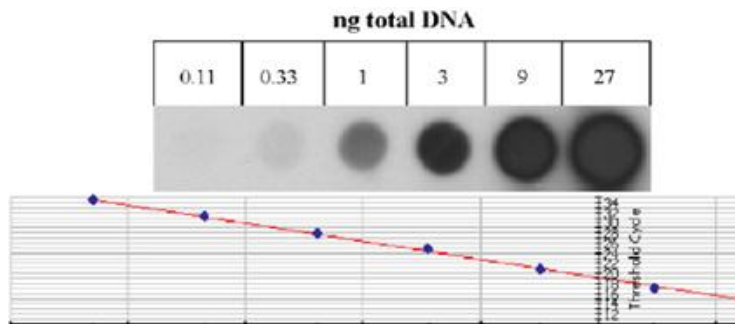


Figura 5. Comparación entre la sensibilidad de Dot-Blot y PCR en tiempo real.

Se observan diluciones seriadas de DNA. Detección quimioluminiscente en membrana de nylon y gráfica de PCR en tiempo real. Se muestran los valores medios de C_T . Los valores de cuantificación se expresan en nanogramos.

2.3. Transcriptoma de los geminivirus y su relación con el mecanismo de silenciamiento génico

El análisis de la expresión de genes es importante en muchos campos de la investigación biológica, puesto que los cambios en la fisiología de un organismo o una célula estarán determinados por los cambios implicados en el patrón original de la expresión del gen. El análisis de la expresión génica puede usarse para obtener una visión de las consecuencias fisiológicas de las modificaciones genéticas de las plantas (Alba *et al.*, 2004).

En el campo de la investigación de las plantas, la tecnología del microarreglo representa un entendimiento de los caminos e interacciones que ocurren en las células y en los organismos. Por ejemplo, la función del gen en las vías metabólicas (por el análisis de mutación), identificación de muestras complejas, diagnóstico de enfermedades, caracterización de patógenos, los diversos mecanismos de defensa frente a patógenos, que finalmente generarán un atlas interactivo de los procesos biológicos que tienen lugar en una célula. Un gran número de experimentos de microarreglos se ha enfocado en la infección de plantas con virus, siendo el modelo más empleado *Arabidopsis thaliana*, modelo que ha permitido conocer la complejidad en la respuesta del hospedero al virus, en la cual se ha comprobado que existe un gran número de factores a considerar, como el tejido, el tiempo de pos-infección, síntomas, la cepa del virus y el hospedero. En estos

estudios, se ha encontrado un amplio número de genes que son inducidos por virus de plantas (Alba *et al.*, 2004; Soosaar *et al.*, 2005; Rensink y Buell, 2005; Whitham *et al.*, 2006; Dardick, 2007; Pacheco *et al.*, 2012; Postnikova y Nemchinov, 2012).

En particular, para esta investigación son de gran interés los fundamentos en las investigaciones relacionadas al estudio de la expresión de genes, ante la interacción geminivirus-hospedero (Anaya-López *et al.*, 2005; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008; Hanssen *et al.*, 2011; Pierce y Rey, 2013; Allie y Rey, 2013).

Algunas de estas investigaciones han analizado uno de los temas más complejos: el de la interacción con patógenos relacionados y no relacionados (Dardick, 2007; Postnikova y Nemchinov, 2012; Pacheco *et al.*, 2012). De este modo, estos trabajos, junto con el conocimiento de las moléculas y rutas del silenciamiento génico (Waterhouse y Helliwell, 2003; Ding y Voinnet, 2007; Du *et al.*, 2012), nos abrirán el camino en el análisis de la interacción patógeno-RNAi-hospedero, pero en un sistema heterólogo.

3. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de silenciamiento génico es una herramienta biotecnológica que ha logrado con éxito el control de enfermedades virales cuando el transgen o construcción es homóloga al virus infectado. Sin embargo, en los estudios realizados con transgenes heterólogos, o en la inoculación de virus con diferentes secuencias al transgen, los resultados muestran diferentes niveles de éxito.

La importancia de retomar estos trabajos de investigación se sustenta en la actual recurrencia de infecciones mixtas o co-infecciones. Aunado a esto, en el amplio proceso de silenciamiento génico aún existen rutas e interacciones moleculares a nivel transcripcional y postranscripcional que necesitan ser elucidadas. De igual forma, se debe comprender más eficientemente la compleja interacción hospedero-virus-protección, por lo que el estudio de silenciamiento génico con secuencias heterólogas permitirá generar información fundamental para evaluar la eficacia del sistema, esclarecer mecanismos o rutas metabólicas responsables del éxito o fracaso de este sistema, así como relacionar la interacción hospedero-patógeno-protección.

4. HIPÓTESIS

Si al usar construcciones con secuencias homólogas al virus retado se sabe que se activa el RNAi, entonces, si usamos construcciones con secuencias heterólogas, se podrá activar la ruta del silenciamiento génico, con lo cual se disminuirá la replicación viral en infecciones mixtas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia del mecanismo de silenciamiento génico, con construcciones homólogas y heterólogas al virus inoculado, como sistema de protección a enfermedades begomovirales.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar construcciones que activen el sistema de RNAi usando la región AC1-IR-AV1 de los virus ToChLPV y PepGMV.
2. Evaluar la eficiencia de las construcciones CIRP y CIRT.
3. Analizar la expresión diferencial del transcriptoma al activar el sistema RNAi con secuencias homólogas y heterólogas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Primer objetivo: diseño de construcciones que desencadenan el sistema de RNAi de la región AC1-IR-AV1, de los virus ToChLPV y PepGMV

A través del clonaje vía tecnología de Gateway (Karimi *et al.*, 2002), se generaron dos construcciones utilizando las regiones AC1-RC-AV1 de ToChLPV y PepGMV. Se utilizó un vector de expresión de RNAi con secuencias de intrón como espaciador para su expresión en planta mediante *A. tumefaciens*. Esta tecnología se basa en el ciclo lisogénico de los virus que infectan bacterias (bacteriófagos). Esta recombinación es específica y especializada porque ocurre en los sitios de unión (attachement-*attB*) de la bacteria y atado

del fago (*attP*), además de que depende de enzimas especializadas que reconocen dichas secuencias, las cuales integra y cataliza cortes dentro o cerca de las secuencias para su posterior escisión para, así, generar productos recombinantes (Lewis, 2004). La eficiencia de este método *in vitro* es de alrededor del 90% y se debe, principalmente, a la presencia del gen *CCDB*, que evita el crecimiento del fago que contiene los sitios *attR2* y *attR1*.

El primer paso consistió en usar la secuencia de los primer degenerados (Rojas *et al.*, 1993) y agregarle secuencias nucleotídicas de los adaptadores: *attB1* sentido directo: 5'-AA AAA GCA GGC TNN- GSP (18-25nt)-3' y *attB2* reverso: 5'-A GAA AGC TGG GTN- GSP (18-25nt)-3'. Con los primer diseñados y templado de ToChLPV y PepGMV se procedió a la amplificación del fragmento de interés por medio de la técnica PCR con la enzima Taq DNA Phusion® High-Fidelity PCR.

Una vez que el fragmento de interés tuvo en sus extremos los sitios de unión, se ligó al vector de entrada pDONOR 201 con la ayuda de la enzima clonasa BP. Posteriormente se transformó en la bacteria *E. coli* DH5 α . Usando la técnica de PCR se procedió a la búsqueda de la colonia positiva que contiene el fragmento de interés (AC1-IR-AV1). Dicha colonia se resemebró y purificó para obtener el plásmido pDONOR 201 que contiene la secuencia de interés AC1-IR-AV1 de cada begomovirus.

Los plásmidos de entrada pDONOR con la secuencia AC1-IR-AV1 de cada begomovirus se ligaron, respectivamente, al vector de expresión pHGWIWG2(II), con ayuda de la enzima clonasa LR. Después se transformó en la bacteria *E. coli* DH5 α . El vector de expresión contuvo la secuencia de interés en sentido y antisentido. Para conocer la orientación correcta de la secuencia AC1-IR-AV1 que formó la horquilla (hairpin) dentro del vector, se digirió el plásmido con la enzima *XbaI* (Anexo 1).

6.1.2. Inserción de las construcciones en la planta

Una vez identificado el plásmido pHGWIWG2(II) que contuvo el fragmento en hairpin AC1-IR-AV1-ToChLPV y AC1-IR-AV1-PepGMV en el sentido/dirección adecuado, se procedió a la transformación en *A. tumefaciens* cepa GV2260.

La integración de la bacteria *A. tumefaciens* con los plásmidos de expresión en la planta se conoce como agroinfiltración, usando un medio de inducción. La agroinfiltración

se realizó con jeringuillas de 1 ml sobre el envés de las hojas, sin presionar demasiado fuerte (Tenllado *et al.*, 2001). Cuatro días después de agroinfiltradas las respectivas construcciones en la cuarta hoja verdadera de la planta, se procedió a cortar la hoja para obtener RNA y realizar la síntesis de la cadena complementaria y DNA que se utilizaría como templado en la técnica de PCR, donde se emplearon los oligonucleótidos que amplifican el gen AV1 y la IR de ambos virus, así como los oligonucleótidos del gen endógeno actina, como un control positivo de la planta. Como un control visible de la agroinoculación se usó una construcción que contiene la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés: green fluorescent protein), la cual, al ser expuesta a luz ultravioleta, reflejó la fluorescencia (Anexo 2).

6.2. Segundo objetivo: evaluación de la eficacia de las construcciones

6.2.1. Diseño del bioensayo de expresión transitoria con las construcciones CIRT y CIRP, en planta de *N. benthamiana*, como defensa ante la infección viral

Semillas de *N. benthamiana* fueron germinadas por 30 días en una cámara de germinación, a 28 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad. Para evaluar la eficiencia de las construcciones se realizó un bioensayo con dos tratamientos CIRT y CIRP que se agroinfiltraron y dos positivo donde las plantas se inocularon con el clon infectivo dimérico de PepGMV A y B y el control negativo, que son plantas sin inocular ni agroinfiltrar. También se evaluaron plantas agroinfiltradas con el vector de expresión vacío (mock). En la Tabla 3 se muestra la descripción del bioensayo. Se utilizaron 8 repeticiones por tratamiento. Las variables a evaluar fueron severidad, incidencia y carga viral.

Tabla 3. Descripción del bioensayo

Grupo	Descripción	Agroinfiltración	Inoculación PepGMV
1	CIRP	+	+
2	CIRT	+	+
3	Control positivo	-	+
4	Control negativo	-	-

Sí= (+) No= (-)

6.2.2. Integración de las construcciones e inoculación del virus en las pruebas de reto

Las construcciones CIRT y CIRP se agroinfiltraron según el protocolo descrito en la sección 6.1.2. Cuatro días después de la agroinfiltración se procedió a la inoculación de los clones infectivos PepGMVAdimpBS y PepGMVBdimpBS (cada uno con dos genomas en tándem de PepGMV A y B, clonados dentro del vector pBluescript), los cuales fueron donados por el Dr. Rafael Rivera-Bustamante (CINVESTAV, México), por el método de biobalística. Para esta técnica se empleó una pistola de aceleración de partículas de alta presión. Los bombardeos se llevaron a cabo utilizando partículas de tungsteno estériles (M10 bio-Rad Laboratorios, Richmond CA), a las cuales se adhirió el DNA total infectivo (Carrillo-Trip *et al.*, 2007).

6.2.3. Evaluación de la severidad, incidencia y carga viral

6.2.3.1 Severidad

La severidad de los síntomas se evaluó durante los 10 días después de la inoculación (dpi). Para la evaluación se usó la escala de Martínez (2008), donde la clasificación está dada en una escala del 0 al 3, dependiendo la aparición de síntomas virales, descritos en la Tabla 4. Los porcentajes de severidad fueron calculados de acuerdo a Vander Plank (1963), con la fórmula $S = (\sum i/N [VM]) * 100$, donde S=porcentaje de severidad, $\sum i$ =la suma de los valores observados, N= número de plantas observadas y VM=los valores de toda la escala. Para determinar las diferencias significativas entre los grupos se realizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney ($P \leq 0.05$).

6.2.3.2. Incidencia

La incidencia fue calculada en la detección de transcritos virales por PCR punto final, usando los primers degenerados AC1048-AV494 (Wyatt y Brown, 1996) (Anexo 3). La fórmula de porcentaje de incidencia fue calculada como sigue: $I (\%) = (\text{Plantas presencia de transcrito} / \text{total de plantas inoculadas}) * 100$. Para determinar las diferencias significativas entre los grupos se hizo la prueba no paramétrica kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$).

Tabla 4. Escala de severidad de síntomas

0	No síntomas foliares
1	Leves síntomas de encopamiento
2	Moderados síntomas de encopamiento
3	Severo encopamiento y enchinamiento, con reducción del tamaño

Tabla 5. Clasificación de incidencia

Transcrito	Disturbios visuales
A	Ausencia
B	Presencia

6.2.3.3. Determinación de la carga viral

La cuantificación absoluta de PepGMV fue determinada por qPCR y realizada a través de los primer PepGMVCPq5 y PepGMVCPq3, que amplifican un fragmento de 104pb del gen AV1 gene (Carrillo-Tripp *et al.*, 2006). El gen endógeno utilizado fue el 18S rRNA (número de acceso: X67238) (Nicot *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción (10 μ l) consistió en 5 μ l de SsoFast TM EvaGreen (BioRad), 0.1 μ l de cada primer, a una concentración optimizada de 250 μ M, y un 1 μ l del DNA (Anexo 3). Las reacciones de PCR fueron realizadas en placas de 96 pozos en el sistema de detección PCR tiempo real CFX96 (BioRad). Los parámetros de amplificación fueron 1 ciclo de 95°C por 30 s (activación del enzima), 40 ciclos que consisten en 95°C por 0.05s (temperatura de desnaturalización), a 60°C/20s (alineamiento y extensión) y un ciclo final de 65°C por 0.05s y 0.5s 95°C para análisis de disociación.

Después de la amplificación, se llevó a cabo un programa de análisis de curva de fusión para verificar los productos amplificados, temperaturas de fusión específicas (T_m) de 65.0 °C to 95.0 °C at 0.5 °C/0.05s. Para cada muestra se amplificaron tres repeticiones en paralelo. Se prepararon dos curvas estándar: la primera a partir del gen de PepGMV (usando un plásmido que contiene un fragmento parcial del gen AV1), y la segunda de un gen endógeno (usando un plásmido que contiene el gen 18S rRNA). El plásmido se diluyó

en serie 10 en 10, a partir de 10 ng de DNA. Para cada sistema, las curvas estándar o de calibración fueron obtenidas por análisis de regresión lineal, a partir del promedio del número de ciclos C_T de las cuatro réplicas de cada muestra y dilución sobre el logaritmo de la cantidad total de DNA de cada muestra (Mason *et al.*, 2008; Péréfarres *et al.*, 2011).

La adquisición y análisis de datos se realizaron con el software BioRad CFX (versión 2.0). qPCR eficacia (E) se calculó por la fórmula: $E = e^{-1/s}$, donde una pendiente (s) de -3.322 (E= 2) representa el 100 % de eficacia. La comparación de la carga viral fue realizada a través de one-way ANOVA con el software estadístico SPSS (15.0).

6.2.3.4. Determinación de la eficacia de las construcciones CIRT y CIRP

La eficacia (E) del sistema RNAi fue calculado como un porcentaje de la reducción de la enfermedad en las plantas protegidas, con respecto a las no protegidas, y fue basada en la habilidad para disminuir la severidad de la enfermedad, la incidencia y la carga viral. La eficacia de las variables se calculó con la formula $E (\%) = \frac{\text{valor del control positivo} - \text{valor de los tratamientos CIRT y CIRP}}{\text{valor del control positivo}}$.

6.3. Tercer objetivo: análisis de la expresión diferencial generada al activar el sistema RNAi con secuencias homólogas y heterólogas

Para los tratamientos con CIRT, CIRP y control positivo, se usaron dos réplicas biológicas independientes para controlar las diferencias en la expresión génica entre los grupos. Para cada réplica biológica se usaron tres hojas de cada planta por tratamiento; las muestras fueron colocadas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , hasta su uso para extracción de RNA. El RNA total se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen) (Anexo 4); 10 g de RNA total se utilizaron para la síntesis de DNAC con la incorporación de fluoróforos Alexa Fluor 555 y Alexa Fluor 647. Una cantidad igual de DNAC marcado de CIRT y CIRP, respectivamente, se mezcló con DNAC marcado del control. Consecutivamente se hibridó con un chip de la colección de '*Arabidopsis thaliana* V.3.0.3. microarrays' durante 14 horas, a 42°C , con solución de hibridación UniHyb (Arraylt). La adquisición de los datos, procesamiento y cuantificación de las imágenes obtenidas a partir de la hibridación

de microarrays se llevó a cabo en un Analizador Array-Pro Analyzer 4000 con el software correspondiente (Packard biochips).

Para realizar el análisis de datos del microarray y seleccionar los genes que se expresan diferencialmente (significativamente entre la muestra y el control), se utilizó el paquete genArise, desarrollado por la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Los datos fueron normalizados, y la media y desviación estándar de la distribución de log₂ (ratio) se calcularon definiendo una diferencia en el cambio global (fold-change o Z-score) y en la confianza. La expresión diferencial de los genes fue considerada con un valor $q \leq 0,05$ y un fold-change de 1.5. La base de datos de Recursos de Información de Arabidopsis (TAIR), Blast2GO, base de datos, anotación, visualización y Descubrimiento Integral (DAVID) V6 se utilizaron para analizar la Ontología de Genes (GO).

7. RESULTADOS

7.1. Primer objetivo: diseño de construcciones que desencadenan el sistema de RNAi de la región AC1-IR-AV1, de los virus ToChLPV y PepGMV

Se obtuvieron dos construcciones tipo intron hairpin (ihpRNA) para activar el RNAi usando la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV. Sin embargo, antes de mostrar los resultados se explicará por qué y de dónde se obtuvo la secuencia AC1-IR-AV1. La Figura 6 muestra el mapa del genoma de ToChLPV, el cual se realizó para identificar la posición y dirección de las secuencias AC1-IR-AV1. El begomovirus PepGMV presenta un genoma de 2613, 7 nucleótidos más que ToChLPV (2606). Además, en el alineamiento específico de la región AC1-IR-AV1 se encontró un 89% de similitud entre ellas.

A su vez, el mapa de la misma figura muestra la secuencia AC1-IR-AV1, donde ≈ 146 nt están en el final 5' del gene AV; la región intergénica tiene 326 nts y para el gen AC1 se tomó una secuencia de 714 nts. El segmento de la secuencia total es de 1186 nts.

Por su parte, la Figura 7 muestra los productos amplificados por PCR obtenidos a partir de DNA genómico del virus ToChLPV, el cual se encontraba resguardado en el

Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y del DNA del virus PepGM. En los carriles 1 y 2 se observan las bandas amplificadas que corresponden a un tamaño de aproximadamente 1100 pb para la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV; en los carriles 3 y 4 se observan las bandas amplificadas correspondientes a la secuencia de AC1-IR-AV1 de PepGMV. El alineamiento de las secuencias obtenidas confirmó el 100% de similitud con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank del virus ToChLPV (número de acceso AY339619) y del virus PepGMV (número de acceso NC_004101.1)

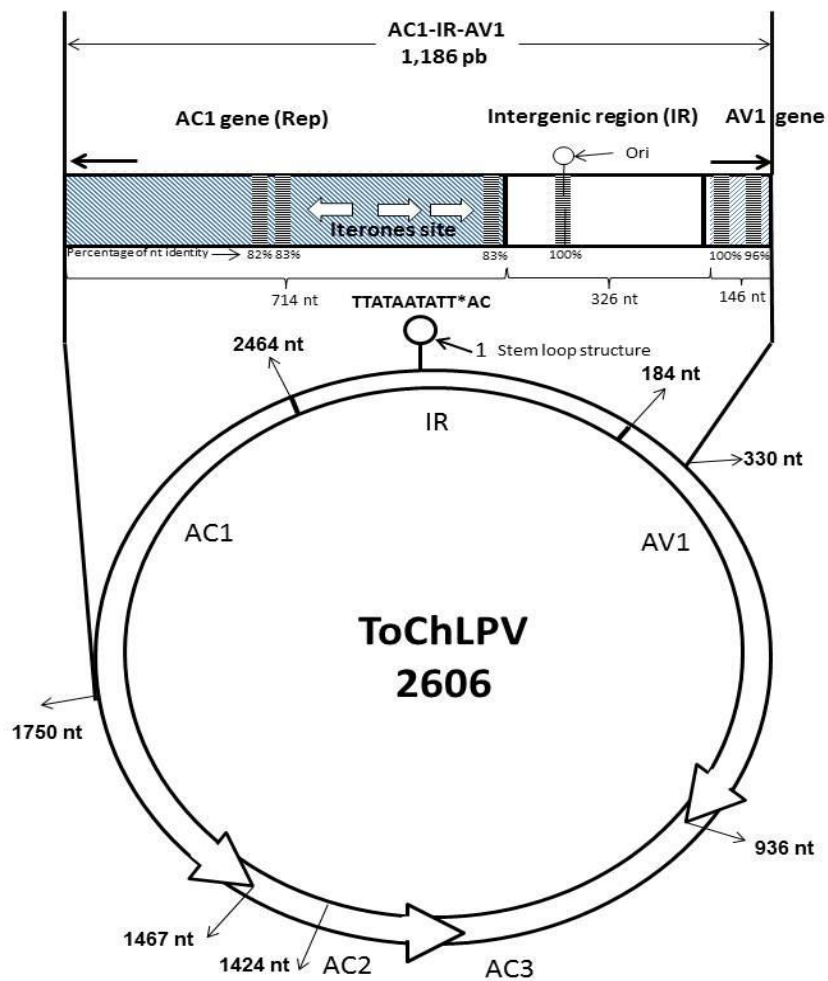


Figura 6. Representación del genoma A de ToChLPV.

En la figura se resalta el fragmento AC1-IR-AV1 de aproximadamente 1186 pb, así como su localización y posición en el mapa genómico.

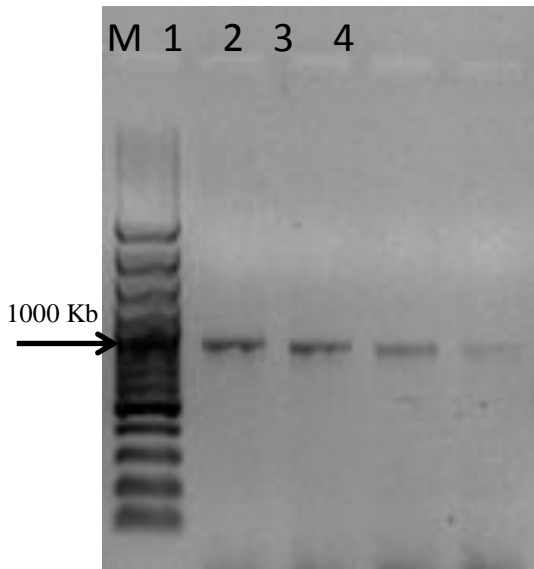


Figura 7. Tamaño de la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV.

Fragmento amplificado de aproximadamente 1200 pb con primer de Rojas *et al.* (1993) y los adaptadores *attB*. En el carril 1 y 2 se observan bandas de la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y en el carril 3 y 4 son bandas de la secuencia AC1-IR-AV1 de PepGMV. M es el marcador de peso molecular 100pb DNA ladder plus.

7.1.2. Inserción de la secuencia de interés en el vector de entrada pDONOR 201

Con los productos de PCR obtenidos anteriormente, se procedió a la clonación de los mismos en el vector de entrada pDONOR, donde se obtuvieron clonas blancas. Para buscar las que tuvieran el fragmento de interés se hizo PCR con los mismos primer y se obtuvo un fragmento de poco más de 1200pb. Las clonas positivas se purificaron y los productos resultantes fueron nombrados como pDONOR-AC1-IR-AV1-ToChLPV y pDONOR-AC1-IR-AV1-PepGMV (Figura 8).

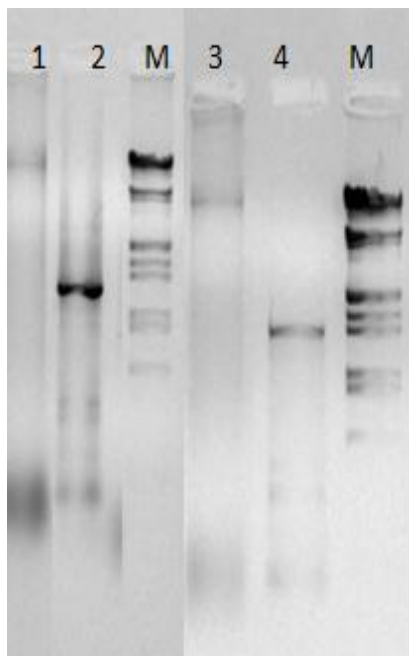


Figura 8. Confirmación de la secuencia AC1-IR-AV1 en el vector de entrada pDONOR.

En el carril 1 se observa el plásmido pDONOR con secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV; en el carril 2 el producto amplificado AC1-IR-AV1 de ToChLPV; en el 3 el plásmido pDONOR con secuencia AC1-IR-AV1 de PepGMV, y en el carril 4 el producto amplificado AC1-IR-AV1 de PepGMV. M marcador de talla basado en el fago λ con EcoR1+Hind III.

7.1.3. Inserción del vector de entrada en el vector de expresión pHGWIWG2(II),0

Los vectores pDONOR-AC1-IR-AV1-ToChLPV y pDONOR-AC1-IR-AV1-PepGMV, después de purificar y verificar que contenían las secuencias AC1-IR-AV1, por PCR se clonaron en el vector de expresión pHGWIWG2(II),0. La Figura 9 muestra las bandas que verifican la integridad de los plásmidos pHGWIWG2(II),0 que contiene el fragmento en hairpin AC1-IR-AV1-ToChLPV y AC1-IR-AV1-PepGMV. Asimismo, se muestra el patrón de bandeo de la digestión enzimática realizada con la enzima *Xba*I, lo que permite seleccionar el plásmido que contiene el fragmento de interés de aprox. 1600-1700pb. En la Figura 9 se observa también que solo los plásmidos 3 y 7 contienen el fragmento con el tamaño correcto del inserto AC1-IR-AV1. Estos resultados se basan en el cálculo realizado en el Anexo 2, para obtener el tamaño correcto del producto digerido.

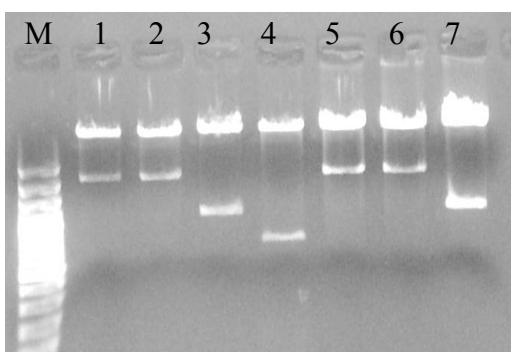


Figura 9. Patrón de digestión con la enzima *xba*I para el vector PH7GWIWG2(II),0.

Del carril 1 al 4 pertenecen al begomovirus ToChLPV y del 5 al 7 de PepGMV, donde el fragmento esperado corresponde a los carriles 3 y 7.

7.1.4. Inserción del vector expresión pHGWIWG2(II),0 con la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV, en *A. tumefaciens*

Una vez que se verificó la clona con el fragmento correcto, se purificó y se clonó de nuevo en *A. tumefaciens*, donde para verificar que la bacteria contenía la secuencia AC1-IR-AV1, se realizó un corte con la enzima *Xba*I. Entonces se obtuvieron bacterias de *A. tumefaciens* con un vector de expresión tipo hairpin de la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV. Al resultado de este proceso se le denominó construcciones CIRT para el plásmido pHGWIWG2(II),0 que contiene el fragmento en hairpin AC1-IR-AV1-

ToChLPV, y CIRP para el plásmido pHGWIWG2(II),0 que contiene el fragmento en hairpin AC1-IR-AV1-PepGMV.

Más adelante, en la Figura 10 se observa una representación del diseño teórico de las construcciones realizadas (CIRT y CIRP). También se observa que cada construcción contiene el gen promotor 35S y la dirección que éste sigue, así como el gen de selección, que en este caso es *streptomicina*. Se pueden apreciar la posición y dirección de nuestra secuencia de interés y los adaptadores que se emplearon para cada región; pero, sobre todo, se puede ver el intron que se encuentra entre las repeticiones invertidas. Este fragmento fue seleccionado de la base de datos de *A. thaliana* (ac007123.em_pl) porque posee características ideales para un eficiente empalme (splicing), con secuencias ricas en A+T en los sitios cerrados para las secuencias consenso (Karimi *et al.*, 2002). Es importante resaltar que este diseño está basado en el Mapa de la Tecnología Gateway.

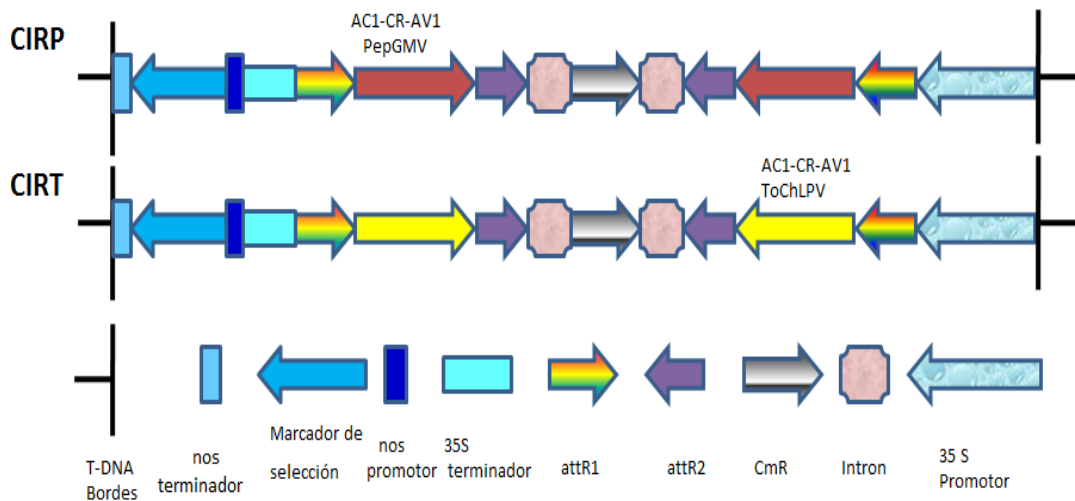


Figura 10. Esquema de las dos construcciones CIRT y CIRP. Éstas se encuentran dentro del vector PH7GWIWG2(II),0 y expresan una dsRNA con repeticiones invertidas de la secuencia AC1-RC-AV1 de PepGMV y ToChLPV con un intron como espaciador para obtener construcciones tipo ihpRNA.

7.1.5. Inserción de las construcciones en la planta

A continuación, en la Figura 11 se muestra la forma en la que se realiza la agroinfiltración, donde la bacteria *A. tumefaciens* es integrada a la planta por medio de inducción. A su vez, en la Figura 12 vemos la fluorescencia emitida por la secuencia que expresa la proteína verde fluorescente en las hojas agroinfiltradas con esta construcción, al ser visualizadas en luz ultravioleta. Dicha construcción fue utilizada como control visual de la agroinfiltración.



Figura 11. Representación del protocolo de agroinfiltración. Se muestra cómo fueron protegidas las plantas de *N. benthamiana* usadas en el bioensayo.

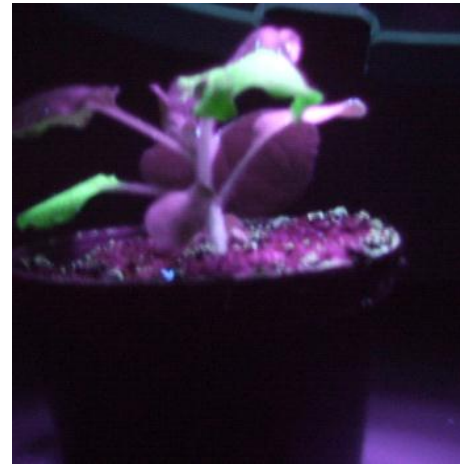


Figura 12. Ejemplo de agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*. Con la construcción que contiene el gen que codifica para proteína verde fluorescente irradiada con luz UV.

7.2. Segundo objetivo: evaluación de la eficacia de las construcciones

7.2.1 Bioensayo para evaluación de la funcionalidad de las construcciones

Como resultado del bioensayo, la Figura 13 (imagen C) nos permite inferir que la construcción CIRP protege a las plantas de la infección viral causada por el virus PepGMV, ya que no son detectables los síntomas característicos de esta infección viral, tales como enchinados, brotes reducidos y acucharamiento de hojas; similares a los

síntomas reportados en otras regiones del país, donde ya se conoce la etiología de origen geminiviral (Garzón-Tiznado *et al.*, 2002).

El grupo de plantas que fue inoculado con el virus PepGMV, por medio de la técnica de biobalística, presentó síntomas de infección viral, tal y como se muestra en la fotografía de la Figura 13 (imagen B). El grupo que contiene la construcción CIRT presentó leves síntomas de la infección viral, según se ve en la imagen D, y el de las plantas control no mostró síntomas de infección viral, como se muestra en la imagen A.



Figura 13. Comparación de los síntomas de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PepGMV, en los diferentes grupos del bioensayo. A) planta sana utilizada como control negativo. B) Planta después de 10 días de la inoculación con el clon infeccioso PepGMV (control positivo), la cual muestra severos síntomas de encrespamiento y distorsión de las hojas jóvenes sistémicas. C) Planta agroinfiltrada con la construcción CIRT e inoculada con PepGMV, misma que no muestra síntomas. D) Planta protegida por CIRT que muestra síntomas leves ocasionados por PepGMV.

7.2.2. Evaluación de la severidad, incidencia y carga viral

7.2.2.1. Severidad

Es la porción de tejido de plantas afectadas, expresada en porcentaje de área total, es decir, se refiere a cuánto tejido de la planta se encuentra afectado por la enfermedad. La severidad es una medida visual subjetiva, por lo que está sujeta a variaciones y errores de agudeza visual del evaluador (González-Pérez *et al.*, 2011). Con los datos obtenidos de las observaciones de severidad de síntomas, y basados en la escala descrita en la metodología, se realizó el cálculo de porcentaje de severidad. Cabe señalar que con los mismos datos de severidad se aplicó el estadístico (Tabla 6). Las diferencias significativas entre grupos y variables evaluadas se presentan en la Tabla 7.

$$\text{Severidad (\%)} = (\sum i/N(\text{VM})) * 100$$

$$\text{CIRT} = ((3+3+2+2+1+0+0+0)/(8*3)) * 100 = 45.83 = 54.99\%$$

$$\text{CIRP} = ((2+1+1+0+0+0+0+0)/(8*3)) * 100 = 16.66 = 20\%$$

$$\text{PV} = ((3+3+3+3+2+2+2+2)/(8*3)) * 100 = 83 = 100\%$$

Tabla 6. Datos crudos obtenidos por efecto de CIRT y CIRP, ante la infección causada por PepGMV en plantas de *N. benthamiana*.

Planta	Severidad ¹			Incidencia ²			Carga viral ³		
	Escala de síntomas (daño foliar)			PCR (presencia/ ausencia)			Ciclo de amplificación (C)		
	Control Positivo	CIRP	CIRT	Control positivo	CIRP	CIRT	Control positivo	CIRP	CIRT
1	3	1	3	+	+	+	16.10	24.61	21.20
2	2	0	2	+	-	+	19.40	26.93	20.71
3	3	0	3	+	-	+	20.96	26.24	17.89
4	2	0	1	+	-	-	18.22	24.13	27.87
5	3	0	0	+	-	-	16.50	25.10	29.50
6	3	2	2	+	+	+	15.53	24.22	21.44
7	2	0	0	-	-	-	24.73	25.31	27.36
8	2	1	0	+	+	-	17.02	24.57	28.57

CIRT: construcción que contiene la secuencia AC1-RC-AV1 de ToChLPV.

CIRP: construcción que contiene la secuencia AC1-RC-AV1 de PepGMV.

Control positivo: plantas inoculadas con PepGMV pero sin construcción.

¹Promedio de las réplicas realizadas para cada planta con síntomas/grado de daño foliar, basado en la escala propuesta.

² Detección de transcritos virales de PepGMV para el gen AV1, usando gel de agarosa y electroforesis; + y - (indican presencia y ausencia).

³ Valores medios obtenidos de las réplicas realizadas para cada muestra.

7.2.2.2. Incidencia

Se entiende por incidencia el número de unidades de plantas afectadas, expresado en porcentaje. Esta variable no indica la magnitud de la enfermedad en términos de tejido afectado, pues basta con una pequeña porción de éste para considerarla como una planta con síntomas de enfermedad (Agrios, 2005). Aunque en el estudio se usa el término incidencia, no significa que evaluamos visualmente, sino que usamos la herramienta de amplificación en cadena de la polimerasa. Esta herramienta de biología molecular permite detectar y confirmar la presencia de transcritos del virus PepGMV. Para ello se realizaron reacciones de amplificación, utilizando como templado DNA de las 32 plantas del bioensayo. Los productos obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 1%, teñidos con Sayber y visualizados en un fotodocumentador. A partir de este gel se asignaron presencia (+) y ausencia (-) de los transcritos (Tabla 6) y se calculó el porcentaje de presencia de transcritos virales. El porcentaje de incidencia se obtuvo por medio de la fórmula:

Incidencia (%)= (total de muestras positivas del PCR/número total de las muestras) X 100

CIRP = (3/8) X 100= 37.5= 42.6%

CIRT= (4/8) X 100= 50=57.2%

PV= (7/8) X 100= 87.5%

Los datos de la Tabla 6 fueron utilizados para realizar los estadísticos que permitieran encontrar diferencias significativas entre los grupos. Con respecto al control positivo, se usó el programa estadístico PAST y se aplicó el estadístico de kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$), donde se pudo observar que el grupo CIRP sí presenta diferencias significativas en relación con el control positivo.

7.2.2.3. Carga viral

El logaritmo de la concentración inicial ($\log SQ Cp$) del gen AV1, del begomovirus y el gen endógeno 18S ($\log SQ18S$) fueron interpolados para cada muestra experimental. La ecuación de las curvas estándar del gen de la cubierta proteica de PepGMV fue $y = -3.385x + 18.582$; $R^2 = 0.989$, con una eficiencia calculada de 97.4%; mientras que para el

gen 18S de la planta fue $y=-3.450x+13.022$; $R^2=0.999$, con una eficiencia calculada de 94.9%.

Las curvas muestran una alta correlación de coeficientes y son lineales en el rango de concentraciones de DNA estándar y el DNA experimental examinado; sus valores no fueron significativamente diferentes. Las curvas melting (Figura 14) de las muestras, así como las diluciones seriadas amplificadas para el gen de la cubierta proteica y 18S muestran que los primer no generan productos inespecíficos durante la amplificación, por lo que las curvas que se generan tienen entre el 98-96% de eficiencia.

La Figura 15A muestra la eficiencia y reproducibilidad de la amplificación de cada una de las reacciones, las cuales son representadas por la cinética en la acumulación de fluorescencia, durante la formación del producto con respecto al tiempo (C_T). En dicha figura se muestran en color azul las seis diluciones seriadas del gen de la cubierta proteica del virus PepGMV; en color amarillo se observa que es la muestra que tiene mayor cantidad de DNA viral, lo cual es lógico porque son las muestras que solo contienen al virus PepGMV. Por otro lado, con curvas color verde se ve al tratamiento CIRT, donde el DNA viral es casi 10 veces menor o una dilución menos que el control positivo. Las muestras protegidas con CIRP presentan casi dos diluciones menos que el control positivo.

Así, mediante esta figura podemos decir que la construcción homóloga CIRP es más eficiente que la CIRT o la construcción heteróloga, pero que aún esta construcción protege a las plantas de la acumulación viral con respecto al control.

En la Figura 15B, la representación gráfica logarítmica es definida por una regresión lineal que permite determinar la carga viral en función de los valores de C_t y de la cantidad de DNA inicial de cada replica, obteniéndose un coeficiente de correlación ($R^2=0.99$).

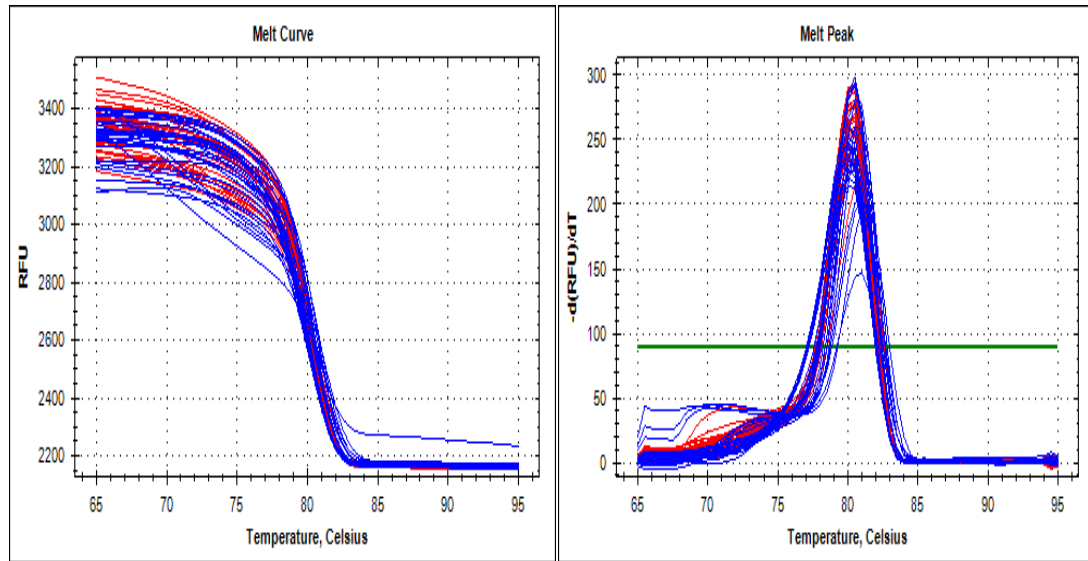


Figura 14. Gráficas de la temperatura de fusión. Las curvas estándar del gen de la cubierta proteica y los cuatro grupos de bioensayo.

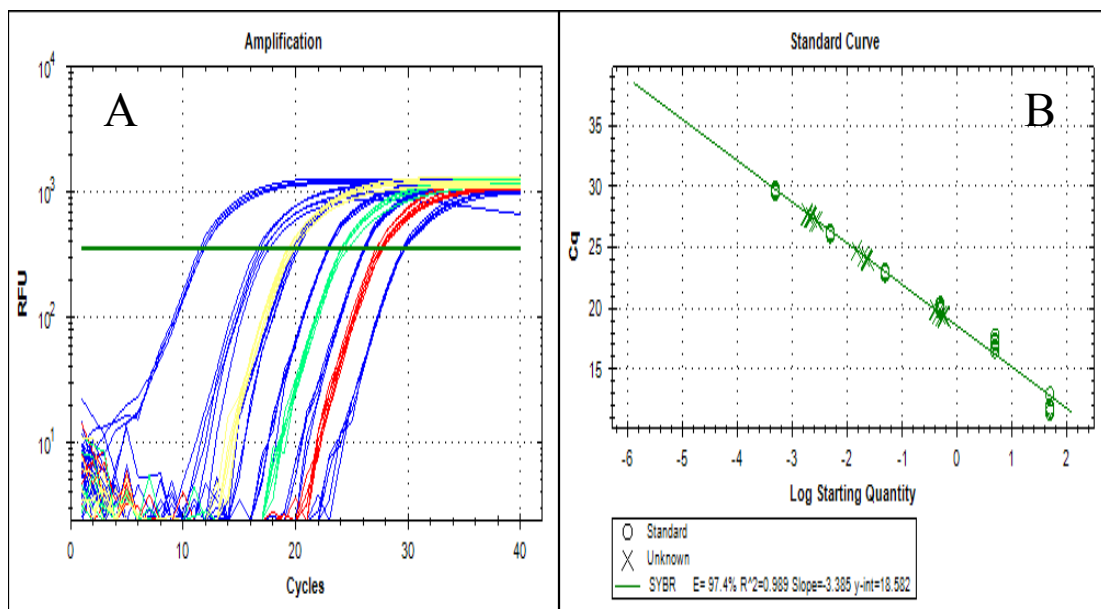


Figura 15. Tiempo real curva estándar y curvas problema. A: típica gráfica de qPCR para determinar el valor de C_T , donde las curvas azules representan las diluciones seriadas, las curvas amarillas son las muestras del control positivo, las curvas verdes CIRT y las curvas rojas CIRP. **B:** gráficos de PCR tiempo-real del promedio del valor de C_T de las seis diluciones seriadas (X) y las muestras de los cuatro grupos del bioensayo expresadas en nanogramos. La ecuación de la recta es $m= -3.385$, $b=18.582$ y $E= 97.4\%$

Más adelante, la Tabla 7 muestra los valores en nanogramos de DNA del virus PepGMV, en el valor de punto de corte (C_T). El análisis estadístico de ANOVA de un factor muestra diferencias significativas entre los cuatro grupos del bioensayo.

Porcentaje de carga viral (%)

Si control negativo es el 100% y su concentración de DNA viral es 0.522, CIRT, que tiene $0.0227=4.39$, entonces $100-4.39= 95.65\%$ es la eficiencia en la disminución de la acumulación viral. Si CIRP= $0.0022=0.38$, entonces $100-.38= 99.65\%$ es lo que CIRP disminuye la acumulación viral.

El resultado de la acumulación de DNA viral se correlacionó positivamente con la gravedad de los síntomas, donde los valores más bajos se encuentran en plantas asintomáticas o en plantas que mostraron síntomas leves (Tabla 6). Se observó una alta eficacia en la disminución de la carga viral en las plantas protegidas con ambas construcciones. La eficacia observada con CIRT fue del 95.6% y 99.65% con CIRP (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de DNA viral con respecto al ciclo de amplificación de la curva estándar y de los cuatro grupos del bioensayo

Nombre	C_T	ng/ μ
Dilución 1	12.7	17.37
Dilución 2	17.43	3.4
Dilución 3	20.64	0.608
Dilución 4	23.05	0.01319
Dilución 5	26.44	0.00232
Dilución 6	29.92	0.0003349
CSVSC	32.16	0.0000401
CIRP	27.66	0.0027
CIRT	24.43	0.022
Control positivo	19.83	0.522

El promedio de cuantificación absoluta de DNA viral fue diferente ($P < 0,05$ ANOVA) en todos los tratamientos. El valor más alto se dio en el control positivo con 5.22×10^{-1} copias. En CIRT observamos 2.27×10^{-2} copias y en CIRP 2.20×10^{-3} copias. Por lo tanto, la acumulación viral se redujo 19.3 en CIRT y 237.2 veces para CIRP, respecto a las plantas control. Las copias virales con CIRP se redujeron 12.3 veces en comparación con CIRT.

7.2.2.4. Eficacia

Los resultados con esta variable nos muestran claramente cómo en la construcción homóloga al virus inoculado, la eficiencia es de más del 50% para todas las variables, e incluso existen diferencias significativas en los resultados visuales. Por su parte, para la construcción CIRT con secuencia heteróloga a PepGMV, el begomovirus inoculado, se observa en la Tabla 8 que las variables visuales o de presencia ausencia no muestran los beneficios de la protección, pero el análisis de acumulación de DNA viral deja muy claro la importancia de evaluar estas terapias con herramientas más finas como es el qPCR.

Tabla 8. Resumen y comparación de la eficiencia de las dos construcciones CIRT y CIRP para reducir la severidad de síntomas, la incidencia de transcritos y la acumulación de DNA viral en la infección de PepGMV.

RNAi	Severidad			PCR (+/-)	Incidencia		Carga viral		
	Rango de severidad ¹	Porcentaje de daño foliar (%) ²	Eficacia (%) ³		Datos ajustados (%)	Eficacia (%)	Copias	Folds	Eficacia (%)
CIRT	1.375	55 ^a	45	4/4	57.4 ^c	42.6	2.27×10^{-2c}	19.3	95.6
CIRP	0.50	20 ^b	80	3/5	42.8 ^b	57.2	2.20×10^{-3b}	237.3	99.56
Control positivo	2.5	100 ^a	0	8/0	100 ^a	0	5.22×10^{-1a}	1	0

¹ Datos que representan la media de las réplicas.

² Datos que fueron convertidos a porcentaje con las fórmulas presentadas en la metodología y ajustados al máximo valor con el control positivo (plantas no-protegidas que fueron inoculadas con el clon infectivo de PepGMV).

Las letras pequeñas indican las diferencias significativas entre las construcciones y el control positivo.

7.3. Tercer objetivo: análisis de la expresión diferencial generada al activar el sistema RNAi con secuencias homólogas y heterólogas

7.3.1. Obtención de RNA total y elaboración de los microarreglos

El primer paso para la realización de un arreglo genómico es la calidad e integridad del RNA. En la Figura 16 se observa la integridad del RNA, los resultados de hibridación entre la muestra con protección (CIRT y CIRP) y las muestras control positivo (PepGMV), que culminaron con dos imágenes que muestran la expresión génica o una foto génica denominada “transcriptoma” (Figura 17), la cual se ve modificada por los cambios en las condiciones bióticas o abióticas de un organismo. En este estudio es por el uso de construcciones RNAi y, especialmente, para evaluar el comportamiento de secuencias heterólogas con la construcción CIRT.

Una vez que obtenemos la fotografía génica se procede a la interpretación de datos. Para ello se realizan procesos informáticos con la función Zscore.plot, que grafica los datos en conjuntos de colores y determina la expresión diferencial del transcriptoma. Los colores dependen del valor absoluto del Z-score (x) que tenga cada punto: $x < 1$ (rosa), $1 < x < 1.5$ (amarillo), $1.5 < x < 2$ (rojo) y si $x > 2$ (negro) (Figura 18).

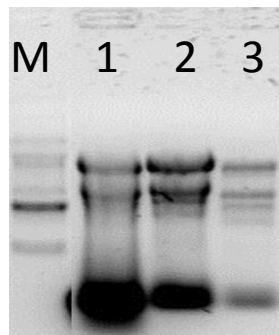


Figura 16. Electroforesis de RNA del bioensayo. En el gel de agarosa al 1% se muestra la integridad del RNA del pool de 8 plantas para cada grupo: protegidas con CIRP (carril 1) y protegidas con CIRT (carril 2), así como control positivo (carril 3). Infección con PepGMV.

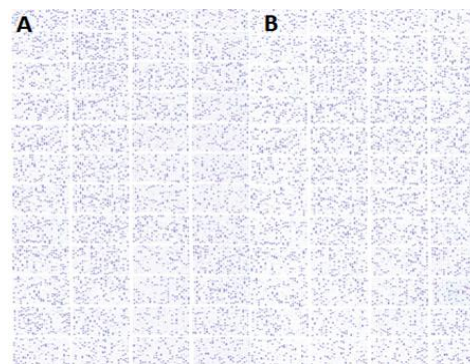


Figura 17. Perfil de expresión de los dos arreglos realizados: A) Grupo de plantas protegidas con CIRT y retadas con PepGMV, B) Grupo de plantas protegidas con CIRP y retadas con PepGMV; ambos fueron hibridados con el control positivo (PepGMV).

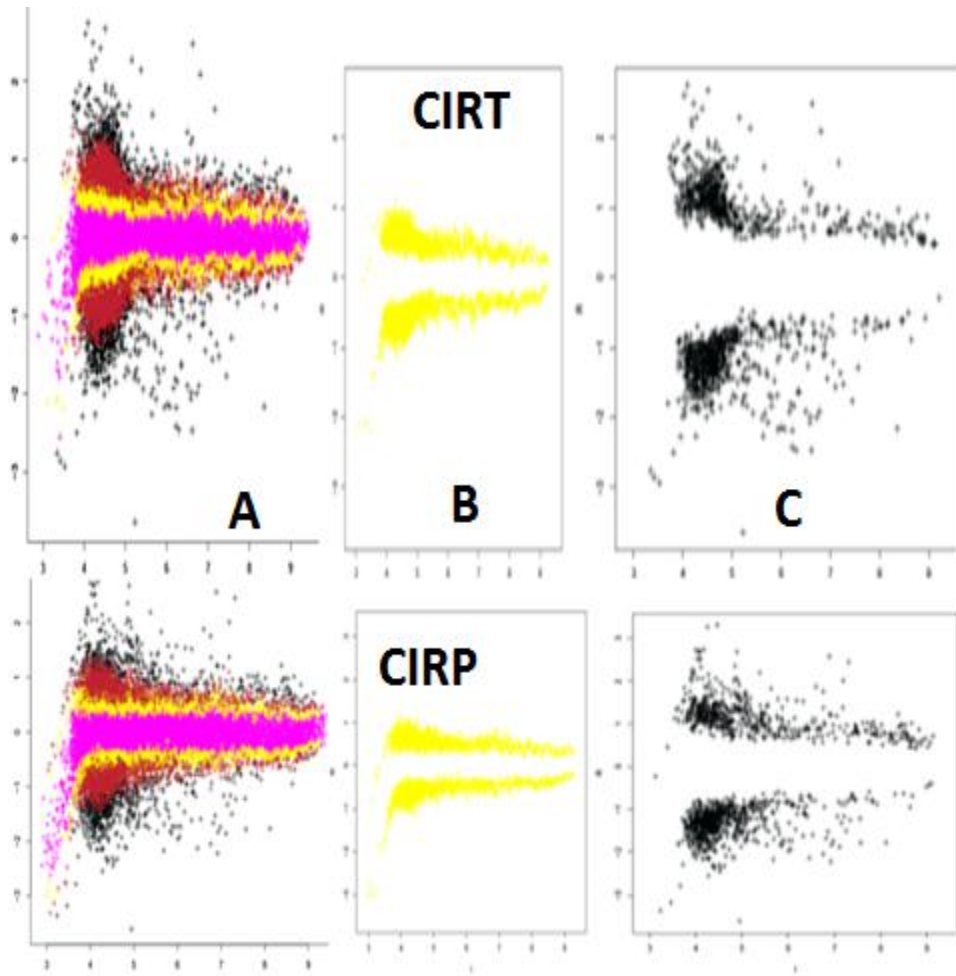


Figura 18. Datos del arreglo CIRT Y CIRP después del análisis Z-score. A: $x < 1$ (Rosa); **B:** si $1 < x < 2$ (Amarillo), y **C:** si $x > 2$ (Negro).

Para la obtención de información funcional y estadística de cada gen sobre o subregulados se utiliza la función `genMerge`, seguida de la función `post.analysis`, donde se genera una lista con identificadores. En cuanto al análisis de respuesta de las plantas a la infección por el begomovirus PepGMV, cuando éstas son protegidas por construcción homóloga (CIRP) y una heteróloga (CIRT), el número total de genes en los experimentos desarrollados fue de 27,341 para CIRP y 27,217 para CIRT. Al usar un Z-score de 1.5 el total de genes sobre regulados fue de 1721 para CIRP y 1625 para CIRT. Asimismo, se encontraron genes para la construcción CIRP 1039 que disminuyeron su nivel de expresión, mientras que en CIRT fueron 988.

Cuando se llevó a cabo una comparación entre CIRT y CIRP, se encontró que en los genes sobre regulados solo compartían 8, y para los reprimidos que compartían 18 genes iguales (Figura 19).

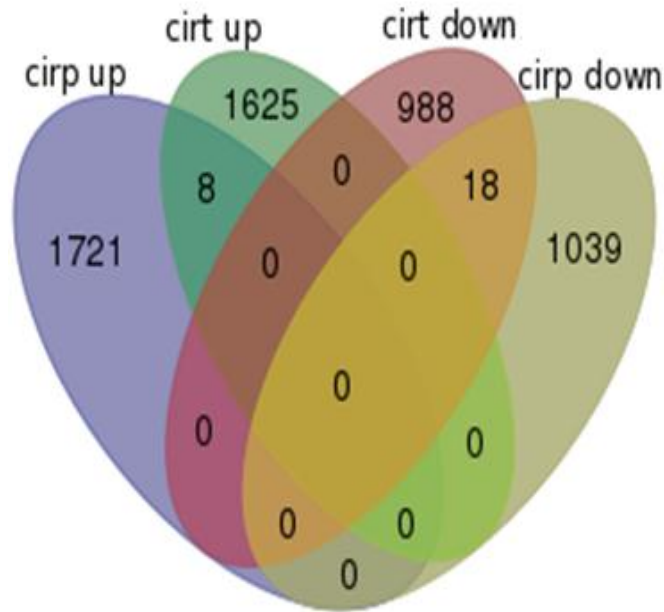


Figura 19. Diagrama de Venn. Muestra la comparación de los dos arreglos cuando las plantas son protegidas con CIRP y CIRT, retadas con PepGMV e hibridadas con PepGMV, a un Z-score de 1.5.

7.3.2. Caracterización funcional de la expresión diferencial de los genes

El análisis del arreglo fue realizado con Blast2GOpro, una herramienta bioinformática útil para la anotación funcional de las secuencias, basada principalmente en la ontología de genes (GO). Esta herramienta permitió el análisis de numerosas funciones y aplicaciones como el InterPro, que nos proporcionó un análisis funcional de las proteínas mediante la clasificación en familias y la predicción de dominios y sitios importantes. La base de datos Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) proveyó información sobre el conjunto de datos generados por la secuenciación de los genomas, aunados a las tecnologías experimentales de los sistemas biológicos de células, organismos y

ecosistemas. Dentro de las múltiples herramientas con que cuenta esta base de datos está Kegg Pathway, que es una colección de mapas y rutas que representan el conocimiento sobre las redes de interacción molecular, como: metabolismo, procesamiento de la información genética, procesos celulares, resistencia a enfermedades, etcétera.

7.3.3. Análisis de homologías y anotación funcional en la ontología génica

Las secuencias descargadas de cada una de las listas de genes fueron vaciadas en el programa Blast2GO. Primeramente, a cada una de las secuencias se le sometió al algoritmo BlastX, utilizando los siguientes parámetros: 20 hits por secuencia, 1×10^3 de expect value y comparado con la base de datos “nr” (non-redundance). Una vez capturado el nombre de todos los genes se procedió con un mapeo de cada gen en la base de datos GO (Gene Ontology-ontología génica); después del mapeo se realizó una anotación de cada gen y el etiquetado de todas las enzimas presentes. Finalmente los datos fueron etiquetados por las familias proteicas InterPRO.

Las figuras 20, 21 y 22 muestran la clasificación funcional de los procesos biológicos para los genes sobre regulados de las plantas agroinfiltradas con la construcción CIRT y CIRP. Para la construcción CIRT se puede observar que existe una sobreexpresión de secuencias génicas diferente a CIRP; por ejemplo, en CIRT encontramos que existen genes que tienen función biológica en el sistema inmune. En las figuras 20 y 21 observamos que están relacionados a la respuesta hipersensible, respuesta a ácido abscísico, respuesta a la resistencia adquirida mediante el ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y auxinas. Mientras que en CIRP no observamos la sobreexpresión de genes relacionados al sistema inmune.

En la respuesta a estímulo, se observa en la Figura 20 que CIRT presenta 827, mientras que CIRP solo presenta 539. En la Figura 22 encontramos 375 secuencias enfocadas a la respuesta de estrés, sin especificar de qué tipo. A su vez, observamos casi 200 secuencias para respuesta a estímulo biótico, aproximadamente 35 secuencias relacionadas a los cambios epigenéticos y 6 secuencias para reproducción viral; mientras

que en CIRT tenemos 3 secuencias para la reproducción viral, casi 150 para los procesos involucrados en óxido-reducción y la regulación de la transcripción.

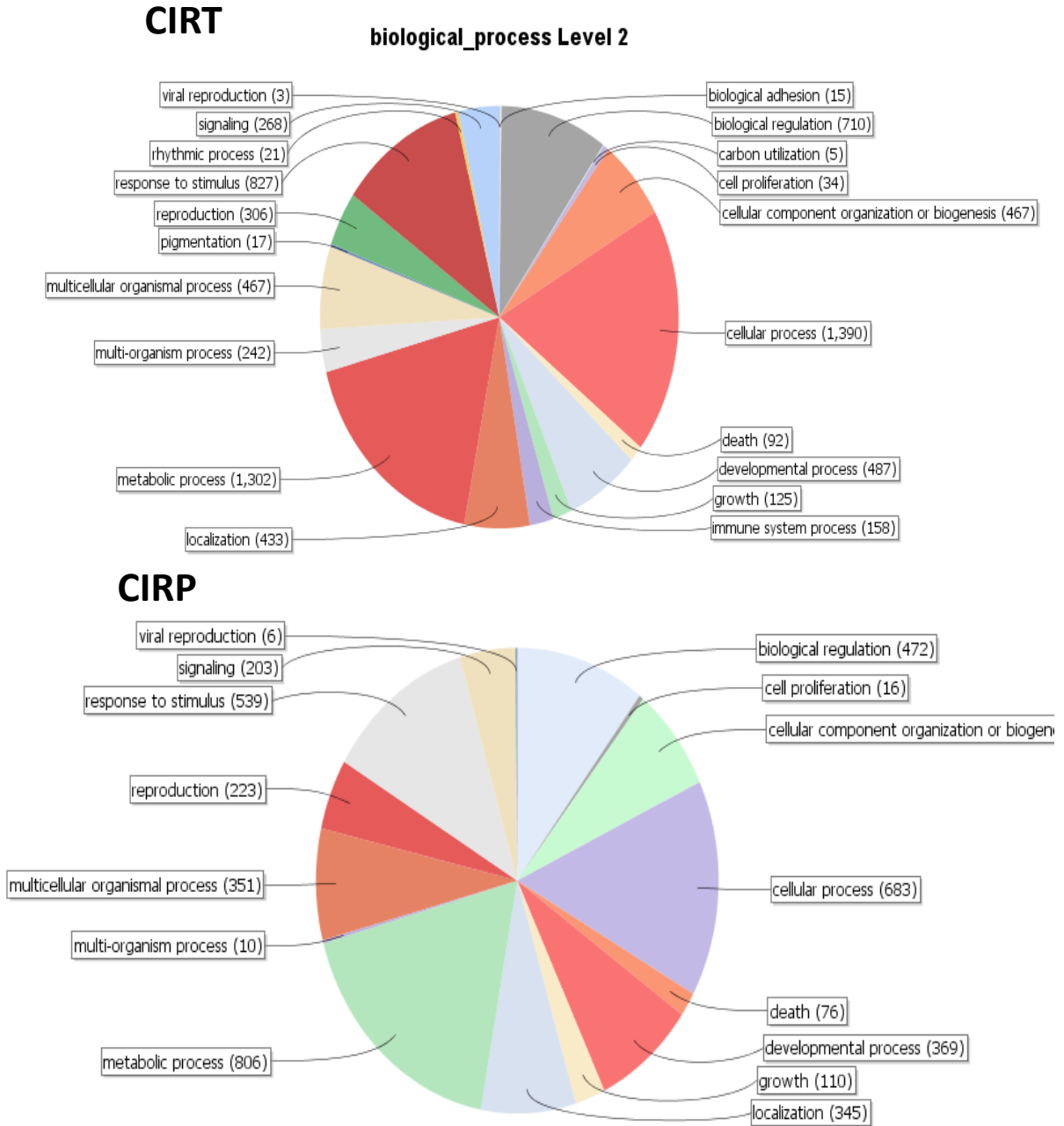


Figura 20. Ontología de genes para procesos biológicos expresados en CIRT y CIRP. Se muestra de forma amplia (Nivel 2) el agrupamiento de secuencias sobre reguladas (up), con base en su función biológica, a un Z-score de 1.5. El número entre paréntesis representa las secuencias participantes en los procesos.

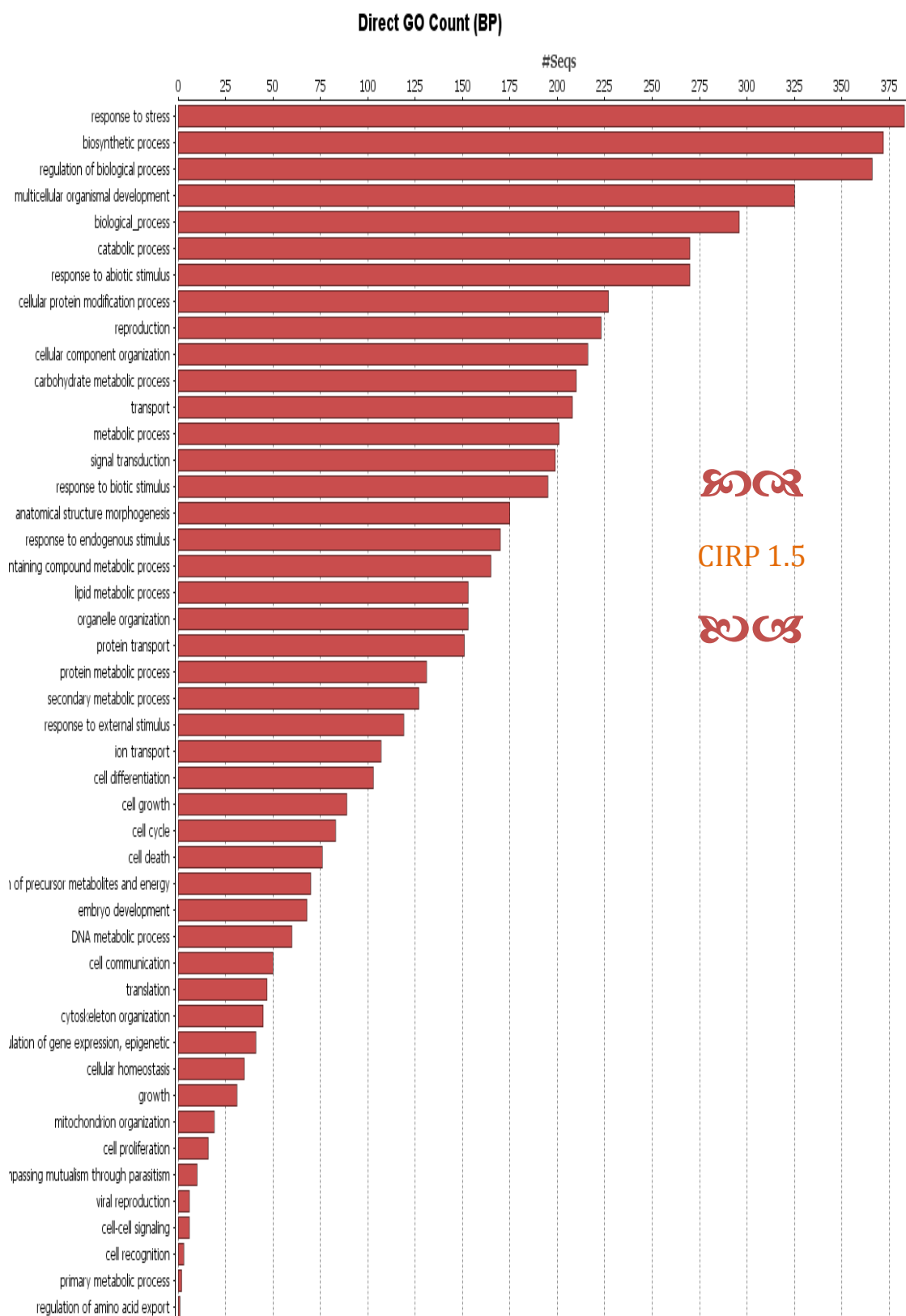


Figura 21. Procesos biológicos para CIRP. Se muestran de forma específica cuántas secuencias sobre reguladas (up) aparecen en las plantas protegidas con CIRP, con base en su función biológica, a un Z-score de 1.5.

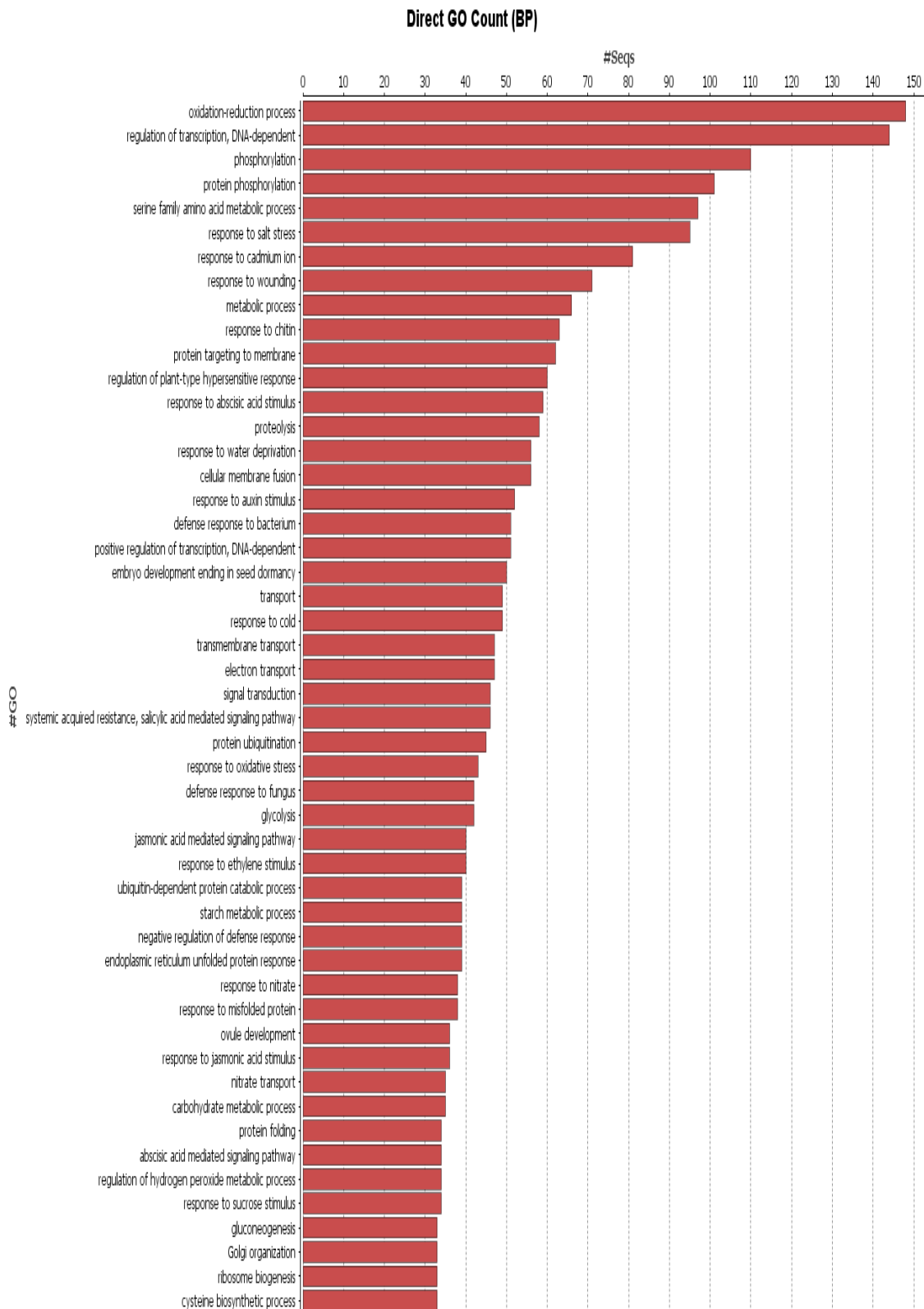


Figura 22. Procesos biológicos para CIRT. Se muestran de forma específica cuántas secuencias sobre reguladas (up) aparecen en las plantas protegidas con CIRP, con base en su función biológica, a un Z-score de 1.5.

7.3.4. Análisis de sobre regulación de los componentes del RNAi por efecto de CIRP y CIRT

En este estudio, la parte central del objetivo tres son los patrones de expresión de genes que inducen la maquinaria antiviral de RNAi en *N. benthamiana*, utilizando CIRT y CIRP en la interacción con PepGMV. De este modo, se encontraron componentes clave en vía de RNAi: transcripción primaria, dsRNA, producción de siRNAs, focalización, metilación y mantenimiento. En el análisis de datos se encontraron todos los componentes involucrados en la ruta del RNAi, pero algunos estaban en el nivel central (Figura 18, región rosa); aunque para fines de interés solo se incluirá en la tabla 9 un resumen de la sobreexpresión a un Z-score de 1.5.

Tabla 9. Lista de genes sobre regulados (Z-score 1.5) involucrados en la ruta RNAi del transcriptoma de *N. benthamiana* por efecto de CIRT y CIRP, en respuesta a la infección de PepGMV.

Tair ID	Proteína	Descripción	Referencia
CIRT			
AT2G35160.1	SUVH5	Ayuda a mantener la metilación de H3K9, actuando con CMT3 para la metilación de CG.	(Ebbs y Bender, 2006)
AT3G14860.2	NHL	Tiene motivos tripartitas (TRIM) que funcionan como un cofactor para inducir el silenciamiento por miRNA.	(Ding y Voinnet, 2007)
AT3G15390.1	SDE5	Convierte transcritos homólogos a nuevas cadenas dsRNA, involucrado en el movimiento células-célula.	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2005)
AT3G49500.1	RDR6	Trabaja con SGS3 para producir dsRNA por DCL4, para generar siRNAs de 21 nt.	(Axtell <i>et al.</i> , 2006)
AT4G14200.1	PPR	Codifica para Pentatricopeptide repeat (PPR). Son secuencias blanco de siRNA secundarios.	(Nishimura <i>et al.</i> , 2012)
AT5G23570.1	SGS3	Interactúa con RDR6	(Axtell <i>et al.</i> , 2006)
AT5G43810.1	AGO10	Asociado con DCL1 y DCL4 para producir miRNAs y 21-nt siRNAs.	(Curtin <i>et al.</i> , 2008)

CIRP

AT1G08060.1	MOM1	Involucrado en la regulación transcripcional de la cromatina, interviniendo en los cambios epigenéticos.	(Rowe <i>et al.</i> , 2013)
AT1G09700.1	DRB1	Interactúa con DCL1 para producir miRNAs	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2005)
AT3G22680.1	DRM1	Forma un complejo con DMS3 y DRD. Este complejo es denominado DDR y es requerido por la polimerasa V, además de estar relacionado con la metilación del DNA.	(Rowe <i>et al.</i> , 2013)
AT3G42670.1	CLSY1	Involucrado en la remodelación de la cromatina, posiblemente interactúa entre NRPD1 y RDR2 para producir siRNAs y amplificar el silenciamiento por transgenes.	(Pooggin, 2013)
AT4G11130.1	RDR2	Importante para DRM, junto con DCL3 produce ciertos siRNAs.	(Axtell <i>et al.</i> , 2006)
AT4G19020.1	CMT2	Está implicado en el mantenimiento de la metilación de los sitios CHH, por H3K9me2.	(Saze <i>et al.</i> , 2012)
AT5G04940.1	SUVH1	Involucrado en el control epigenético de expresión de genes y actúa como una histona metiltransferasa	(Pontes <i>et al.</i> , 2009)
AT1G01370.1	CENH3	Involucrado en la unión de DNA, la replicación inicial del DNA, el silenciamiento de la cromatina por RNAs pequeños y la metilación de la histona H3-K9.	(Raja <i>et al.</i> , 2008)

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio proporcionan evidencia de que ambas construcciones, CIRT y CIRP, son altamente eficientes para suprimir la multiplicación de PepGMV y pueden ser una plataforma en la exploración del control de la infección de PepGMV y otras especies geminivirales relacionadas o involucradas en infecciones mixtas.

Dichos resultados coinciden con otros grupos de estudio del RNAi, como el sistema de control a enfermedades virales (Tenllado *et al.*, 2004), donde se emplean secuencias

100% homólogas a las utilizadas en el transgen (sistema de protección), obteniendo el reconocimiento homólogo que es altamente eficiente para inducir RNAi. Además, CIRP construcción homóloga muestra una eficacia en la disminución de la acumulación viral del 99.56% (Tabla 9). De hecho, se observó completa inmunidad en la mayor parte de las plantas protegidas, y la acumulación viral se redujo 19.3 veces en CIRT, y 237.3 veces en CIRP con respecto a plantas de control positivo. Con la construcción CIRT heteróloga se obtuvo una eficacia de la reducción de la acumulación viral del 95.6 %.

Estudios previos indicaron que para obtener resultados óptimos con construcciones RNAi heterólogas, la identidad del nucleótido (nt) debía ser de al menos 85% (Benedito *et al.*, 2004). Nuestros resultados de alineamiento de nucleótidos de la secuencia AC1-IR-AV1 de PepGMV y ToChLPV mostraron identidad de 89%. Ribeiro *et al.* (2008) usaron la misma secuencia AC1-IR-AV1, pero del virus *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), obteniendo resultados exitosos en la disminución de síntomas virales. Esta secuencia utilizada contiene la región IR, la cual se ha reportado como una región susceptible a la metilación por ser rica en CG; además, contiene iterones, donde la metilación de estos elementos regulatorios podría tener como consecuencia la inactivación de las moléculas virales (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2010). Asimismo, esta secuencia incluye una región del gen AV1, que codifica para la proteína de la cubierta, la cual es altamente conservada entre begomovirus (Brown, 2001).

Como resultado de los alineamientos entre la secuencia AC1-IR-AV1 de PepGMV y ToChLPV encontramos dos regiones de 22 nt de largo, con 100% de similitud: una con el 96% y tres con el 82% (Figura 23). En la región parcial del gen AC1 encontramos tres regiones de ≈ 24 nt de longitud (Figura 23) que tienen 82% de homología en ToChLPV y PepGMV. El éxito en el uso del gen AC1 es que se dirige específicamente al gen de la replicasa, con la consiguiente repercusión en la replicación del DNA viral (Chellappan, *et al.*, 2004).

Para la región del gen AV1 que se utilizó en la construcción, se encontraron dos regiones con ≈ 24 nt. Algunas investigaciones (Duan *et al.*, 2012; Kumar y Sarin, 2013) han demostrado que las construcciones con la secuencia parcial o total de AV1 pueden inducir la respuesta de silenciamiento. Según lo mostrado, la homología de estas regiones

puede ser suficiente para desencadenar una reducción efectiva de los niveles de expresión de la enfermedad y la acumulación de DNA viral, y con ello generar reconocimiento entre CIRT construcción heteróloga a PepGMV.

Los resultados anteriores, junto con los publicados por otros investigadores (Chellappan *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2004; Abhary *et al.*, 2006; Riberiro *et al.*, 2008; Vanitharani *et al.*, 2005), se suman a la conclusión de que una fuerte protección cruzada puede ser inducida por transgenes con secuencias AC1, IR o AV1, probablemente la producción de una alta población de siRNAs derivados de la actividad de DCL3 modifican los procesos de metilación, el cual se considera el principal mecanismo de las defensas antivirales a través del silenciamiento génico transcripcional (Raja *et al.*, 2010).

Otra opción que se observó es que estos RNAs pequeños pueden generar de nuevo una dsRNA que entrará de nuevo al mecanismo, manteniéndolo activo y haciéndolo más específico, por lo que se puede conferir reconocimiento no solo a las secuencias homólogas, sino a las heterólogas (virus relacionados, aunque este proceso puede ser más tardado que el de reconocimiento de secuencias homólogas) (Chellappan *et al.*, 2004). Es por ello que tal vez los síntomas pueden ser visibles en las plantas protegidas con la construcción CIRT, la cual mostró una eficacia relativamente baja para reducir la gravedad de los síntomas y la incidencia, aunque una alta eficacia en la reducción del DNA viral. Esto se puede explicar porque la severidad de la enfermedad se calcula con valores cualitativos y, por lo tanto, es de alguna manera subjetiva.

La incidencia calculada con presencia y ausencia de transcritos virales, a través de PCR convencional, es también cualitativa porque no sabemos qué cantidad de transcritos existe, y por el fundamento de la técnica, la presencia de un solo transcrito permitirá la amplificación de una banda con cierto valor de intensidad de la señal, por lo que los resultados, a menudo, conducen a subestimar diferencias cuantitativas (Lipp *et al.*, 2005).

qPCR es una herramienta valiosa en la comparación de construcciones homólogas y heterólogas, ya que no sólo puede cuantificar la acumulación de DNA viral, sino que también puede correlacionar más precisamente la carga viral y la gravedad de los síntomas (Chellappan *et al.*, 2005). Este punto es muy interesante para seguir evaluando y

estudiando, ya que una correlación de estos datos, junto con la acción, a lo largo del tiempo brindará una comprensión más amplia de este sistema.

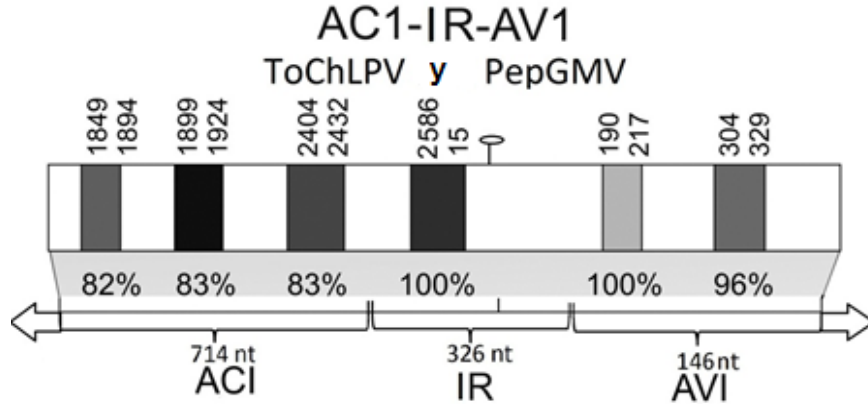


Figura 23. Alineamiento de la región AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV. Seis regiones se resaltan a lo largo de la secuencia indicando la ubicación, el tamaño del fragmento y el porcentaje de homología.

Para verificar que el mecanismo de silenciamiento génico esté activado, se hizo un análisis de la expresión diferencial del transcriptoma del hospedero por efecto de las construcciones CIRT y CIRP, como mecanismo de protección; este análisis reveló la expresión de algunos componentes clave de la vía de RNAi implicada en la formación de siRNAs virales primarios y secundarios. Estos componentes de RNAi causan cambios en la conformación de la cromatina local y en la regulación epigenética que resultan en el silenciamiento de genes (Raja *et al.*, 2008). El silenciamiento génico puede ser activo por tres formas básicas: post-transcripcional silenciamiento génico (PTGS), que se da a nivel del citoplasma, mediado por pequeños RNAs de interferencia (siRNAs); silenciamiento génico transcripcional (TGS), presente en el núcleo y activado por la metilación; y el silenciamiento mediado por microRNAs (miRNAs).

Los componentes clave requeridos para la vía de la inmunidad antiviral se han identificado en organismos eucariotes (Duan *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran la sobreexpresión de componentes involucrados en el sistema (Tabla 9). Estos componentes tienen roles clave que indican cómo cada sistema de protección, por su naturaleza, actúa de forma distinta; por ejemplo, en la construcción con secuencias

homólogas (CIRP) a PepGMV se encuentra sobre regulado Pol V, la cual interactúa con RDM1 y RDR2 para generar dsRNA, que se corta en fragmentos de 24 nucleótidos para generar siRNAs. Éstos son guiados de nuevo por DRM2 para la metilación de novo de DNA, donde interactúa con CLASSY1 y DRD1, generando siRNAs virales secundarios (Ding, 2010), mismos que también pueden causar modificaciones de las histonas.

La Figura 24 muestra una representación gráfica de la ruta presentada para la metilación de *A. thaliana*, con la cual podemos comparar que nuestro sistema CIRP, directamente, tiene efecto en la metilación del DNA viral, impidiendo la transcripción del mismo. Otra de las moléculas encontradas en este sistema es MOM1, que junto con RDM, actúa en los niveles de metilación del DNA en la H3K9 por H3K9me2 (Du *et al.*, 2012). La metilación directa o indirecta provoca cambios en la conformación de la cromatina local, que resulta en el silenciamiento de genes.

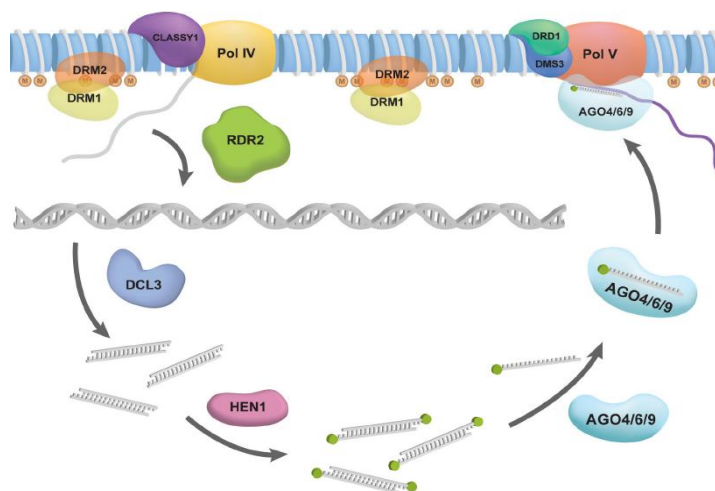


Figura 24. Ruta del RNAi usada en la metilación de DNA. Pol IV en interacción con CLASSY1 transcribe una cadena sencilla; RDR2 transcribe una dsRNA, que es cortada por DCL3; los siRNAs generados son metilados por HEN1 y llevados por AGO a Pol V, donde DRD1 y DMS3 buscan regiones no codificantes que, con ayuda de DRM2, son metiladas. Tomado de Willmann *et al.*, 2011.

Con relación a CIRT, encontramos sobre regulado PPR, que son secuencias blanco para siRNAs (*TAS2(+)* and *TAS1a(+)*). Estos fragmentos son estabilizados y protegidos de la degradación por SGS3; posteriormente, RDR6 produce una cadena complementaria de siRNAs secundarios o siRNAs “transitivos”, a partir de los siRNAs primarios. Este

proceso mejora la respuesta de silenciamiento y envía la información entre células y a todo el organismo. Hanley-Bowdoin *et al.* (2013) muestran un diagrama donde encontramos las moléculas de la ruta del RNAi que se encuentran sobre regulados en las plantas protegidas con CIRT, lo cual indica que ésta es la ruta asociada con los siRNAs secundarios (Figura 25). De igual forma, se observaron cambios en el patrón de expresión en la actividad metiltransferasa en CIRT, que es más fuerte que CIRP. La sobreexpresión de SUVH5, junto con CTM3, mantiene la metilación de H3K9 (Du *et al.*, 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de algunos de los componentes clave en las diferentes rutas del RNAi o regulación epigenética proporciona evidencia de que CIRT y CIRP brindan protección frente a la infección de PepGMV.

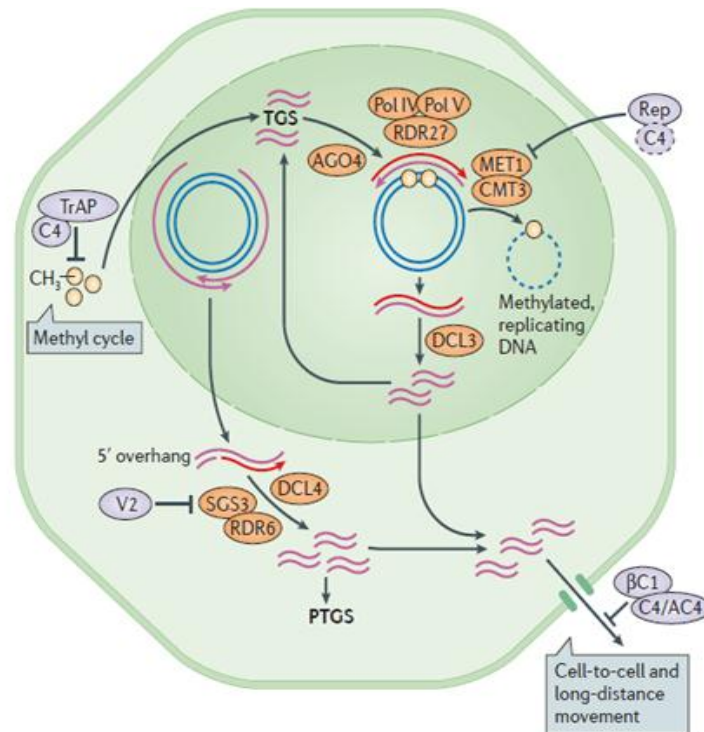


Figura 25. Modelo especulativo de RDR asociado a siRNAs secundarios. Se observa cómo a partir de una cadena sencilla SGS y RDR6 se genera una dsRNA, donde DCL4 genera siRNAs que pueden moverse de célula en célula. Tomado de Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013.

Los resultados obtenidos en la eficiencia de la construcción CIRP, en la disminución de la severidad de síntomas y de acumulación de DNA viral, así como la sobreexpresión de

componentes clave de RNAi, muestran claramente que las secuencias homólogas al virus retado activan de manera eficiente un mecanismo de silenciamiento de genes a nivel TGS o PTGS. Sin embargo, a lo largo de este estudio se ha demostrado que la construcción CIRT con secuencia heteróloga al virus retado disminuye eficientemente la acumulación viral, y activa por diferentes vías a los componentes presentes en el mecanismo de RNAi, logrando la reducción de la infección de PepGMV.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvieron dos construcciones tipo intron hairpin (ihpRNA) usando la secuencia AC1-IR-AV1 de ToChLPV y PepGMV; fueron nombradas CIRT y CIRP, las cuales activan el RNAi.
- ❖ La evaluación de la eficiencia de CIRT y CIRP mostró que la severidad de los síntomas en plantas de *N. benthamiana* infectadas con PepGMV y protegidas con CIRP disminuyó en 80% y para CIRT los síntomas disminuyeron en 45%.
- ❖ CIRP y CIRT disminuyeron la acumulación viral en 99.56% y 95.6 %, respectivamente. Lo anterior demuestra la eficiencia de las construcciones generadas en este trabajo.
- ❖ La comparación del estudio del transcriptoma en la disminución de severidad y carga viral por efecto de CIRT y CIRP, puso en evidencia que la eficiencia de las construcciones fue por la activación del silenciamiento génico, ya que se encontraron sobre regulados genes que codifican para componentes claves en la ruta del RNAi.
- ❖ Aunque la activación del sistema RNAi puede darse por diferentes rutas, este estudio muestra que la construcción CIRT que contiene secuencias heterólogas al virus inoculado utiliza la ruta que activa siRNAs secundarios.
- ❖ CIRP muestra sobre regulados los componentes vía de metilación de ADN dirigida por siRNAs primarios.
- ❖ La respuesta defensiva de las plantas al ataque de un patógeno implica cambios en la transcripción de numerosos genes. En esta investigación se observó que se activaron algunos relacionados con los mecanismos de defensa en las interacciones planta-

patógeno, como la respuesta hipersensible (HR), la resistencia sistémica adquirida (SAR), muerte celular programada, entre otros.

- ❖ Estos componentes de resistencia serán posteriormente estudiados para relacionarlos con los del sistema RNAi.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ El presente estudio sienta las bases para futuros trabajos de investigación que, seguramente, ayudarán a comprender y demostrar la eficiencia de construcciones con secuencias heterólogas al virus retado.
- ❖ El análisis de una correlación tiempo, severidad de síntomas y carga viral permitirá demostrar si visualmente la planta logra aumentar su recuperación de los daños foliares y mantener resistencia por efecto del RNAi, a través de su diferentes etapas fenológicas.
- ❖ El estudio de siRNAs generará información de gran interés para identificar componentes necesarios para el proceso RNAi.
- ❖ El estudio del interactoma (transcriptoma-siRNAs–proteoma) permitirá comprender las interacciones hospedero-patógeno-RNAi, que a su vez aportarán información en la elucidación de mecanismos del RNAi y en la biotecnología del control de enfermedades mixtas begomovirales.
- ❖ En el futuro es recomendable evaluar este sistema en plantas de cultivo de interés agrícola que presentan problemas de enfermedades mixtas begomovirales.

11. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. 5th ed. 968.
- Alba, R., Z. Fei, P. Payton, Y. Liu, S. Moore, P. Debbie, J. Giovannoni. 2004. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *The Plant Journal*. 39(5):697-714.
- Allie, F., M. Rey. 2013. Transcriptional alterations in model host, *Nicotiana benthamiana*, in response to infection by South African cassava mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*. 137(4):765-785.
- Anaya-López, J. L., E. Pérez-Mora, I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, C. I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, R. F. Rivera-Bustamante. 2005. Inducible gene expression by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. *Canadian journal of plant pathology*. 27(2):276-282.
- Ascencio-Ibáñez, J. T., R. Sozzani, T. J. Lee, T. M. Chu, R. D. Wolfinger, R. Cella, L. Hanley-Bowdoin. 2008. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*. 148(1):436-454.
- Bejarano, E. R., C. P. Lichtenstein. 1994. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant molecular biology*. 24(1):241-248.
- Benedito, V., P. Visser, G. Angenent, F. Krens. 2004. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet. Mol. Res.* 3:323-341.
- Brown J, A. Idris, I. Torrez-Jerez, G. Banks, S. Wyatt. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch Virol*. 146:1581-1598.
- Cárdenas-Conejo Y., G. Argüello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernández-González, V. Lebsky, J. Holguín-Peña, D. Medina-Hernández, S. Vega-Peña. 2010. First report of Tomato yellow leaf curl virus co-infecting pepper with Tomato chino La Paz virus in Baja California Sur, Mexico. *Plant Dis*. 94:1266.

- Carrillo-Tripp, J., E. Lozoya-Gloria, R.F. Rivera-Bustamante. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*. 97:51-59.
- Chellappan, P., M. V, Mason, R. Vanitharani, N. J.Taylor, C. M. Fauquet. 2004. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant molecular biology*. 56(4): 601-611.
- Chellappan, P., R. Vanitharani, C. M. Fauquet. 2004. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J. Virol*. 78:7465-7477.
- Cox, K. M., J. D. Sterling, J. T. Regan, J. R., Gasdaska, K. K. Frantz, C. G. Peele, L. F. Dickey. 2006. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature biotechnology*. 24(12):1591-1597.
- Dardick, C. 2007. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Molecular plant-microbe interactions*. 20(8):1004-1017.
- Ding, S. W., O. Voinnet. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3):413-426.
- Ding, S. W. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*. 10(9):632-644.
- Du, J., X. Zhong, Y. V. Bernatavichute, H. Stroud, S. Feng, E. Caro, S. E. Jacobsen. 2012. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell*. 151(1):167-180.
- Duan, C., C. Wang, H. Guo. 2012. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*. 3 (1):5.
- Eagle, P. A., B. M. Orozco, L. Hanley-Bowdoin. 1994. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *The Plant Cell Online*. 6(8):1157-1170.
- Eagle, P. A., L. Hanley-Bowdoin. 1997. Cis-elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of virology*. 71(9):6947-6955.

- Eamens, A., S. J. Curtin, P. M. Waterhouse. 2010. RNA Silencing in Plants. In *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*. 277-294.
- Elmer, J. S., L. Brand, G. Sunter, W. E. Gardiner, D. M. Bisaro, S. G. Rogers. 1988. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic acids research*. 16(14):7043-7060.
- Fauquet, C. M., J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of virology*. 150(10):2151-2179.
- Fauquet, C. M., R. W. Briddon, J. K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini, X. Zhou, 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of virology*. 153(4):783-821.
- Fontes E. P., P. A. Eagle, P. S. Sipe, V. A. Luckow, L. Hanley-Bowdoin. 1994a. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J.Biol.Chem*. 269 (11):8459-8465.
- Fontes E. P., H. J. Gladfelter, R. L. Schaffer, I. T. Petty, L. Hanley-Bowdoin. 1994b. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*. 6 (3):405-416.
- Gámez-Jiménez C. P. 2007. Identificación y caracterización molecular del Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) y otros begomovirus asociados al cultivo de tomate en Sinaloa. Tesis. CIIDIR-IPN. Sinaloa.
- Garzón-Tiznado, J. A., G. Acosta-García, I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, R. F. Rivera-Bustamante, V. Maya-Hernández, R. G. Guevara-González. 2002. Presencia de los Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile variante Tamaulipas (TPV-T), y Chino del Tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:45-52.
- Gharsallah C., F. Gorsane, M. Nakhla, M. Salus, C. Martin, D. Maxwell, M. Marrakchi, H. Fakhfakh. 2008. Evaluation of two gene-silencing constructs for resistance to tomato yellow leaf curl viruses in *Nicotiana benthamiana* plants. *Acta virol*. 52:143-149.

- González-Pérez, J. L., M. C. Espino-Gudiño, I. Torres-Pacheco, R. G. Guevara-González, G. Herrera-Ruiz, V. Rodríguez-Hernández. 2011. Quantification of virus syndrome in chili peppers. *African Journal of Biotechnology*. 10(27):5236-5250.
- Guevara-González R. G., P. L. Ramos, R. F. Rivera-Bustamante. 1999. Complementation of Coat Mutants of Pepper Huasteco Geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*. 89(7):540-545.
- Gutiérrez, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56(3-4):313-329.
- Haber, S., M. Ikegami, N. B. Bajet, R. M. Goodman. 1981. Evidence for a divided genome in bean golden mosaic virus, a geminivirus. *Nature*. 289:324-326.
- Haible, D., S. Kober, H. Jeske. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of virological methods*. 135(1):9-16.
- Hanley-Bowdoin L., S. B. Settlege, B. M. Orozco, S. Nagar, D. Robertson. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem. Mol. Biol.* 35(2):105-140.
- Hanley-Bowdoin, L., E. R. Bejarano, D. Robertson, S. Mansoor. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*. 11(11):777-788.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature*. 418 (6894):244-251.
- Hanssen, I. M., H. P. Van Esse, A. R. Ballester, S. W. Hogewoning, N. O. Parra, A. Paeleman, B. P. Thomma. 2011. Differential tomato transcriptomic responses induced by pepino mosaic virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiology*. 156(1):301-318.
- Harrison, B. D. 1985. Advances in Geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology*. 23(1):55-82.
- Hehnle, S., C. Nawaz-ul-Rehman Wege, H. Jeske. 2004. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *Journal of virology*. 78(14):7698-7706.

- Herr, A. J., D. C. Baulcombe. 2004. RNA silencing pathways in plants. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 69:363-370.
- Höfer P., I. D. Bedford, P. G. Markham, H. Jeske, T. Frischmuth. 1997a. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*. 236(2):288-295.
- Holguín-Peña R. J., G. R. Argüello-Astorga, J. K. Brown, R. F. Rivera-Bustamante. 2006. A new strain of Tomato chino La Paz virus associated with a leaf curl disease of tomato in Baja California Sur, Mexico. *Plant Dis*. 90:973.
- Holguín-Peña R. J., L. G. Hernández-Montiel, H. Latisnere-Barragán. 2010. Identification and geographical distribution of *Bemisia tabaci* Gennadius and its relationship with begomovirales diseases in tomato (*Solanum lycopersicum* L) in the Baja California Peninsula, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:58-60.
- Hormuzdi, S. G., D. M. Bisaro. 1993. Genetic analysis of beet curly top virus: evidence for three virion sense genes involved in movement and regulation of single- and double-stranded DNA levels. *Virology*. 193(2):900-909.
- Jeske, H., M. Lütgemeier, W. Preiß. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *The EMBO journal*. 20(21):6158-6167.
- Jeske, H. 2007. Replication of geminiviruses and the use of rolling circle amplification for their diagnosis. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus. Disease*. Springer Netherlands. 141-156.
- Karimi M., D. Inze, A. Depicker. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*- mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 7:193-195.
- Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T. A. Holton, M. Karan, Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant and cell physiology*. 48(11):1589-1600.
- Krake L., A., I. D. Rezaian. 1998. Expression of the Tomato leaf curl geminivirus C4 gene produces virus like symptoms in transgenic plants. *Mol.Plant Microbe Interact*.

11:413-417.

- Kumar, A., N. B. Sarin. 2013. RNAi: A Promising Approach to Develop Transgenic Plants Against Geminiviruses and Insects. *J Plant Physiol Pathol.* 1(1):2.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Crit Rev Plant Sci* 11:327-349.
- Lebsky V., J. A. Hernández-González, G. Argüello-Astorga, Y. Cárdenas-Conejo, A. Poghosyan. 2011. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology.* 64:55-56.
- Lewis, B. 2004. *Genes VIII.* PEARSON Prentice Hall. 1006.
- Lin C. Y., H. M. Ku, W. S. Tsai, S. K. Green, F. J. Jan. 2011. Resistances to a DNA and a RNA virus in transgenic plants by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic Res.* 20:261-270.
- Lipp, M., R. Shillito, R. Giroux, F. Spiegelhalter, S. Charlton, D. Pinero, P. Song. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *J. AOAC Int.* 88:136-155.
- Liu, Q., S. P. Singh, A. G. Green. 2002. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant physiology.* 129(4):1732-1743.
- Lomonosoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual review of phytopathology.* 33(1):323-343.
- Mackay I., K. Arden, E. Nitsche. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30:1292-1305.
- Martínez, A. K. 2008. Caracterización molecular de un nuevo begomovirus del tomate en el valle del Cauca y búsqueda de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Mason, G., P. Caciagli, G. Accotto, E. Noris. 2008. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *J. Virol. Methods.* 147:282-289.

- Mauricio-Castillo, J. 2006. Métodos moleculares que potencian el descubrimiento de nuevas especies de begomovirus y la detección de infecciones mixtas. Tesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Morales, F. J., P. K. Anderson. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of virology*. 146(3):415-441.
- Morales, F. J. 2010. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer Netherlands. 283-318.
- Mubin M., Hussain M., Briddon R. W., Mansoor S. 2011. Selection of target sequences as well as sequence identity determine the outcome of RNAi approach for resistance against cotton leaf curl geminivirus complex. *Virology*. 8:122-130.
- Nagar S., T. J. Pedersen, K. M. Carrick, L. Hanley-Bowdoin, D. Robertson. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*. 7(6):705-719.
- Napoli, C., C. Lemieux, R. Jorgensen. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell Online*. 2(4):279-289.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S., C. M. Fauquet. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*. 583(12):1825-1832.
- Nicot N., J. F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*. 56:2907-2914.
- Orozco, B. M., L. Hanley-Bowdoin. 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of virology*. 70(1):148-158.
- Pacheco, R., A. García-Marcos, A. Manzano, M. G. de Lacoba, G. Camañes, P. García-Agustín, F. Tenllado. 2012. Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(5):709-723.

- Padidam, M., R. N. Beachy, C. Fauquet. 1995. Classification and Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*. 76(2):249-263.
- Péréfarres, F., M. Hoareau, F. Chiroleu, B. Reynaud, J. Dintinger, J. Lett. 2011. A novel synthetic quantification standard including virus and internal report targets: application for the detection and quantification of emerging begomoviruses on tomato. *Virolog. J.* 8:1-9.
- Pierce, E. J., M. C. Rey. 2013. Assessing global transcriptome changes in response to South African cassava mosaic virus infection in susceptible *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*. 8(6):67534.
- Polston, J. E., P. K. Anderson. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81(12):1358-1369.
- Poogin, M. M. 2013. How Can Plant DNA Viruses Evade siRNA-Directed DNA Methylation and Silencing? *International journal of molecular sciences*. 14(8):15233-15259.
- Postnikova, O. A., L. G. Nemchinov. 2012. Comparative analysis of microarray data in *Arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virolog. J.* 9:101.
- Raja, P., B. C. Sanville, R. C. Buchmann, D. M. Bisaro. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol*. 82:8997-9007.
- Raja, P., J. N. Wolf, D. M. Bisaro. 2010. RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 1799(3):337-351.
- Rensink, W. A., C. R. Buell. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in plant science*. 10(12):603-609.
- Rentería-Canett I, B. Xoconostle-Cázares, R. Ruiz-Medrano, R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virolog. J.* 8:104.

- Ribeiro, S., H. Lohuis, R. Goldbach, M. Prins. 2007. Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *J Virol.* 81:1563-1573.
- Rodoni, B. 2009. The role of plant biosecurity in preventing and controlling emerging plant virus disease epidemics. *Virus research.* 141(2):150-157.
- Rodríguez-Negrete, E. A., J. Carrillo-Tripp, R. F. Rivera-Bustamante. 2009. RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of virology.* 83(3):1332-1340.
- Rojas, M. R., R. L. Gilbertson, D. P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease.* 77(4):340-347.
- Rojas, M. R., H. Jiang, R. Salati, B. Xoconostle-Cázares, M. R. Sudarshana, W. J. Lucas, R. L. Gilbertson. 2001. Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology*, 291(1): 110-125.
- Rojas, M. R., C. Hagen, W. J. Lucas, R. L. Gilbertson. 2005. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43. 361-94.
- Saunders, K., A. Lucy, J. Stanley. 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic acids research.* 20(23):6311-6315.
- Seal S., F. Vanden Bosch, M. J. Jeger. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Crit Rev Plant Sci.* 25:23-46.
- Settlage, S. B., R. G. See, L. Hanley-Bowdoin. 2005. Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. *Journal of virology.* 79(15):9885-9895.
- Soosaar, J. L., T. M. Burch-Smith, S. P. Dinesh-Kumar. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology.* 3(10):789-798.

- Stanley, J., T. Frischmuth, S. Ellwood. 1990. Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(16):6291-6295.
- Stenger, D. C., G. N. Revington, M. C. Stevenson, D. M. Bisaro. 1991. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(18):8029-8033.
- Sunter, G., D. M. Bisaro. 1997. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*. 232(2):269-280.
- Sung, Y. K., R. H. Coutts. 1996. Potato yellow mosaic geminivirus AC2 protein is a sequence non-specific DNA binding protein. *FEBS Lett*. 383(1):51-54.
- Tenllado, F., J. R. Díaz-Ruiz. 2001. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J Virol*. 75:12288-12297.
- Tenllado, F., C. Llave, J. R. Diaz-Ruiz. 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res*. 102:85-96.
- Terns, M. P., R.M. Terns. 2011 . CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion in microbiology*. 14(3):321-327.
- Turnage, M. A., N. Muangsan, C. G. Peele, D. Robertson. 2002. Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. *Plant J*. 30:107-114
- Van Regenmortel, M. H., C. M. Fauquet. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego.
- Vander Plank, E. J. 1963. Plants diseases: Epidemiology and control. New York: academia press. 69.
- Vanitharani, R., P. Chellappan, J. S. Pita, C. M. Fauquet. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology*. 78(17):9487-9498.
- Vanitharani, R., P. Chellappan, C. Fauquet. 2005. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci*. 10:144-151.

- Voinnet, O., Y. M. Pinto, D. C. Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(24):14147-14152
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang, T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*. 411(6839):834-842
- Waterhouse, P. M., C. A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*. 4(1),29-38.
- Whitham, S. A., C. Yang, M. M. Goodin. 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular plant-microbe interactions*. 19(11):1207-1215.
- Willmann, M. R., M. W. Endres, R. T. Cook, B. D. Gregory. 2011. The functions of RNA-dependent RNA polymerases in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*. 9:2-20.
- Wyatt S., Brown J. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 86:1288-1293.

12. ANEXOS

ANEXO 1

DISEÑO DE CONSTRUCCIONES

Amplificación de la región AC1-IR-AV1 con sitios *attB*

El primer paso fue añadir a los productos de interés, sitios terminales *attB*, usando oligonucleótidos que contienen 25pb.

Diseño de primer con adaptadores que amplifican la región de la IR y el gen AV1.

Primer	Primer sequence (5'-3')
AC1048attB1	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGRTTDGARRCATGHGTACATGG'
AV494 attB2	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCYATR TAYAGRAAGCCMAGG'
PAL 1v1978attB1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACATYGTCTTYCCNGG'
PAR 1c496attB2	5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG-3'

Para la amplificación de los fragmentos de interés se usó Taq DNA Phusion® High-Fidelity PCR. La reacción se lleva a un volumen final de 25 µl.

Solución	Concentración	Microlitros
H ₂ O para PCR		17.8
Buffer PCR 1	10X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1
dNTP Mix	10 mM	0.5
Primer de anclaje	10 µM	1
Primer aleatorio	10 µM	1
cDNA		1
Taq		0.2

Las condiciones de amplificación fueron de un periodo inicial de desnaturalización de 30 segundos, a 98 °C, seguido por 35 ciclos comprendidos por una fase de desnaturalización a 98 °C, durante 10 segundos; una fase de alineamiento a 60 °C durante 30 segundos y una fase de elongación a 72 °C, durante 30 segundos. Por último, un periodo final de elongación a 72 °C, durante 10 minutos. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 97000 y la cantidad e integridad de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

Clonación de AC1-IR-AV1 en el vector de entrada

Una vez obtenidos los productos con terminales *attB*, se procedió a clonarlos en un vector de entrada que contiene sitios *attP*, los cuales son reconocidos por la enzima BP clonasa II.

Reacción de ligación para vector de entrada

200-400ng PCR producto

100ng del vector pDONR207

1µl BP Clonase II

Agua hasta un volumen final de 5µl

Se incubó toda la noche a 25°C, para después añadir 0.5µl Proteínasa K (2µg/µl) e incubar a 37°C/15min.

Transformación

2µl de la ligación se transformaron en células electrocompetentes DH5α, para posteriormente sembrar 150 µl en placas con medio LB, utilizando como antibiótico gentamicina (50 µg/ml). Se incubaron a 37 °C toda la noche. Se seleccionaron de 5 a 10 colonias para detectar que tuvieran el fragmento de interés por PCR, empleando los oligonucleótidos específicos. De las colonias positivas se realizó la extracción de plásmido empleando el kit de purificación QIAGEN. De este modo, el vector de entrada puede ser utilizado en diversas herramientas y aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se empleó en vectores de expresión.

Clonación al vector de expresión

El vector pH7GWIWG2(II),0 está diseñado para la expresión en plantas de cadenas dobles de RNA, en forma de hairpin (intron hairpin (ihpRNA), a partir de secuencias de interés clonadas en vectores de entrada; estos vectores de expresión, al ser agroinfiltrados temporalmente, desencadenan eficientemente el mecanismo de PTGS (Karimi, 2002).

Reacción de ligación

300ng del vector pDONR con el inserto de interés

100ng del vector de destino pH7GWIWG2(II),0

1µl LR Clonasa II

Agua volumen final de 5µl

Se incubó toda la noche a 25°C y, posteriormente, se añadió 0.5µl Proteinasa K (2µg/µl) e incubó a 37°C/15min.

Transformación

2µl de la ligación se transformaron en células electrocompetentes DH5α (según el protocolo) y 150 µl se sembraron en placas de LB con streptomicina (50 µg/ml), y se incubaron a 37 °C toda la noche. Se seleccionaron de 5 a 10 colonias para detectar que tuvieran el fragmento de interés por PCR, empleando los oligonucleótidos específicos. De las colonias positivas por PCR se realizó la extracción de plásmido, empleando el kit de purificación QIAGEN.

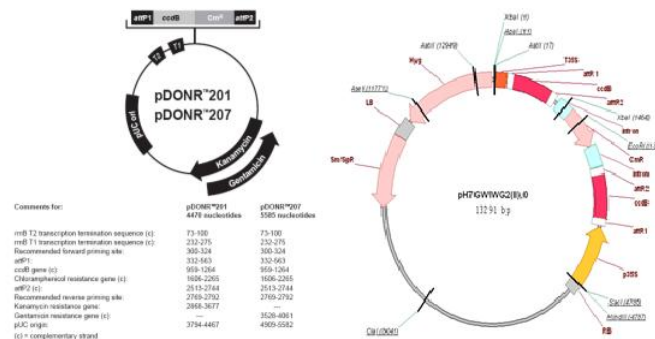


Figura 1S. Mapa del Vector pDONOR 201 indicando el sitio de clonación y el gen de resistencia a gentamicina. Mapa del vector de expresión pH7GWIWG2(II),0.

Comprobación de las secuencias de interés

El vector de expresión ahora contiene la secuencia de interés en sentido y antisentido, pero para conocer la orientación correcta en la que nuestro gen de interés formará la horquilla (hairping) dentro del vector, se digiere el plásmido con la enzima *XbaI*.

Reacción de digestión

1 μ l Buffer 10X

500 ng DNA

0.5 μ l *XbaI*

10 μ l Vf. Agua

Incubar 1.5 horas, a 37⁰C o toda la noche a temperatura ambiente

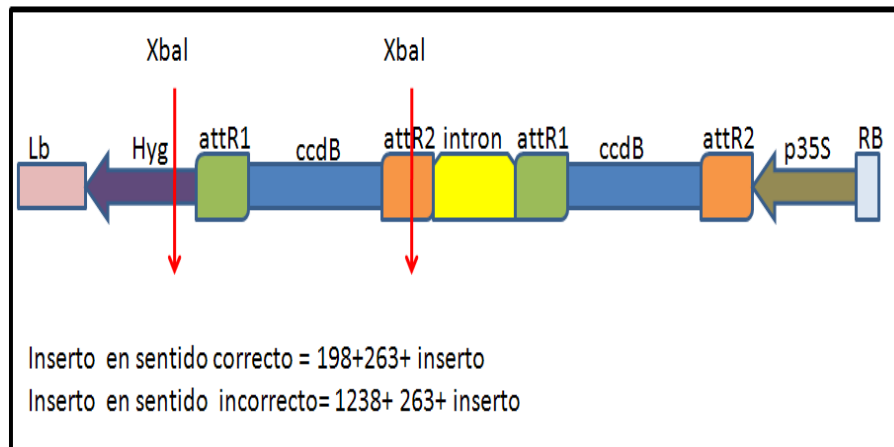


Figura 2S. Secuencia y dirección de los genes del vector de expresión, donde el corte con la enzima *XbaI* marca el tamaño correcto del fragmento y la dirección correcta del mismo.

ANEXO 2

INSERCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN LA PLANTA

Transformación en *Agrobacterium tumefaciens* y agro infiltración

A una alícuota de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (200 μ l), sin descongelar, se le añadió 1 μ g de DNA plasmídico o de las construcciones. Se dejó reposar 5 minutos a 37°C y se le añadió 1 ml de LB para incubarlo por 2 hrs, a 28°C. 150 μ l se inocularon en LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28°C por 48 horas.

Se refrescó el cultivo de *agrobacterium* desde el medio con glicerol a una placa con LB y los antibióticos correspondientes (la cepa GV2260 de *agrobacterium* que tiene resistencia a rifampicina). Se creció de 2-3 días, a 28°C. Partiendo de esta placa, se puso un cultivo líquido con LB y los mismos antibióticos en agitación constante a 28°C O/N. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 4500 rpm, durante 10 min, a 4 °C; además se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet en medio de inducción.

Medio de inducción

MgCl ₂ 10mM	2 ml
MES 10mM	2 ml
Acetosiringona 150 μ M	300 μ l
H ₂ O	
Total	200 ml

Se ajustó el cultivo a una densidad óptica D.O. de ≈ 0.5 a $\lambda=600$ nm, añadiendo el medio de inducción necesario. Se dejó induciendo de 3-6 horas a temperatura ambiente. Cabe señalar que cada cultivo debe de inducirse de manera independiente.

ANEXO 3

EXTRACCIÓN DNA (MÉTODO CTAB)

Se pesaron 0.5 gr de tejido fresco y se añadió 300µl de Buffer CTAB (el CTAB debe estar a 65 °C y antes de usar, agregar 2% de β-Mercaptoetanol). Se mezcló directamente en el mortero y se alicuotaron 700 µl en tubos eppendorf. Se dejó incubando a 65 °C durante 30 minutos. Se le adicionó igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (700 µl) y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos (25 °C). Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se añadió a cada muestra 1 µl de RNasa I (1U/µl) + 1 µl Buffer 10X. (RNasa Invitrogen). Se incuban las muestras a temperatura ambiente por 15 minutos.

Después, para detener la reacción, se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Finalizada la incubación se transfirieron los tubos a hielo y se adicionó igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (100 µl). se debe homogenizar suavemente por inversión y centrifugar a 13.000 rpm/10 minutos/25 °C.

En esta etapa se unieron todos los sobrenadantes y se transfirieron a un solo tubo eppendorf (aprox. 400 µl; se adicionó 1 ml de isopropanol (-20 °C), se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm/10 minutos/25 °C. Después se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%, y se centrifugó a 13.000 rpm/10 minutos/25 °C. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de mili q. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8%.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de los fragmentos de interés se usó Taq DNA Phusion® High-Fidelity PCR, con los primer degenerados de Wyatt y Brown, (1996), nombrados AC1048-AV494, que amplifican la región AV1de begomovirus. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl.

Solución	Concentración	Microlitros
H ₂ O para PCR		17.8
Buffer PCR 1	10X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1
dNTP Mix	10 mM	0.5
Primer F	10 μM	1
Primer R	10 μM	1
cDNA		1
Taq		0.2

Las condiciones de amplificación fueron de un periodo inicial de desnaturalización de 30 segundos, a 98 °C, seguido por 35 ciclos comprendidos por una fase de desnaturalización a 98 °C, durante 10 segundos; una fase de alineamiento a 55 °C, durante 30 segundos, y una fase de elongación a 72 °C, durante 30 segundos. Por último, un periodo final de elongación a 72 °C, durante 10 minutos. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 97000 y la cantidad e integridad de las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

ANEXO 4

Extracción de RNA total (Método TRIZOL)

El tejido ultracongelado de hojas se pasó a tubos de rosca con perlas de vidrio y porcelana de distintos tamaños, se les agregó 1 mL de TRIZOL, y a cada tubo se le puso aproximadamente 100 mg de tejido. La mezcla fue homogenizada a 6 m/s por 40 s; el homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se pasó a tubos nuevos, a los que se les agregó 200 μL de cloroformo. Consecutivamente, se agitaron por 15 s y se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm por 15 min. Acto seguido, se tomaron ~400 μL de la fase

acuosa y se pasaron a nuevos tubos, agregando 500 μL de isopropanol frío. Las muestras se dejaron incubar por 20 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min. Se decantó el sobrenadante y se le agregó etanol al 70% con agua tratada con DEPC. Después, se centrifugaron a 7,500 RPM por 5 min, se decantó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar ~ 15 min a temperatura ambiente; los pellets fueron resuspendidos en 50 μL de agua tratada con DEPC y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La visualización del RNA total se realizó por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizante. El gel de agarosa se preparó con 87.2 ml con agua tratada con DEPC, 10 mL de buffer MOPS 10X (0.2 M de MOPS, 20 mM de acetato de sodio, 10 mM de EDTA pH 8.0). Para un volumen final de 100 ml, se le agrego 1g de agarosa que se fundió a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se dejó enfriar a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se le agregaron 4 ml de formaldehido al 37% y 10 μL de SYBR Safe DNA gel stain 10,000X. Una vez a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, el gel se colocó en un caster con un peine adecuado y se dejó polimerizar 1 hora. Se tomaron 5 μg de RNA total de cada extracción y se ajustó a un volumen de 9 μL con agua mili Q tratada con DEPC. Estas muestras se dejaron por 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un termobloc, y posteriormente se les agregó 1 μL de buffer LB Orange G 10X (40% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% de xileno de cianol). Una vez pasada la hora, la cámara de electroforesis se llenó con buffer MOPS 1X instalada sobre un baño de hielo; el gel se dejó precorrer sin muestras 15 min a 70 V y las muestras se cargaron los 10 μL de preparado. El gel se dejó correr a 40 V por 3.5 horas, hasta que el colorante había avanzado $\frac{3}{4}$ del gel, el cual se observó en un fotodocumentador con luz ultravioleta.

Cuantificación del RNA y DNA total por métodos espectrofotométricos

El DNA y RNA total se cuantificaron en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000), mismo que se ajustó con 1 μL de agua tratada con miliq y DEPC, respectivamente. Se cuantificaron el DNA y RNA total con un factor de 40, colocando 1 μL de muestra, la cual se leyó a 230 nm, a 260 nm y 280 nm. Finalmente se obtuvieron las relaciones 260/280 y 230/280 para ver la pureza de la extracción.