

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Construcción de un clon sintético de un carlavirus en papaya (*Carica papaya*)

Proyecto de Titulación

Previo la obtención del Título de:

**MAGÍSTER EN BIOCIENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

Presentado por:

Milenka Andreina Vera Cadena

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

A mis padres, por su apoyo incondicional y ejemplo de perseverancia...

A mi familia, por su paciencia y comprensión a lo largo de este camino...

A mis mentores y profesores, por compartirme su conocimiento y guiarme con dedicación y pasión en mi formación académica y profesional...

Y a mí misma, por demostrarme que no existen límites para alcanzar las metas siempre y cuando confíe en mis capacidades...

Agradecimientos

A mi tutor de tesis Diego Quito, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí desde el inicio; por su dedicación, esfuerzo incansable y resiliencia en impulsar la investigación y en la formación de nuevos investigadores.

A mi cotutor de tesis Robert Álvarez Quinto, por su dedicación, paciencia y pasión con la que transmite sus conocimientos; por abrirme las puertas a su laboratorio para realizar gran parte de este proyecto. Su acompañamiento cercano fue clave en mi formación durante esta etapa académica.

A Neil Olszewski, por compartir su conocimiento y experiencia en el desarrollo metodológico de este estudio.

Al equipo del laboratorio de Virología Molecular, por su trabajo y esfuerzo en el desarrollo de las actividades del día a día.

Declaración Expresa

Yo Milenka Andreina Vera Cadena, acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 18 de junio 2025.

Milenka Andreina Vera Cadena

Autor

Evaluadores

Ph.D. María Isabel Jiménez F.

Presidente del Tribunal

Ph. D. Diego Fernando Quito Ávila

Tutor de proyecto

Ph. D. Robert Álvarez Quinto

Cotutor de proyecto

Ph. D. Efrén German Santos Ordoñez

Profesor de Materia

Ph. D. Luis Eduardo Sánchez Timm

Profesor de Materia

Resumen

Se han reportado diversos virus que afectan a la papaya, algunos con alto impacto económico. Mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS) del exudado de látex de plantas de papaya, se detectó un ARN viral con alta homología a miembros del género *Carlavirus*, identificado como *Papaya defective virus 1* (PapDfV1), con 96 % de identidad a nivel de nucleótidos con *Zhejiang betaflexivirus 2* (ZhBV2). El análisis genómico de PapDfV1 reveló una delección extensa en genes relacionados con el movimiento y encapsidación viral. Este estudio aborda por primera vez la construcción de un clon sintético de PapDfV1 para estudiar su infectividad y sintomatología. Se diseñaron fragmentos de PapDfV1 y ZhBV2, con y sin ribozima, y se ensamblaron mediante enzimas de restricción tipo IIS. Los constructos se transformaron en *E. coli* Top 10 y posteriormente en *Agrobacterium tumefaciens* (cepas GV2260 y AGL1). Las plantas hospedantes (judía común, soja, *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis* y papaya) fueron inoculadas mediante dos métodos de agroinoculación. La infectividad se evaluó por reverse-transcription (RT)-PCR y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La adición de ribozima mejoró la infección de ZhBV2 en soja y judía. PapDfV1 no fue infeccioso en ninguna de las plantas inoculadas bajo ningún tratamiento. Los resultados sugieren que PapDfV1 podría requerir virus auxiliares o factores específicos del hospedero para su replicación y movimiento sistémico.

Palabras Clave: *Papaya defective virus 1*, *Zhejiang betaflexivirus 2*, RT-PCR, agroinoculación.

Abstract

*Several viruses affecting papaya have been reported, some with high economic impact. Through high-throughput sequencing (HTS) of latex exudate from papaya plants, a viral RNA with high homology to members of the genus Carlavirus was detected, identified as Papaya defective virus 1 (PapDfV1), with 96 % identity at the nucleotide level with Zhejiang betaflexivirus 2 (ZhBV2). Genomic analysis of PapDfV1 revealed an extensive deletion in genes related to viral movement and encapsidation. This study addresses for the first time the construction of a synthetic clone of PapDfV1 to study its infectivity and symptomatology. Synthetic fragments of PapDfV1 and ZhBV2, with and without ribozyme, were designed and assembled using IIS-type restriction enzymes. The constructs were transformed into *E. coli* Top 10 and subsequently into *Agrobacterium tumefaciens* (strains GV2260 and AGL1). Host plants (common bean, soybean, *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis* and papaya) were inoculated by two agroinoculation methods. Infectivity was evaluated by reverse-transcription (RT)-PCR and transmission electron microscopy (TEM). Addition of ribozyme enhanced ZhBV2 infection in soybean and bean. PapDfV1 was not infective on any of the inoculated plants under any treatment. The results suggest that PapDfV1 may require helper viruses or host-specific factors for replication and systemic movement.*

Keywords: Papaya defective virus 1, Zhejiang betaflexivirus 2, RT-PCR, agroinoculation.

Índice general

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
Capítulo 1.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Descripción del problema.....	2
1.2 Justificación del Problema.....	3
1.3Objetivos.....	3
1.4 Marco Teórico.....	3
Capítulo 2.....	9
2. Metodología.....	10
2.1 Material Vegetal y fuente de virus.....	10
2.2 Diseño de los constructos virales.....	10
2.3Ensamblaje de los constructos virales.....	12
2.4 Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumesfaciens</i>	13
2. 5 Transformación en <i>Escherichia coli</i>	14
2.6 Transformación en <i>Agrobacterium tumesfaciens</i>	14
2.7 Agroinoculación.....	16
2.8 Extracción de ácidos nucleicos.....	16
2.9 RT-PCR.....	17
2.10 TEM.....	19
Capítulo 3.....	21

3.	Resultados y análisis	22
	Construcción de clones PapDfV1 y ZhBV2 que incorporan la ribozima	22
	Infectividad viral de ZhBV2 y PapDfV1	25
	Coinfección de PapDfV1 con virus auxiliares.....	29
Capítulo 4.....		34
4.	Conclusiones y recomendaciones	35
4.1.1	Conclusiones	35
4.1.2	Recomendaciones	35
Referencias.....		37
Apéndice		48

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
CaMV 35s	Cauliflower mosaic virus 35S promoter
CPMMV	Cowpea mild mottle virus
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico transferido desde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a la planta huésped
ARN	Ácido ribonucleico
D-RNA	Defective ribonucleic acid
DI-RNA	Defective interfering ribonucleic acid
HTS	Secuenciación de alto rendimiento
NOS	Nopaline synthase terminator
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV	Radiación ultravioleta
PapDfV1	Papaya defective virus 1
PRSV	Papaya ringspot virus
PSFaV	Papaya sticky fruit-associated virus
ZhBV2	Zhejiang betaflexivirus 2

Simbología

dpi	Días post inoculación
fmol	Fentomol
g	Fuerza centrífuga relativa
ul	Microlitro
uM	Micromolar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molaridad o concentración molar
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MS	Murashige and Skoog medio
N	Normalidad o concentración normal
pH	Potencial de Hidrógeno

Índice de figuras

Figura 1. Infectividad del constructo viral pLX-AS_ ZhBV2 en soja y judía común	23
Figura 2. Infectividad de los constructos virales en <i>Nicotiana occidentalis</i> evaluado mediante RT-PCR.....	26
Figura 3. Crecimiento de plantas de papaya y preparación de medio	51

Índice de tablas

Tabla 1. Ensamblaje de un solo paso (digestión-ligación) usando PaqCI	12
Tabla 2. Mezcla con DNasa para una reacción.....	18
Tabla 3. Mezcla con la transcriptasa reversa (RT) para una reacción	18
Tabla 4. Mezcla de PCR para una reacción	19
Tabla 5. Resultados de RT-PCR de plantas infectadas con PapDfV1 y ZhBV2 a los 21 dpi	25
Tabla 6. Resumen de resultados de RT-PCR de plantas agroinoculadas con pLX-AS_ ZhBV2 y pLX-AS_ PapDfV1 independientemente de la ribozima.....	34
Tabla 7. Cebadores utilizados durante la investigación.....	50

Capítulo 1

1. Introducción

1.1 Descripción del problema

Se han reportado varios virus que infectan a la papaya (*Carica papaya*) y algunos han sido una amenaza económica a nivel mundial (Alcalá-Briseño et al., 2020; Cabrera Mederos et al., 2022; Mumo et al., 2020). Los virus encontrados en papaya en Ecuador son papaya ringspot virus (PRSV), papaya virus Q (PpVQ), papaya virus E (PpVE) y papaya sticky fruit-associated virus (PSFaV) (Quito-Avila et al., 2023a). PpVQ y PSFaV se encontraron en coinfección en plantas de papaya de 2 años en Ecuador con síntomas similares a la enfermedad de la papaya pegajosa “papaya sticky disease (PSD)”. Esta enfermedad presenta síntomas severos después de la floración como un látex oscuro y pegajoso con zonas irregulares de color verde claro en el fruto (Sa Antunes et al., 2020).

Durante la secuenciación del genoma de PSFaV, a partir de exudado de látex a través de la plataforma Illumina, se detectó un ARN viral con homología a genomas pertenecientes a varios miembros del género Carlavirus. El virus putativo se denominó papaya defective virus 1 (PapDfV1). Los análisis genómicos del ARN viral encontrado revelaron variantes genómicas con estructuras novedosas caracterizadas por largas deleciones en los genes responsables del movimiento y encapsidación.

La presencia de estas variantes con deleciones en genes clave plantea interrogantes sobre su capacidad de replicación en infecciones simples y/o mixtas, su papel en la patogenicidad (defectuosos o infecciosos), y su potencial impacto en enfermedades del cultivo de papaya. Actualmente, falta dilucidar si estas variantes contribuyen al desarrollo de síntomas de PSD o si interfieren con la dinámica de infección de otros virus, lo cual dificultaría la implementación de estrategias de diagnóstico y control de enfermedades virales en papaya. En consecuencia, es

necesario estudiar la biología molecular de estas variantes para comprender su comportamiento en el hospedero y posibles aplicaciones biotecnológicas.

1.2 Justificación del Problema

El estudio molecular de estos carlavirus defectuosos, biogénesis y su interacción con el hospedero permite entender su epidemiología y su posible papel en la etiología de la enfermedad PSD. La elucidación de la biología viral de estas variantes podría permitir su aprovechamiento como herramientas potenciales de biocontrol fitosanitario frente a enfermedades virales que afectan a la papaya (Gupta et al., 2023; Ishwara et al., s. f.; Pasin et al., 2018; Tuo et al., 2015, 2021). Este estudio es el primer intento por construir un clon sintético de un carlavirus con una novedosa estructura genómica y evaluar su infectividad, así como los cambios fenotípicos en plantas de papaya, lo que podría sentar las bases para futuras investigaciones en virología vegetal y biotecnología.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General. Construir un clon sintético de un carlavirus en papaya.

1.3.2 Objetivos específicos. A) Desarrollar un constructo viral a partir de fragmentos de ADN sintéticos usando técnicas de clonación molecular. B) Evaluar la infectividad del constructo viral mediante RT-PCR y TEM.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Virus asociados a *Carica papaya*

Carica papaya es una planta herbácea y dicotiledónea que corresponde a la familia Caricaceae. El nombre común de esta especie depende de su distribución geográfica, conociéndocela como papayo, papaya, papayito cimarrón, papaya de pájaro, entre otras (Dotto & Abihudi, 2021). Las plantas crecen prósperamente en climas tropicales y en países cercanos al

Ecuador, con un desarrollo de hasta 10 metros de altura. En 2017, la producción de papaya alcanzó los 13 millones de toneladas métricas, con Brasil y la India como los principales productores, seguidos de República Dominicana, Nigeria, México e Indonesia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020). La producción media anual de papaya en Ecuador sigue incrementándose con un estimado de 50.000 toneladas en la última década (Quito-Avila et al., 2023). Existen varios virus reportados en papaya a nivel mundial. En Ecuador, los virus presentes son papaya virus E (PpVE), papaya virus Q (PpVQ), papaya sticky fruit-associated (PSFaV) y uno de los virus más letales para la industria de la papaya, papaya ringspot virus (PRSV) (Cabrera Mederos et al., 2022; Medina-Salguero et al., 2019; Mumo et al., 2020; Quito-Avila et al., 2023; Sa Antunes et al., 2020).

1.4.2 Propiedades de los Carlavirus y PapDfV1

PapDfV1, recientemente encontrado en papaya, presenta homología a genomas de virus pertenecientes al género Carlavirus, sin embargo, muestra variantes genómicas caracterizadas por extensas deleciones de genes responsables del movimiento intra- e intercelular y de la encapsidación. Los carlavirus (familia Betaflexiviridae) son virus de ARN filamentosos de una sola cadena en sentido positivo con una capa de guanosina en el extremo 5' y un 3' terminal poliadenilado (Carvalho et al., 2017a). Los viriones tienen un tamaño entre 610-700 nm en longitud y de 12-15 nm de diámetro. Su genoma, de un tamaño entre 8.3-8.8 kb, típicamente posee seis marcos abiertos de lectura (ORFs) (Diaz-Lara et al., 2020).

El ORF1 codifica para la proteína replicasa que está compuesta por los siguientes dominios: una metiltransferasa, proteasa similar a papaína, helicasa y polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp). Los ORF2, ORF3 y ORF4 codifican las proteínas que permiten el movimiento intercelular y sistémico del virus denominadas Triple gene block, TGB1, 2 y 3,

respectivamente. Se ha demostrado que TGB2 de algunos carlavirus se localiza en el retículo endoplasmático (ER) y otros en el plasmodesma (PD) (Chou et al., 2013; Ju et al., 2005; Lim et al., 2009; Samuels et al., 2007). El estudio de (Fei et al., 2024) demostró que TGB2 de *ligularia jaluensis* carlavirus (LJCV) se localiza en el plasmodesma y facilita el movimiento intercelular en constructos deficientes de TGB2 PVX-GFP Δ p25. El ORF5 produce la proteína de la cápside (CP) y el ORF6 una proteína rica en cisteína que se une al ácido nucleico (NABP o CRP) (ICTV 9th Report, 2011). Esta última proteína ha sido identificada como un determinante patogénico en *chrysanthemum virus B* y en LJCV (Fei et al., 2024; Zhong et al., 2022) y puede actuar como un factor de transcripción e inducir una respuesta hipersensitiva (Lukhovitskaya et al., 2013). En *potato virus M* (PVM), CRP puede funcionar como un supresor del ARN de silenciamiento (Fujita et al., 2018). Los miembros del género *Carlavirus* son conocidos por transmitirse mecánicamente y la gran mayoría se transmite de forma no persistente mediante vectores como áfidos y mosca blanca (Foster, 1998). A menudo tiene un rango de huésped limitado y pueden inducir síntomas leves a graves que incluyen mosaico y arrugamiento en las hojas hasta necrosis foliar y del tallo, mientras que en algunas ocasiones no se producen síntomas visibles (Hammond et al., 2020).

El tamaño del genoma de PapDfV1 es de 6071 nucleótidos y contiene dos ORFs. ORF1 codifica para una proteína de 211.13 kDa con homología a la polimerasa (RdRp) de varios carlavirus, siendo la de *Zhejiang betaflexivirus 2* (ZhBV2), el más cercano (96% identidad a nivel de aminoácidos). Usando el genoma de ZhBV2, se determinó que el ORF2 es una secuencia quimérica que comprende la parte inicial de TGB1 (189 bp) y la parte final de NABP (166 bp). Es decir, PapDfV1 tiene una delección que comprende parte del TGB1, la secuencia completa de TGB2, TGB3 y CP y la parte inicial de NABP. Es interesante notar, que las

secuencias terminales del genoma de PapDfV1 son idénticas a cowpea mild mottle virus (CPMMV, OK625819) un carlavirus genéticamente cercano a PapDFV1.

1.4.3 ARNs virales defectuosos y ARNs virales defectuosos de interferencia

Los ARNs virales defectuosos (D-RNAs) presentan mutaciones (usualmente grandes deleciones) en su genoma con respecto al genoma del virus parental. Dependen del genoma parental para su replicación y producción de proteínas esenciales. Las polimerasas virales de virus monocatenarios de ARN de cadena positiva suelen ser no procesivas y se disocian rápidamente de la cadena de ARN la cual están copiando, lo cual origina una mayor probabilidad de error durante la replicación. Los ARNs virales de interferencia defectuosos (DI-RNAs) interfieren con la acumulación del virus del cual derivan, generalmente disminuyendo su replicación (Vogt et al., 1999).

Diferentes mecanismos como eventos de recombinación en cis o en trans (cambio de cadena por parte de la ARN polimerasa) generan los D-RNAs y DI-RNAs. Los sitios donde ocurren las deleciones en los D-RNAs dependen de las características de la secuencia como secuencias repetidas en el genoma (se observan en los sitios de unión quiméricos entre las secuencias codificantes donde ocurre la deleción), estructuras secundarias y promotores (identificados en los sitios de unión de las secuencias quiméricas). El genoma de los DI-RNAs están constituidos normalmente de las regiones terminales y secuencias quiméricas codificantes y no codificantes (Huang, 1973).

Estudios han demostrado niveles más altos de los DI-RNAs que del virus parental. Existen varios factores de los DI-RNAs que influyen en la acumulación del virus parental. Se ha establecido que los DI-RNAs pueden competir por el suministro de los productos codificantes generados por el virus del cual derivan, como la RdRp incrementado la replicación de estos DI-

RNAs. El mecanismo de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) puede ser activado por la presencia de los DI-RNAs, debido a que los ARNs de silenciamiento (siRNAs) pueden ser generados por los DI-RNAs y estos últimos no son secuencias objetivas para PTGS. El resultado es la degradación y reducción de la infectividad del virus parental (Simon et al., 2004).

En cuanto a carlavirus con delecciones similares a la observada en PapDfV1, existe un solo estudio donde se encontró una variante del carlavirus Butterbur mosaic virus (ButMV) con una extensa delección del gen TGB1, uno de los genes esenciales en el movimiento celular. Esta variante se encontró en infección mixta con su versión genómica normal y con otro carlavirus *Helenium virus S* (HelVS) (Hammond et al., 2020). El virus de papaya, además de prescindir de los tres genes de movimiento, TGB1, 2, y 3, prescinde del gen de la CP, es decir se escapa de la organización genómica característica de los carlavirus. Estudios previos demostraron mediante secuenciación Illumina, la coexistencia de PapDfV1 con otros virus reportados en papaya como PRSV, PpVE, PpVQ, y PSFaV. No se lo ha encontrado en coinfección con su versión genómica normal, ni con un potexvirus (e.g. virus con similar estructura genómica). Por lo tanto, el desarrollo de un clon viral de estas variantes genómicas es clave para caracterizar funcionalmente al carlavirus encontrado en papaya, comprender su biología y su interacción con su hospedero (Brewer et al., 2018; Pasin, 2022; Shakir et al., 2023).

1.4.4 Clones virales

Un clon viral es una herramienta de ingeniería genética en fitopatología y biotecnología que consiste en introducir el genoma de un virus de ARN o ADN como ADN complementario (ADNc) o ADN respectivamente en un vector binario compatible con bacterias como *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (Brewer et al., 2018). Los sistemas de transcripción *in vitro* e *in vivo* son las dos técnicas básicas utilizadas para crear clones

infecciosos de virus de ARN (Bhat & Rao, 2020). Para utilizar el enfoque *in vitro*, el ADNc viral se inserta bajo el promotor de un ARN polimerasa bacteriófago (normalmente T7, SP6 o T3). Antes de la inoculación mecánica, es necesaria una reacción de transcripción *in vitro* (Bhat & Rao, 2020). Las transcripciones para el enfoque *in vivo* se crean utilizando vectores binarios que contienen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La agroinfiltración, el bombardeo de partículas o el frotamiento sobre las hojas son los tres métodos más utilizados para transfectar clones de ADNc en la transcripción *in vivo* (Pasin, 2022; Shakir et al., 2023; Silva-Rocha et al., 2013). Para los miembros del género Carlavirus, tanto las técnicas *in vitro* como *in vivo* se han utilizado con eficacia (Carvalho et al., 2017; Diaz-Lara et al., 2020; Jordan et al., 2021; Luigi et al., 2023; Villamor et al., 2023).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Material Vegetal y fuente de virus

Se evaluó la infectividad viral y sintomatología en plantas germinadas desde semillas de papaya (*Carica papaya* L.) de la variedad ‘Maradol’, ‘Sunrise’ y ‘Passion Red’, Soja (*Glycine max* L.) ‘LB1858’ y ‘N7004’, judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad ‘Verano’, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana occidentalis* (n=30). Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero o en cámaras de crecimiento (21-32 °C y 14/10 horas día/noche). Como fuente de inóculo se utilizó fragmentos sintéticos (Twist Biosciences, USA) del genoma de PapDfV1 y ZhBV2 basados en las secuencias disponibles en GenBank No. de acceso OR253703 y MW897315, respectivamente.

2.2 Diseño de los constructos virales

Con la finalidad de validar la metodología, además de PapDfV1 (6,071 bp) se ensambló un clon sintético del virus ZhBV2 (8,219 bp) con el cual PapDfV1 comparte el mayor porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos (96%). ZhBV2 no contiene los extremos terminales 5’/ 3’, por lo que se añadió a su genoma los extremos conocidos de PapDfV1. El diseño de los dos constructos se realizó mediante Golden Gate *in silico* desde Geneious prime 2024 1.2.

Se utilizó pLX-AS (Addgene cat. no. 188870) como vector de expresión en *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y células vegetales reportado por (Pasin, 2022). El vector contiene pBBR1 rep, proteína que inicia la replicación que se une y activa el origen de replicación pBBR1 oriV en *E. coli* y *A. tumefaciens* (origen de copia media) y KanR gen de resistencia a la kanamicina. Dentro de la región T-DNA se encuentra el promotor duplicado de 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el gen LacZ flanqueado por sitios de restricción tipo IIS de AarI y SapI (lugar donde se insertó los virus de estudio: ZhBV2 y PapDfV1), NOS:

secuencia terminadora de la nopalina sintasa, terminadores bacterianos que impiden la lectura transcripcional y mejoran la estabilidad del plásmido, y extremos: derecho (RB) e izquierdo (LB). Para cada virus, se desarrolló dos constructos denominados pLX-AS_ZhBV2 y pLX-AS_ZhBV2_Ry, y pLX-AS_PapDfV1 y pLX-AS_PapDfV1_Ry, diferenciándose entre sí por la presencia de la secuencia 5'-

GTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC-3',

correspondiente a la ribozima (Ry) de tobacco ringspot virus satellite RNA (No. De accesoión GenBank. M14879). La presencia de la Ry, localizada después de los 13 nt de la cola de poly-A en el extremo 3', tiene el objetivo de eliminar nucleótidos no virales. Para facilitar el plegamiento y procesamiento de la ribozima, se añadió un tramo de 9 nt de timina aguas abajo de la secuencia de la ribozima. Para evitar la presencia de nucleótidos extra no virales en el extremo 5' del virus, se ubicó el primer nucleótido de las secuencias virales después del último nucleótido del promotor duplicado CaMV 35S.

Para el ensamblaje *in silico*, se buscó los sitios de restricción de AarI (isoesquizómero PaqCI) en la secuencia de ZhBV2 y PapDfV1. Una vez localizados dichos sitios, se reemplazó nucleótidos generando mutaciones silenciosas. Además, se añadió fragmentos externos (sitios de restricción y 'salientes'). Los salientes y fragmentos de alta fidelidad se diseñaron con la herramienta *in silico* de NEBridge SplitSet® Tool (<https://ligasefidelity.neb.com/>) en la que se excluyeron salientes con un 100% GC, palindrómicos y con $\leq 50\%$ de identidad entre ellos. En el programa se definió el número de fragmentos, el tipo y las condiciones del ensamblaje (PaqCI®, 1x tampón T4 DNA Ligase, 37-16 °C, cíclico, 4-bases). Se incluyó los sitios de restricción de AarI al final de cada fragmento. Los salientes más externos fueron GAGG y CCCA,

respectivamente, para que sean compatibles con el vector pLX-AS linealizado por AarI e iniciar la transcripción impulsada por el promotor CaMV 35S en el extremo 5' correcto del virus.

2.3 Ensamblaje de los constructos virales

Se sintetizó los fragmentos del virus utilizando los servicios de Twist Bioscience (California, EE.UU.). Los fragmentos sintéticos fueron ensamblados en un solo paso utilizando la enzima PaqCI (NEW ENGLAND BioLabs, EE.UU.) con la configuración detallada en la Tabla 1 para una sola reacción. Las concentraciones finales de la reacción de ensamblaje se basaron en el estudio realizado por (Pasin, 2022)

Tabla 1

Ensamblaje de un solo paso (digestión-ligación) usando PaqCI

Componente	Concentración final	Cantidad (ul)
Vector pLX-AS	70 fmol	1.5
Fragmentos de ADN sintéticos	70 fmol	6
ATP (10 mM)	1 mM	1.5
T4 ADN ligasa (2000U/ul)	20 U/ul	0.16
Tampón (10X)	1X	1.5
PaqCI primer (20 uM=40X)	1X	0.38
PaqCI (10U/ul)	0.07 U/ul	0.1
Agua ultrapura	-	3.87
Total	-	15

Nota: 70 fmol pLX-AS es equivalente a 200 ng.

Las reacciones se incubaron según las siguientes condiciones: una etapa de 15 min a 37°C, 45 ciclos de 7 minutos cada uno (2 min a 37°C y 5 min a 16°C), seguido de 5 min a 37°C,

y se puso en espera a 16 °C. Para el cálculo de la molaridad se utilizó la herramienta NEBiocalculator (<https://nebiocalculator.neb.com>).

2.4 Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se siguió el protocolo de Neil Olszewski y Scott Medberry con algunas modificaciones. En síntesis, se utilizó las cepas de *agrobacterium* AGL1 y GV2260 recomendadas por (Pasin, 2022) debido a su alta eficiencia de clonación de largos insertos de ADN y en el mantenimiento de los vectores de expresión. *Agrobacterium*, AGL1 creció en placas con medio LB (1.0% Triptone, 0.5% extracto de levadura y 0.5% NaCl), GV2260 en medio YEP (1% de extracto de levadura, 0.5% NaCl y 1% de agua peptona, pH 7.5) suplementado con carbenicilina (100µg/ml) a 28 °C durante 48 horas. Se seleccionó una colonia y se cultivó en 5 ml de medio líquido LB o YEP con 100 µg/ml de carbenicilina y se incubó a 28 °C, 250 rpm, durante 24-48 horas ($OD_{600} \approx 1$). Se transfirió los 5 ml de cultivo a 245 ml de medio LB o YEP y se incubó a 28 °C, 250 rpm hasta que las células alcancen un $OD_{600} = 0.5 - 1.0$ (alrededor de 6 horas de incubación $OD_{600} \approx 0.5$).

Una vez alcanzado el OD_{600} adecuado, las células se colocaron en hielo (4 °C) y se centrifugaron a 3200 g, 4°C por 15 minutos. Se resuspendió el pellet celular en 1 volumen de cultivo original en agua estéril fría y se centrifugó a 3200 g, 4°C por 15 minutos. Se resuspendió el pellet celular en 0.5 volúmenes de agua estéril fría y se centrifugó como se indicó anteriormente. Luego se suspendió el pellet en 0.02 volúmenes de 10% glicerol estéril frío y se centrifugó a las mismas condiciones; las células se suspendieron en 0.002 - 0.003 volúmenes de 10% glicerol estéril frío (≈ 500 µl). Finalmente, se colocó 60 µl de células electrocompetentes en tubos de 0.5 ml y se almacenó a -80 °C.

2. 5 Transformación en *Escherichia coli*

Los constructos virales ZhBV2, ZhBV2_Ry, PapDfV1 y PapDfV1_Ry ensamblados se transformaron en células *E. coli* Top 10 (One Shot™, Invitrogen). Se mezclaron 100 µl de células competentes con 2.5 µl de ADN, luego se incubó en hielo (30 min), a 42 °C (1 min 10 s), y nuevamente en hielo (5 min). Se añadieron 700 µl de SOC (Corning, EE.UU.), incubando a 37 °C por 1 h, 250 rpm. El cultivo enriquecido fue sembrado en medio LB agar en presencia de kanamicina (50 µg/ml), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido), e IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Tras centrifugación a 3000g por 10 minutos, se resuspendieron en 75 µl y se sembraron en medio LB agar suplementado con kanamicina (50 µg/ml), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido), e IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) e incubados a 30 °C (20–48 h) (diluciones 25 y 50 ul). Los clones positivos se identificaron por PCR de colonias utilizando los cebadores descritos en la Tabla 7. Una vez confirmada la presencia de la secuencia viral en el constructo, las bacterias fueron cultivadas en LB por una noche. Los plásmidos fueron extraídos y purificados a partir del cultivo usando ZR Plasmid Miniprep™ Classic (Zymo Research, CA, EE.UU.), seguido de digestión enzimática de BamHI o BgII (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Aquellos con un patrón correcto se secuenciaron con Nanopore (Plasmidsaurus, EE.UU.).

2.6 Transformación en *Agrobacterium tumefaciens*

Los clones positivos se transformaron en las cepas *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 y GV2260 mediante electroporación, siguiendo el protocolo de (Medberry et al., 1990) con modificaciones. Las cubetas de 0.1 cm (USA Scientific, EE.UU.) se esterilizaron con etanol al 70 %, agua destilada y 15 min de UV, y se enfriaron en hielo. A 60 µl de células electrocompetentes descongeladas se añadieron 2 µl de plásmido (20–40 ng/µl). La mezcla se

transfirió a la cubeta y se mantuvo 45 s en hielo antes de aplicar un pulso (Bio-Rad MicroPulser, 2.2 kV, 1 pulso). Tras la electroporación, las células se resuspendieron en 1 ml de LB (para AGL1) o YEP (para GV2260) y se incubaron a 28 °C, 250 rpm, durante 3 h. Se sembraron 2, 20 y 200 µl en medio LB agar o YEP con 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de carbenicilina. Los clones se verificaron por PCR de colonias con los cebadores previamente descritos (Tabla 7).

Los plásmidos positivos se purificaron mediante un protocolo modificado de hidrólisis alcalina (Neil Olszewski, personal communication). Se centrifugaron 2 ml de cultivo saturado ($OD_{600} \geq 1$) a 12,000 g por 30 s. El pellet se resuspendió en 500 µl de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA), se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 80 µl de la misma solución. Se añadieron 20 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 1 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 20 min. Se añadió 200 µl de solución II (0.2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló por inversión y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 150 µl de solución III (5 M acetato de potasio y ácido acético glacial), se mezcló y se incubó a 4 °C por 5 min. Tras centrifugar (12,000 g, 4 °C, 5–10 min), el sobrenadante se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:25:1), y el ADN se precipitó con 0.8 vol. de isopropanol a -20 °C por 20 min. Se centrifugó (15 min, 12,000 g), se lavó el pellet con etanol al 70 % (2x), se secó y se resuspendió en 30 µl de TES (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl).

Se verificó por digestión enzimática usando BamHI o BglII (FastDigest, Thermo Fisher). Los clones con el patrón correcto se transformaron en *E. coli* Top 10, se purificó el plásmido con ZR Plasmid Miniprep™ (Zymo Research), se verificó por digestión y se secuenció todo el plásmido mediante Nanopore (Plasmidsaurus, EE.UU.) antes de la agroinoculación.

2.7 Agroinoculación

Se emplearon dos métodos de agroinoculación. El primero (Olszewski, sin publicar) utilizó un cultivo de *Agrobacterium* (OD₆₀₀ ~1.0), centrifugado a 2,600 g por 3 min y resuspendido en agua estéril. Se cortó la vena central de hojas jóvenes (3er–4to estadio) y se aplicó la suspensión bacteriana con un palillo estéril cinco veces en el corte, en el pecíolo de otra hoja y en el tallo entre nudos. Este método se aplicó a *Phaseolus vulgaris* ‘Verano’ (n=30), *Glycine max* ‘USDA-N7004’ (n=15) y ‘LB18-58’ (n=15), *Nicotiana benthamiana* (n=16), *N. occidentalis* (n=16) y *Carica papaya* ‘Maradol’ (n=16), ‘Sunrise’ (n=16) y ‘Passion red’ (n=8) de tres a seis semanas de edad.

El segundo método, basado en (Tuo et al., 2021), usó un cultivo con un OD₆₀₀ ~0.5, centrifugados a 2,600 g por 10 min y resuspendido en solución de infiltración (MS + ácido ascórbico, 10 mM MOPs, pH 5.5 y 200 µM acetosiringona). Tras 3 h de incubación en oscuridad, se infiltró con una jeringa sin aguja en la cara abaxial de dos hojas jóvenes completamente desarrolladas (3er–4to estadio). Se aplicó a *N. benthamiana* (n=13), ‘Sunrise’ (n=12) y ‘Passion red’ (n=8) de cinco a ocho semanas de edad.

Los controles incluyeron i) plantas testigo, ii) con medio de resuspensión bacteriana, y iii) con vector sin inserto (pLX-AS). Las plantas inoculadas contenían las construcciones pLX-AS_PapDfV, pLX-AS_PapDfV_Ry, pLX-AS_ZhBV2 y pLX-AS_ZhBV2_Ry, y se mantuvieron a 25 °C (14/10 h luz/oscuridad) en cámara o invernadero.

2.8 Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron siguiendo un protocolo modificado de (Halgren et al., 2007; Medina-Salguero et al., 2019). Las hojas inoculadas contienen agrobacterias con ADN plasmídico de los clones virales ensamblados. En las células inoculadas, el T-DNA se

transcribe y traduce, generando ARN viral y proteínas, sin replicación viral. Se seleccionaron dos hojas jóvenes completamente desarrolladas, no inoculadas, para evitar falsos positivos. Se tomaron 100 mg de tejido y se trituraron con 1 ml de tampón de extracción frío (200 mM Tris base pH 8.5, 300 mM cloruro de litio, 1.5% dodecil sulfato de litio, 10 mM EDTA, 1% ácido desoxicólico, 2% polivinilpirrolidona, 1% NP-40 “Tergitol” y 1% β -mercaptoetanol, este último añadido antes de usar) en el homogenizador (Spex Sample Prep, EE.UU.). Se centrifugó a 18,705 g por 3 min a 4 °C. Se recuperaron 600 μ l de sobrenadante y se añadieron 600 μ l de solución de acetato de potasio (2.8 M potasio, 6 M acetato, pH 6.5). Tras invertir 10 veces, se centrifugó a 18,705 g por 10 min a 4 °C. Se tomaron 700 μ l del sobrenadante, se mezclaron con igual volumen de isopropanol frío mediante inversión, y se centrifugó a 18,705 g por 20 min a 4 °C. El pellet se lavó con 500 μ l de solución de lavado (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl) y 25 μ l de sílica, agitando 20 s en vortex. Se centrifugó a 2,767 g por 1 min a 4 °C. Se repitió el lavado con 500 μ l de solución, se agitó en vortex 20 s y se centrifugó a 18,705 g por 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet en SpeedVac DNA130 (Thermo Scientific, EE.UU.) por 10 min. Finalmente, se añadieron 65 μ l de agua libre de nucleasas, se resuspendió en vortex y se centrifugó a 18,705 g por 3 min. Se recolectaron 45 μ l del sobrenadante.

2.9 RT-PCR

Previo a la retro-transcripción (RT), se digirieron las muestras con DNasa (ezDNase, Invitrogen, EE.UU.) para eliminar contaminantes de ADN y prevenir cualquier contaminación cruzada por *agrobacterium*. Se utilizó la siguiente mezcla:

Tabla 2*Mezcla con DNasa para una reacción*

Reactivo	Concentración final	Volumen (ul)
Tampón ezDNasa (10X)	1X	0.95
ezDNasa enzima	-	0.1
RNA total (~200 ng/ul)	-	2.5
Agua libre de nucleasas	-	5.91
Total DNasa mix	-	9.45

Se centrifugó la mezcla y se incubó por 2 minutos a 37 °C. Se enfrió los tubos en hielo y se añadió la mezcla de la RT para sintetizar la primera cadena de cDNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System, Invitrogen, EE.UU.).

Tabla 3*Mezcla con la transcriptasa reversa (RT) para una reacción*

Reactivo	Concentración final	Volumen (ul)
Tampón RT 5X	1X	3.00
Cebadores aleatorios (50ng/ul)	2,5 ng/ul	0.75
DTT (100 uM)	5 uM	0.75
dNTPs (10mM)	0,5 mM	0.75
Inhibidor de ribonucleasa (40 U/ul)	0,4 U/ul	0.15
SSIV RT enzima (200 U/ul)	2 U/ul	0.15
Mezcla total RT	-	5.55
Total	-	15

Se incubó la reacción a 55 °C por 20 minutos y luego se inactivó la enzima a 80 °C por 10 minutos. La mezcla de la PCR se configuró de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 4

Mezcla de PCR para una reacción

Reactivo	Concentración final	Volumen (ul)
H ₂ O	-	2
GoTaq Green Mix 2X	1X	5
Cebador inverso (5uM)	0,5 uM	1
Cebador directo (5uM)	0,5 uM	1
cDNA	-	1
Total	-	10

Se utilizó los cebadores para el control de referencia Nad5, y para detectar ZhBV2 y PapDfV1 enumerados en la Tabla 7. El programa de la PCR se ejecutó como se detalla a continuación. Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, luego por 35 ciclos una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, anillado a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos, por último, una extensión final a 72°C por 5 minutos.

El análisis del virus se realizó en hojas jóvenes no inoculadas a los 7, 15, 21 y 30 dpi, como se ha descrito anteriormente. Los amplicones de RT-PCR se purificaron utilizando PureLink Quick PCR Purification kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) y se verificaron mediante secuenciación de Sanger.

2.10 TEM

Para complementar la detección del virus a través de RT-PCR, se analizó mediante microscopia electrónica de transmisión (Brunt & Kenten, 1973) la presencia de viriones

filamentosos, típicamente asociados a miembros del género Carlavirus. Para esto se trituró 2000 mg de tejido foliar con nitrógeno líquido y se homogeneizó con 4 ml de tampón de extracción (tampón borato 0,02 M, pH 9,5), y se filtró con una estopilla. El extracto se centrifugó a 10,000 g durante 15 min utilizando un rotor Beckman JA-17 Fixed-Angle y el sobrenadante se mezcló por inversión con 0,5 volúmenes de cloroformo durante 4 min y se incubó a 4°C durante 1h. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 10,000 g y la fase acuosa se filtró a través de papel P5 de porosidad media (Fisher Scientific, EE.UU.). Las partículas virales se sedimentaron por centrifugación a 75.000 g utilizando un rotor Beckman Tipo 50.2 Ti de ángulo fijo durante 1h y se suspendieron en 1 mL de borato 0.01 M, pH 9.5. Las suspensiones virales parcialmente purificadas se montaron en rejillas de formvar recubiertas de carbono (1%), se tiñeron con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 7,0 y se visualizaron mediante TEM utilizando un microscopio JEOL JEM-1400 Plus en el Centro de Imágenes de la Universidad de Minnesota. La longitud y el diámetro de las partículas se verificaron con el software ImageJ.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

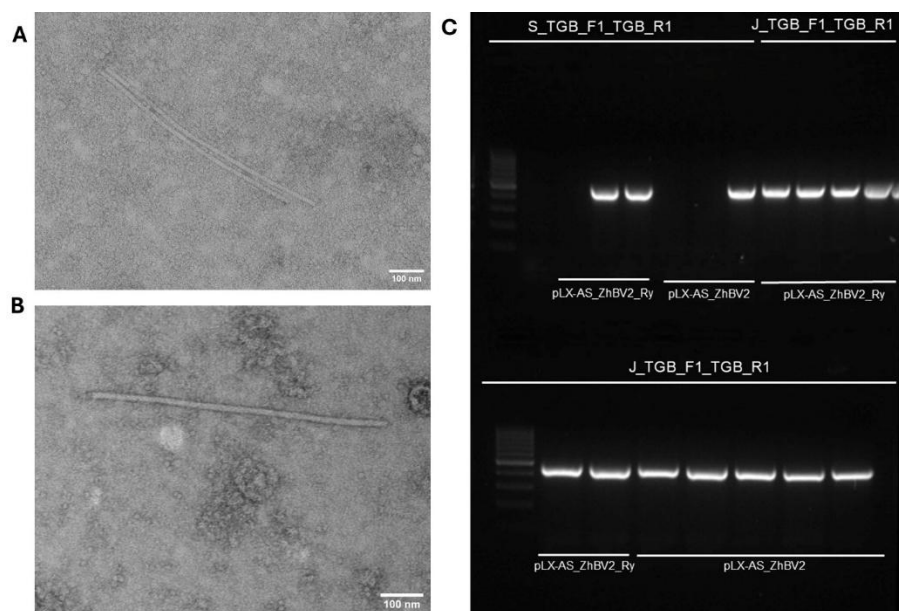
Construcción de clones PapDfV1 y ZhBV2 que incorporan la ribozima

Se evaluó la infectividad de cuatro constructos virales derivados de los genomas sintéticos de PapDfV1 y ZhBV2, con y sin ribozima, en soja de las variedades ‘LB1858’ y ‘N7004’ y judía común de la variedad ‘Verano’, utilizando un único método de agroinoculación (Olszewski, sin publicar) y un solo experimento independiente. La detección viral se realizó mediante RT-PCR a los 21 días post-inoculación (dpi).

En judía común, todos los constructos de ZhBV2 mostraron una infectividad del 100 % (6/6 plantas positivas por constructo), tanto en presencia como en ausencia de ribozima (Figura 1, tabla 5). En contraste, en soja se observaron diferencias según el constructo y la variedad utilizada. En ambas variedades, ‘LB1858’ y ‘N7004’, solo los constructos con ribozima (pLX-AS_ZhBV2_Ry) mostraron tasas de infección superiores (3/3 y 2/3, respectivamente) en comparación con los constructos sin ribozima (pLX-AS_ZhBV2) (1/3 en ambas variedades). Los constructos derivados de PapDfV1 no generaron infecciones detectables en soja ni en judía común (0/3 y 0/6 respectivamente), independientemente de la presencia de la ribozima.

Figura 1

Infectividad del constructo viral pLX-AS_ZhBV2 en soja y judía común



Nota. Semipurificación de partículas filamentosas similares a carlavirus visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión en plantas de (A) judía común y (B) soja tras la agroinoculación con la construcción pLX-AS_ZhBV2 y analizada a los 30 dpi. (C) Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados por RT-PCR con un tamaño de 495 pb que flanquean en la región del ‘Triple gene block’(TGB_F1_TGB_R1). Los resultados corresponden a plantas de soja (S) y judía común (J) agroinoculadas con pLX-AS_ZhBV2 y analizadas a los 21 días post-inoculación (dpi). El marcador de ADN corresponde a 100 bp GeneRuler (Thermo Scientific, EE.UU.) utilizado como referencia del tamaño molecular de los fragmentos.

Estos resultados preliminares sugieren que la inclusión de una ribozima en el extremo 3’ podría mejorar la eficiencia de infección en soja, aunque el experimento no fue repetido y no permite conclusiones definitivas sobre la necesidad de la ribozima como parte del constructo. En la mayoría de los casos, nucleótidos no virales en los extremos 5’ y 3’ reducen la infectividad

viral de los clones (Boyer & Haenni, 1994). Se observa una concordancia con lo descrito en el estudio de Navas-Hermosilla et al., (2021), en el cual comparó cuantitativamente el efecto en la infectividad de añadir la ribozima del virus de la Hepatitis delta (HDV) en los clones de (ToCV) en plantas de *Nicotiana benthamiana* (estadio de 3-5 hojas) y determinó los extremos 3' de los genomas de los virus generados tras la agroinoculación con clones con o sin la ribozima.

Considerando todos los experimentos independientes juntos, demostró mediante “tissue blot molecular hybridization” de hojas no infiltradas utilizando una sonda de sentido negativo del gen CP que el 82,1% de las plantas inoculadas con ToCV que contienen la HDV ribozima se infectaron a diferencia del 40,9% de plantas inoculadas con ToCV sin ribozima, lo cual resulta en un incremento de dos veces en la infectividad. Cabe destacar que la presencia de la HDV ribozima generó extremos 3' de RNA1 más similares a las secuencias utilizadas para la agroinoculación o en las que naturalmente se encuentran en los aislados de ToCV. Turpena et al. (1993) descubrieron que la adición de una ribozima basada en ARN satélite del virus del moteado del trébol subterráneo a un clon infeccioso del virus del mosaico del tabaco duplicaba la frecuencia de transfección en *Nicotiana tabacum*. De forma similar, Scholthof (1999) demostró que el uso de una ribozima HDV producía niveles más altos de infectividad con un clon infeccioso del virus del bushy stunt del tomate (TBSV).

A partir de estos hallazgos, se seleccionó el constructo pLX-AS_PapDfV1_Ry y pLX-AS_ZhBV2_Ry para su posterior evaluación en *Carica papaya*, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana occidentalis*.

Tabla 5

Resultados de RT-PCR de plantas infectadas con PapDfV1 y ZhBV2 a los 21 dpi

Material vegetal	pLX-AS_ZhBV2_Ry	pLX-AS_ZhBV2	pLX-AS_PapDfV1_Ry	pLX-AS_PapDfV1
Soja 'LB1858'	3/3	1/3	0/3	0/3
Soja 'N7004'	2/3	1/3	0/3	0/3
Judía común 'Verano'	6/6	6/6	0/6	0/6

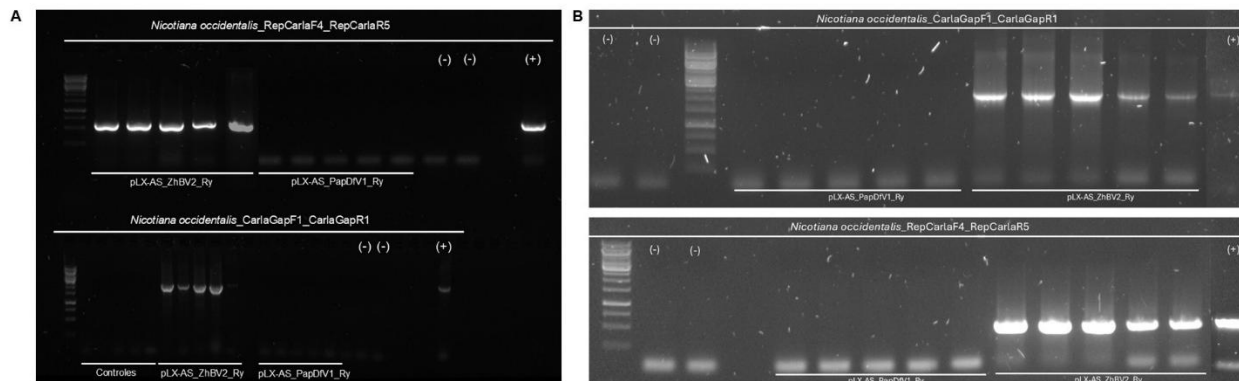
Nota. El método de inoculación utilizado fue (Olszewski, sin publicar). Se realizó un único experimento independiente.

Infectividad viral de ZhBV2 y PapDfV1

En resumen, la construcción viral ZhBV2 infectó soja ($n = 7/12$), judía común ($n = 12/12$) y *N. occidentalis* ($n = 5/5$) detectada a los 15 y 21 dpi como se observa en las figuras 1 y 2 y en la tabla 6. Por el contrario, la agroinoculación con PapDfV1 no produjo plantas infectadas en ninguna de las especies analizadas, independientemente del método de agroinoculación o cepa de agrobacterium utilizada.

Figura 2

Infectividad de los constructos virales en Nicotiana occidentalis evaluado mediante RT-PCR



Nota. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados por RT-PCR con un tamaño de 600 pb que flanquean en la región de la replicasa (RepCarlaF4_RepCarlaR5) y 2300 bp en la región de la delección (CarlaGapF1_CarlaGapR1). Los resultados corresponden a plantas de *Nicotiana occidentalis* agroinoculadas con pLX-AS_ZhBV2_Ry y pLX-AS_PapDfV1_Ry, analizadas a los (A) 15 días post-inoculación (dpi) y (B) 21 días post-inoculación (dpi). El marcador de ADN corresponde a 1kb GeneRuler (Thermo Scientific, EE.UU.) utilizado como referencia del tamaño molecular de los fragmentos.

Se visualizaron partículas similares a Carlavirus en plantas positivas de soja y judía común confirmadas por RT-PCR, se muestran en la figura 1 (A y B) respectivamente. La longitud modal de las partículas osciló entre 660-670 nm (n=10) y 14,0 nm de diámetro en soja y judía común. No se observaron partículas similares a virus en *Nicotiana occidentalis*. Las plantas agroinoculadas no mostraron síntomas similares a virus.

La infección de ZhBV2 en *Nicotiana occidentalis* y no en *Nicotiana benthamiana* no es un resultado inusual. La variación a nivel de especie en la infectividad de este carlavirus se

puede atribuir a diversos factores como la variación genética entre especies, diferencias en los mecanismos de defensa antivirales del hospedero e interacciones específicas entre los componentes virales y los factores del huésped (Wylie et al., 2015). Este comportamiento ha sido previamente descrito por el estudio de Villamor et al. (2023), el cual reporta que la agroinfiltración del constructo de carlavirus de blueberry virus S (BluVS) generó síntomas severos como mosaico, deformación foliar, necrosis y la presencia del virus fue confirmada mediante RT-PCR en *N. occidentalis*, pero no infectó *N. benthamiana* ni *N. tabacum*.

La ausencia de partículas similares a carlavirus observadas mediante TEM en *N. occidentalis* podría atribuirse a un bajo título viral. Es posible que el virus se replique a niveles bajos en este hospedero, generando una cantidad reducida de partículas virales, lo que dificulta su visualización en TEM (Roingeard et al., 2019). No obstante, la infectividad fue confirmada mediante RT-PCR, una técnica altamente sensible que permite detectar incluso cantidades mínimas de ARN viral (Roingeard, 2008).

Algunos estudios han demostrado la capacidad de ciertos virus de RNA como los virus similares a umbravirus y viroides deficientes en los genes esenciales del movimiento de interactuar con los factores del huésped para el movimiento intercelular y sistémico (Gómez & Pallás, 2001, 2004; Kumar & Dasgupta, 2021; Simon et al., 2025; Ying et al., 2024). Una de las proteínas del huésped que interactúa con virus de RNA es la proteína del floema 2 (PP2), una lectina abundante en el floema de las plantas vasculares como las Cucurbitáceas (Bobbili et al., 2023; Dinant et al., 2003). PP2 está involucrada en una variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos como en la defensa de la planta y en respuestas al estrés biótico y abiótico. Su expresión depende de las condiciones del huésped, medio ambiente y el tejido (Guo et al., 2018; Wei et al., 2023).

El estudio de Gómez & Pallás, (2004) demostró que la proteína CsPP2 del pepino forma un complejo ribonucleoproteico con el ARN Hop Stunt Viroid (HSVd) *in vivo*. Los ensayos de injerto intergenéricos mostraron que tanto CsPP2 como el ARN HSVd podían translocarse a los vástagos, donde el viroide seguía siendo funcional y sintomático y se validó la formación del complejo ribonucleoproteico mediante inmunoprecipitación. En los injertos entre pepino (patrón) y la calabaza (vástago) solo se detectó la CsPP2 del pepino como complejo ribonucleoproteico con el viroide, pero no la CmPP2 de la calabaza, la cual es incapaz de unirse al viroide y producir infección sistémica, razón por la cual en la calabaza este viroide no es infeccioso. Esto sugiere que existen ciertos dominios variables en la PP2 del hospedero que interactúan de forma específica con el viroide. Se necesitan al menos tres propiedades para que una proteína permita el movimiento sistémico de un viroide: i) actividad de unión al ARN, ii) interactuar con los plasmodesmas e incrementar su tamaño de exclusión (SEL) y iii) ser una proteína translocable en toda la planta.

La investigación realizada por (Ying et al., 2024), demostró que la PP2 del hospedador permite el movimiento sistémico de yellow vein-associated virus 1 (CY1), virus que carece de proteínas del movimiento. La reducción de la acumulación de CY1 en las hojas sistémicas fue el resultado de la anulación del transcrito de PP2, lo que indica que PP2 sirve como proteína de movimiento del hospedador que ayuda a la propagación del virus. Por otro lado, se ha revelado que la PP2 puede estimular la transmisión de Cucurbit aphid borne yellows virus (CABYV) mediante áfidos cuando se mezcla el virus con una dieta artificial (Bencharki et al., 2010). Las investigaciones previas sugieren que la infectividad de PapDfV1 puede depender de factores específicos del huésped que se expresan en condiciones ambientales (bióticas y abióticas) particulares ausentes en los experimentos de agroinoculación ejecutados en el presente estudio.

La región de la delección de PapDfV1 posee características genómicas que pueden hacer que las polimerasas virales sean más susceptibles al intercambio de secuencia, facilitando la producción de D-RNAs y DI-RNAs. De manera similar, se ha descrito la presencia de un aislado defectuoso Butterbur mosaic virus (ButMV-B), con una pequeña delección en el gen de TGB1, en infección mixta con su versión genómica parental y HelVS. Este hallazgo sugiere que la región de la delección es un elemento genómico conservado (Hammond et al., 2020). En consecuencia, es razonable inferir que PapDfV1 podría actuar como DI-RNA con su forma nativa en muy baja concentración, lo que explicaría su dificultad para detectarlo mediante RT-PCR y métodos como HTS.

Coinfección de PapDfV1 con virus auxiliares

Dado que PapDfV1 es un virus defectuoso que carece de genes esenciales para el movimiento celular y sistémico, se evaluó su capacidad de infectar plantas en coinfección con posibles virus auxiliares. El descubrimiento de PapDfV1 mediante secuenciación Illumina, demostró la coexistencia de este virus con PRSV, PpVE, PpVQ, y PSFaV en muestra de tejido de látex de papaya de 2 años.

Las proteínas de movimiento viral (MP) heterólogas, no relacionadas entre sí, pueden suplantar la transmisión intercelular de los virus de las plantas deficientes en proteínas del movimiento o incluso de los viroides, según estudios de transcomplementación del movimiento de los virus (Morozov & Solovyev, 2024). Esto se explica por el hecho de que muchas MP tienen dos funciones conservadas: pueden unirse al ARN e incrementar el límite de exclusión por tamaño (SEL) de los plasmodesmas (Rao et al., 1998; Wang et al., 2024; Wu & Bisaro, 2022; Zhao et al., 2023). Por lo tanto, es posible que la coinfección con otros virus de la papaya que

estaban presentes en el momento del muestreo, como PpVE, PRSV y PSFaV, los cuales codifican genes MP, ayudan a la propagación sistémica de PapDfV1.

Para ello, se agroinocularon plantas de papaya ‘Passion red’ previamente infectadas mecánicamente con *Papaya ringspot virus* (PRSV) (n=4) y *Papaya sticky fruit-associated virus* (PSFaV) (n=2), con el objetivo de determinar si alguno de estos virus puede complementar las funciones de movimiento requeridas por PapDfV1. Sin embargo, ninguna de las plantas coinfectadas presentó amplificación detectable de PapDfV1 por RT-PCR a los 30 y 60 dpi, lo que sugiere que ni PRSV ni PSFaV proporcionan las funciones necesarias para facilitar la infección sistémica de PapDfV1 en papaya (tabla 6).

Tabla 6

Resumen de resultados de RT-PCR de plantas agroinoculadas con pLX-AS_ ZhBV2 y pLX-AS_ PapDfV1 independientemente de la ribozima

Material vegetal	Constructo viral	Plantas inoculadas	Plantas sintomáticas	Positivos mediante RT- PCR
Soybean LB1858 ^a	pLX-AS_ ZhBV2	6	0	4
	pLX-AS_ PapDfV1	6	0	0
	pLX-AS	1	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	1	0	0
	Testigo	1	0	0
Soybean N7004 ^a	pLX-AS_ ZhBV2	6	0	3
	pLX-AS_ PapDfV1	6	0	0
	pLX-AS	1	0	0

	Medio de resuspensión bacteriana	1	0	0
	Testigo	1	0	0
Common bean ^a	pLX-AS_ ZhBV2	12	0	12
	pLX-AS_ PapDfV1	12	0	0
	pLX-AS	3	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	1	0	0
	Testigo	2	0	0
Papaya Maradol ^a	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	0
	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	2	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	2	0	0
	Testigo	2	0	0
Papaya Hawaiana ^a	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	0
	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	2	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	2	0	0
	Testigo	2	0	0
Papaya Hawaiana ^b	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	0

	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	1	0	0
	Testigo	1	0	0
Papaya Passion red ^a	pLX-AS_ ZhBV2	3	0	0
	pLX-AS_ PapDfV1	3	0	0
	pLX-AS	1	0	0
	Testigo	1	0	0
Papaya Passion red ^b	pLX-AS_ ZhBV2	3	0	0
	pLX-AS_ PapDfV1	3	0	0
	pLX-AS	1	0	0
	Testigo	1	0	0
Papaya Passion red ^a _b	PRSV + pLX-AS_ PapDfV1	4	PRSV síntomas	0
	Testigo	1	0	0
Papaya Passion red ^a _b	PSFaV + pLX-AS_ PapDfV1	2	PSFaV síntomas	0
	Testigo	1	0	0
<i>Nicotiana</i>	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	5
<i>occidentalis</i> ^a	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	2	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	2	0	0
	Testigo	2	0	0

<i>Nicotiana</i>	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	0
<i>benthamiana</i> ^a	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	2	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	2	0	0
	Testigo	2	0	0
<i>Nicotiana</i>	pLX-AS_ ZhBV2	5	0	0
<i>benthamiana</i> ^b	pLX-AS_ PapDfV1	5	0	0
	pLX-AS	1	0	0
	Medio de resuspensión bacteriana	1	0	0
	Testigo	1	0	0

Nota. Las plantas positivas por RT-PCR se registraron a los 15 y 21 dpi, a excepción del experimento de coinfección que se registró a los 30 y 60 dpi. Método de agroinoculación: ^a Olszewski y ^b Agroinfiltración. Papaya ringspot virus (PRSV) y Sticky fruit-associated virus (PSFaV) fueron inoculados mecánicamente en plantas de papaya ‘Passion red’.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- Se construyó clones de los virus PapDfV1 y ZhBV2 a partir de fragmentos de ADN diseñados *in silico* mediante técnicas de clonación molecular.
- La infectividad de ambos constructos virales fue evaluada mediante RT-PCR y TEM. ZhBV2 resultó ser infeccioso en *Phaseolus vulgaris* (judía común), *Glycine max* (soja) y *Nicotiana occidentalis*, lo que demuestra su capacidad de replicación y movimiento sistémico en estas especies. En contraste, PapDfV1 no generó infección sistémica en ninguna de las plantas agroinoculadas, ni en infecciones simples ni mixtas, lo cual podría estar relacionado con su carácter defectuoso, su posible interacción con virus auxiliares desconocidos o de factores específicos del hospedero tal como se discutió previamente.

4.1.2 Recomendaciones

- Dado que PapDfV1 no produjo infección sistémica detectable mediante RT-PCR o TEM, sería pertinente realizar estudios de coinfección con otros carlavirus como Papaya mottle-associated virus (PaMV), papaya mild mottle-associated virus (PaMMV) y cowpea mild mottle virus (CPMMV) y cuantificar la acumulación viral mediante técnicas más sensibles como RT-qPCR.
- Sería valioso estudiar las proteínas del huésped implicadas en el movimiento sistémico de los virus defectuosos del movimiento en papaya, las interacciones proteínas virales-huésped, condiciones necesarias para la formación de los complejos ribonucleoproteicos, análisis de las secuencias del virus y proteínas del hospedero implicadas en la unión y actividad.

- Se sugiere evaluar la funcionalidad de los genes eliminados en PapDfV1 mediante estudios de complementación, para confirmar su rol en el movimiento o replicación viral.

Referencias

- Alcalá-Briseño, R. I., Casarrubias-Castillo, K., López-Ley, D., Garrett, K. A., & Silva-Rosales, L. (2020). Network Analysis of the Papaya Orchard Virome from Two Agroecological Regions of Chiapas, Mexico. *mSystems*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00423-19>
- Bencharki, B., Boissinot, S., Revollon, S., Ziegler-Graff, V., Erdinger, M., Wiss, L., Dinant, S., Renard, D., Beuve, M., Lemaitre-Guillier, C., & Brault, V. (2010). Phloem Protein Partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: Possible Involvement of Phloem Proteins in Virus Transmission by Aphids. / 799 *MPMI*, 23(6), 799-810. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Bhat, A. I., & Rao, G. P. (2020). Characterization of Plant Viruses, Methods and Protocols. En *Springer Protocols Handbooks*.
- Bobbili, K. B., Sivaji, N., Priya, B., Suguna, K., & Surolia, A. (2023). Structure and interactions of the phloem lectin (phloem protein 2) Cus17 from *Cucumis sativus*. *Structure*, 31(4), 464-479.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2023.02.008>
- Boyer, J. C., & Haenni, A. L. (1994). Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses. *Virology*, 198, 415-426.
- Brewer, H. C., Hird, D. L., Bailey, A. M., Seal, S. E., & Foster, G. D. (2018). A guide to the contained use of plant virus infectious clones. En *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 16, Número 4, pp. 832-843). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pbi.12876>
- Brunt, A. A., & Kenten, R. H. (1973). *Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (Vigna unguiculata) in Ghana* (Vol. 9, Número 1).
- Cabrera Mederos, D., Debat, H., Torres, C., Portal, O., Jaramillo Zapata, M., Trucco, V., Flores, C., Ortiz, C., Badaracco, A., Acuña, L., Nome, C., Quito-Avila, D., Bejerman, N., Castellanos Collazo, O., Sánchez-Rodríguez, A., & Giolitti, F. (2022). An Unwanted Association: The

- Threat to Papaya Crops by a Novel Potexvirus in Northwest Argentina. *Viruses*, 14(10).
<https://doi.org/10.3390/v14102297>
- Carvalho, S. L., Nagata, T., Junqueira, B. R., Zanardo, L. G., Paiva, A. C. S., & Carvalho, C. M. (2017a). Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus. *Virus Genes*, 53(1), 137-140. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1395-x>
- Carvalho, S. L., Nagata, T., Junqueira, B. R., Zanardo, L. G., Paiva, A. C. S., & Carvalho, C. M. (2017b). Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus. *Virus Genes*, 53(1), 137-140. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1395-x>
- Chou, Y. L., Hung, Y. J., Tseng, Y. H., Hsu, H. T., Yang, J. Y., Wung, C. H., Lin, N. S., Meng, M., Hsu, Y. H., & Chang, B. Y. (2013). The Stable Association of Virion with the Triple-gene-block Protein 3-based Complex of Bamboo mosaic virus. *PLoS Pathogens*, 9(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003405>
- Diaz-Lara, A., Mollov, D., Golino, D., & Al Rwahnih, M. (2020). Complete genome sequence of rose virus A, the first carlavirus identified in rose. *Archives of Virology*, 165(1), 241-244.
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04460-1>
- Dinant, S., Clark, A. M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J. C., Kusiak, C., & Thompson, G. A. (2003). Diversity of the superfamily of phloem lectins (Phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiology*, 131(1), 114-128. <https://doi.org/10.1104/pp.013086>
- Dotto, J. M., & Abihudi, S. A. (2021). Nutraceutical value of Carica papaya: A review. *Scientific African*, 13, e00933. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00933>
- Fei, S., Yu, J., Zhou, Y., Xie, Y., Xie, L., Fu, S., & Wu, J. (2024). Discovery and characterization of a novel carlavirus in Ligularia jaluensis plants. *Virologica Sinica*.
<https://doi.org/10.1016/j.virs.2024.11.003>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *2019 MAJOR TROPICAL FRUITS Market Review*.

Foster, G. D. (1998). Carlavirus isolation and RNA extraction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 81(2), 145-150. <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:145>

Fujita, N., Komatsu, K., Ayukawa, Y., Matsuo, Y., Hashimoto, M., Netsu, O., Teraoka, T., Yamaji, Y., Namba, S., & Arie, T. (2018). N-terminal region of cysteine-rich protein (CRP) in carlaviruses is involved in the determination of symptom types. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 180-190. <https://doi.org/10.1111/MPP.12513>

Gómez, G., & Pallás, V. (2001). Identification of an In Vitro Ribonucleoprotein Complex Between a Viroid RNA and a Phloem Protein from Cucumber Plants. En *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 14, Número 7).

Gómez, G., & Pallás, V. (2004). A Long-Distance Translocatable Phloem Protein from Cucumber Forms a Ribonucleoprotein Complex In Vivo with Hop Stunt Viroid RNA . *Journal of Virology*, 78(18), 10104-10110. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.18.10104-10110.2004>

Guo, P., Zheng, Y., Peng, D., Liu, L., Dai, L., Chen, C., & Wang, B. (2018). Identification and expression characterization of the Phloem Protein 2 (PP2) genes in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich). *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28953-2>

Gupta, P., Parupudi, P. L. C., Supriya, L., Srivastava, H., Padmaja, G., & Gopinath, K. (2023). Complete genome sequencing and construction of full-length infectious cDNA clone of papaya ringspot virus-HYD isolate and its efficient in planta expression. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1310236>

- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., & Martin, R. R. (2007). Identification, characterization, and detection of black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97(1), 44-50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0044>
- Hammond, J., Reinsel, M., Grinstead, S., Lockhart, B., Jordan, R., & Mollov, D. (2020). A Mixed Infection of Helenium Virus S With Two Distinct Isolates of Butterbur Mosaic Virus, One of Which Has a Major Deletion in an Essential Gene. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612936>
- Huang, A. S. (1973). *DEFECTIVE INTERFERING VIRUSES*. www.annualreviews.org
- Ishwara, A., Govind, B., & Rao, P. (s. f.). *Characterization of Plant Viruses Methods and Protocols*. <http://www.springer.com/series/8623>
- Jordan, R., Korolev, E., Grinstead, S., & Mollov, D. (2021). First complete genome sequence of carnation latent virus, the type member of the genus Carlavirus. *Archives of Virology*, 166(5), 1501-1505. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-04999-y>
- Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y. S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S., & Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology*, 138(4), 1877-1895. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066019>
- Kumar, G., & Dasgupta, I. (2021). Variability, functions and interactions of plant virus movement proteins: What do we know so far? En *Microorganisms* (Vol. 9, Número 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040695>
- Lim, H.-S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Ruzin, S., Schichnes, D., Lee, M. Y., Vaira, A. M., Ryu, K. H., Hammond, J., & Jackson, A. O. (2009). Subcellular Localization of the Barley Stripe

- Mosaic Virus Triple Gene Block Proteins . *Journal of Virology*, 83(18), 9432-9448.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00739-09>
- Luigi, M., Donati, L., Sciarroni, R., Gentili, A., Taglienti, A., Tiberini, A., Faggioli, F., & Ferretti, L. (2023). Carlavirus Species Infecting Hop Plants in Italy: Molecular Identification and Phylogenetic Analyses of the Detected Isolates. *Plants*, 12(19).
<https://doi.org/10.3390/plants12193514>
- Lukhovitskaya, N. I., Solovieva, A. D., Boddeti, S. K., Thaduri, S., Solovyev, A. G., & Savenkov, E. I. (2013). An RNA virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco Species. *Plant Cell*, 25(3), 960-973. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.106476>
- Medberry, S. L., Lockhart', B. E. L., & Olszewski, N. E. (1990). Properties of Commelina yellow mottle virus's complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 18, Número 18).
- Medina-Salguero, A. X., Cornejo-Franco, J. F., Grinstead, S., Mollov, D., Mowery, J. D., Flores, F., & Quito-Avila, D. F. (2019). Sequencing, genome analysis and prevalence of a cytorhabdovirus discovered in Carica papaya. *PLoS ONE*, 14(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215798>
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. En *Journal of Virological Methods* (Vol. 99). www.elsevier.com/locate/jviromet
- Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2024). Mechanisms of plant virus cell-to-cell transport: new lessons from complementation studies. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1453464>

- Mumo, N. N., Mamati, G. E., Ateka, E. M., Rimberia, F. K., Asudi, G. O., Boykin, L. M., Machuka, E. M., Njuguna, J. N., Pelle, R., & Stomeo, F. (2020). Metagenomic Analysis of Plant Viruses Associated With Papaya Ringspot Disease in *Carica papaya* L. in Kenya. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00205>
- Navas-Hermosilla, E., Fiallo-Olivé, E., & Navas-Castillo, J. (2021). Infectious Clones of Tomato Chlorosis Virus: Toward Increasing Efficiency by Introducing the Hepatitis Delta Virus Ribozyme. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693457>
- Pasin, F. (2022). Assembly of plant virus agroinfectious clones using biological material or DNA synthesis. *STAR Protocols*, 3(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101716>
- Pasin, F., Tseng, X. A., Bedoya, L. C., Heydarnejad, J., Deng, T. C., García, J. A., & Chen, Y. R. (2018). Streamlined generation of plant virus infectious clones using the pLX mini binary vectors. *Journal of Virological Methods*, 262, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.007>
- Quito-Avila, D. F., Reyes-Proano, E., Cañada, G., Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R., Moreira, L., Grinstead, S., Mollov, D., & Karasev, A. V. (2023a). Papaya Sticky Disease Caused by Virus “Couples”: A Challenge for Disease Detection and Management. *Plant Disease*, 107(6), 1649-1663. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2565-FE>
- Quito-Avila, D. F., Reyes-Proano, E., Cañada, G., Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R., Moreira, L., Grinstead, S., Mollov, D., & Karasev, A. V. (2023b). Papaya Sticky Disease Caused by Virus “Couples”: A Challenge for Disease Detection and Management. *Plant Disease*, 107(6), 1649-1663. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2565-FE>

- Rao, A. L. N., Cooper, B., & Deom, C. M. (1998). *Defective Movement of Viruses in the Family Bromoviridae Is Differentially Complemented in Nicotiana benthamiana Expressing Tobamovirus or Dianthovirus Movement Proteins*.
- Roingeard, P. (2008). Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biology of the Cell*, 100(8), 491-501. <https://doi.org/10.1042/bc20070173>
- Roingeard, P., Raynal, P. I., Eymieux, S., & Blanchard, E. (2019). Virus detection by transmission electron microscopy: Still useful for diagnosis and a plus for biosafety. En *Reviews in Medical Virology* (Vol. 29, Número 1). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.2019>
- Sa Antunes, T. F., Maurastoni, M., Madroñero, L. J., Fuentes, G., Santamaria, J. M., Ventura, J. A., Abreu, E. F., Fernandes, A. A. R., & Fernandes, P. M. B. (2020). Battle of three: The curious case of papaya sticky disease. *Plant Disease*, 104(11), 2754-2763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2622-FE>
- Samuels, T. D., Ju, H. J., Ye, C. M., Motes, C. M., Blancaflor, E. B., & Verchot-Lubicz, J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins. *Virology*, 367(2), 375-389. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.022>
- Scholthof, H. B. (1999). Rapid Delivery of Foreign Genes into Plants by Direct Rub-Inoculation with Intact Plasmid DNA of a Tomato Bushy Stunt Virus Gene Vector. En *JOURNAL OF VIROLOGY*. <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Shakir, S., Zaidi, S. S. e. A., Hashemi, F. S. G., Nyirakanani, C., & Vanderschuren, H. (2023). Harnessing plant viruses in the metagenomics era: from the development of infectious clones to applications. En *Trends in Plant Science* (Vol. 28, Número 3, pp. 297-311). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.10.005>

- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Pérez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Simon, A. E., Quito-Avila, D. F., & Bera, S. (2025). Expanding the Plant Virome: Umbra-Like Viruses Use Host Proteins for Movement. *Annual Review of Virology* Downloaded from www.annualreviews.org. *Guest*, 58. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-111821>
- Simon, A. E., Roossinck, M. J., & Havelda, Z. (2004). Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New paradigms for a new century. En *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 42, pp. 415-437). <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140402>
- Tuo, D., Shen, W., Yan, P., Li, X., & Zhou, P. (2015). Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using In-Fusion Cloning. *Viruses*, 7(12), 6241-6250. <https://doi.org/10.3390/v7122935>
- Tuo, D., Yan, P., Zhao, G., Cui, H., Zhu, G., Liu, Y., Yang, X., Wang, H., Li, X., Shen, W., & Zhou, P. (2021). An efficient papaya leaf distortion mosaic potyvirus vector for virus-induced gene silencing in papaya. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00579-y>
- Turpena, T. H., Turpena, A. M., Weinzettla, N., Kumagaia, M. H., Dawsonb, W. O, & Turpen, T. H. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. En *Journal of Virological Methods* (Vol. 42).

- Villamor, D. E. V., Mejia, A. S., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2023a). Genomic Analysis and Development of Infectious Clone of a Novel Carlavirus Infecting Blueberry. *Phytopathology*, 113(1), 98-103. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0186-R>
- Villamor, D. E. V., Mejia, A. S., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2023b). Genomic Analysis and Development of Infectious Clone of a Novel Carlavirus Infecting Blueberry. *Phytopathology*, 113(1), 98-103. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0186-R>
- Vogt, P. K., Jackson, A. O., Compans, E. R., Cooper, G. M., Hogle, A. J., Ito, M. Y., Koprowski, K. H., Melchers, P. F., Oldstone, B. M., Jolla, L., Olsnes, C. S., Potter, O. M., Saedler, M. H., Vogt, C. P., & Wagner, C. H. (1999). Satellites and Defective Viral RNAs. En *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (pp. 1-179). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-09796-0>
- Wang, X., Kotta-Loizou, I., Coutts, R. H. A., Deng, H., Han, Z., Hong, N., Shafik, K., Wang, L., Guo, Y., Yang, M., Xu, W., & Wang, G. (2024). A circular single-stranded DNA mycovirus infects plants and confers broad-spectrum fungal resistance. *Molecular Plant*, 17(6), 955-971. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.05.003>
- Wei, F., Chen, P., Jian, H., Guo, X., Lv, X., Lian, B., Sun, M., An, L., Dang, X., Yang, M., Wu, H., Zhang, N., Wu, A., Wang, H., Ma, L., Fu, X., Lu, J., Yu, S., & Wei, H. (2023). A systematic analysis of the phloem protein 2 (PP2) proteins in *Gossypium hirsutum* reveals that GhPP2-33 regulates salt tolerance. *BMC Genomics*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09546-4>
- Wu, J., & Bisaro, D. M. (2022). Tobacco mosaic virus movement protein complements a Potato spindle tuber viroid RNA mutant impaired for mesophyll entry but not mutants unable to

enter the phloem. *PLoS Pathogens*, 18(12 December).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011062>

Wylie, S. J., Zhang, C., Long, V., Roossinck, M. J., Koh, S. H., Jones, M. G. K., Iqbal, S., & Li, H. (2015). Differential responses to virus challenge of laboratory and wild accessions of Australian species of *Nicotiana*, and comparative analysis of RDR1 gene sequences. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121787>

Ying, X., Bera, S., Liu, J., Toscano-Morales, R., Jang, C., Yang, S., Ho, J., & Simon, A. E. (2024). Umbravirus-like RNA viruses are capable of independent systemic plant infection in the absence of encoded movement proteins. *PLoS Biology*, 22(4 April).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002600>

Zhao, S., Gong, P., Liu, J., Liu, H., Lozano-Durán, R., Zhou, X., & Li, F. (2023). Geminivirus C5 proteins mediate formation of virus complexes at plasmodesmata for viral intercellular movement. *Plant Physiology*, 193(1), 322-338. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad338>

Zhong, X., Yang, L., Li, J., Tang, Z., Wu, C., Zhang, L., Zhou, X., Wang, Y., & Wang, Z. (2022). Integrated next-generation sequencing and comparative transcriptomic analysis of leaves provides novel insights into the ethylene pathway of *Chrysanthemum morifolium* in response to a Chinese isolate of chrysanthemum virus B. *Virology Journal*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/s12985-022-01890-3>

Apéndice

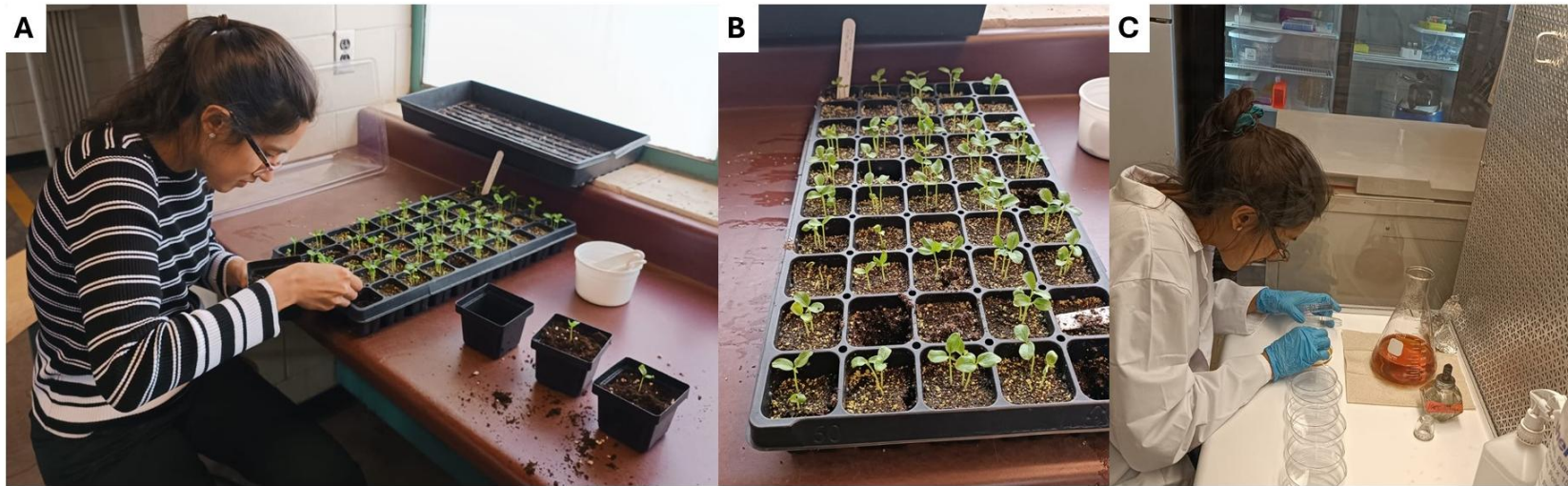
Tabla 7*Cebadores utilizados durante la investigación*

Virus	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' – 3')	Temperatura de anillado	Tamaño del amplicon (nt)	Uso	Referencia
PapDfV1	Carla_GapF1	GGGAGTTACTTGCTGAGCATAG	55°C	226	Detección (deleción entre TGB1-NABP)	Este estudio
	Carla_GapR1	GGTCTGAAGATGCACAAGGACT				
	Carla_GapF2	GACTGGGCAGCAAATTTGGGAA	58°C	298		
	Carla_GapR1	GGTCTGAAGATGCACAAGGACT				
	RepCarla_F4	TCAAACAATGTCTGAGGCACTGC	55°C	600		
	RepCarla_R5	TCTTGCACCTCCTCAATTTGGC				
ZhBV2	Carla_GapF1	GGGAGTTACTTGCTGAGCATAG	55°C	2352	Detección (TGB1-NABP)	Este estudio
	Carla_GapR1	GGTCTGAAGATGCACAAGGACT				
	TGB_F1	TGTCTTCGGTGATCCATTGC		495		

	TGB_R1	GGCAAGCACAACAAGACTAATG C				
	RepCarla_F4	TCAAACAATGTCGAGGCACTGC				
	RepCarla_R5	TCTTGACCTCCTCAATTTGGC		600		
	Nad5_F	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT			Control de	
-	Nad5_R	CTCCAGTCACCAACATTGGCATA A	55°C	180	referencia (endógeno)	(Menzel et al., 2002)
	35s_F	CTATCCTTCGCAAGACCCTTC				(Pasin, 2022)
	VP_R4	TTCAGCGAGGGTTGCTTTATGC		600		
pLX-AS_ PapDfV1	Carla_GapF1	GGGAGTTACTTGCTGAGCATAG				
	Colony_PCR_AT_R 1	AATCAACAATTCCTGCAGGC	55°C	612		
					PCR de colonias	Este estudio
pLX-AS_ ZhBV2	Carla_GapF1	GGGAGTTACTTGCTGAGCATAG				
	Colony_PCR_AT_R 1	AATCAACAATTCCTGCAGGC		2,740		

Figura 3

Crecimiento de plantas de papaya y preparación de medio



Nota. A) y B) Traspaso y preparación de plantas de papaya de dos semanas de edad; C) preparación de medio LB (10-5-5) para crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.