



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

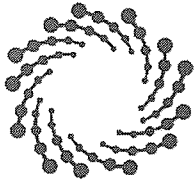
**Estudio del promotor AC2 y secuencias que  
responden al transactivador TrAP en  
begomovirus**

Tesis que presenta  
**Mariana Cantú Iris**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:  
**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

San Luis Potosí, S.L.P., Enero 2019



**IPICYT**

## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis "**Estudio del promotor AC2 y secuencias que responden al transactivador TrAP en begomovirus**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mariana Cantú Iris** y aprobada el veintiuno de enero del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Director de la tesis

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**  
Miembro del Comité Tutorial

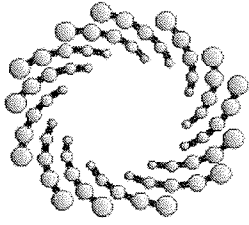
**Dr. Rafael Rivera Bustamante**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 204019 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 104 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de enero del año 2019, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Christian Alberto García Sepúlveda</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Mariana Cantú Iris**

sobre la Tesis intitulada:

*Estudio del promotor AC2 y secuencias que responden al transactivador TrAP en begomovirus*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de enero de 2019.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



El presente trabajo lo dedico a mis padres, por apoyarme y confiar en mí siempre  
A mis hermanos  
A mi esposo  
A mis hijos

A todas las personas que estuvieron conmigo en esa etapa, por enseñarme algo, por estar conmigo, aportando algo para crecer profesional y personalmente

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a la vida por ponerme en lugares y a personas maravillosas

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., por abrirme sus puertas y permitirme crecer profesionalmente

Agradezco al Dr. Gerardo R. Argüello Astorga, por enseñarme y compartir sus conocimientos, por sus esfuerzos para lograr que esto se haga realidad.

Al Dr. Rafael Rivera y a todo su equipo del laboratorio de virología del CINVESTAV Irapuato, por su colaboración y ayuda durante los meses que estuve con ellos

Agradezco a mis padres, por el esfuerzo, la dedicación, por apoyarme siempre.

A mis hermanos, por todos los recuerdos.

Gracias a mi esposo por estar conmigo siempre y apoyarme.

A mis hijos, por ser mi luz.

A todo el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por ser mi hogar durante algunos años. Al Dr. Ángel, Chava, Rosy, Sra. Rosy y todos mis compañeros.

Gracias a todos los maestros que compartieron conmigo su pasión por el conocimiento.

A todos mis compañeros de generación. Por ser más que mis compañeros, por compartir un montón de recuerdos y brindarme su ayuda cuando la necesité.

A todas las personas que conocí durante mi tiempo en el IPICYT, no menciono nombres por miedo a olvidar alguno, pero sin duda todos fueron importantes.

No terminaría de nombrar a todos aquellos a quienes tengo algo que agradecer, a los de antes, a los de entonces y a los de ahora, a los de siempre.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Anexos	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades	1
1.2 Geminivirus	1
1.3 Organización genómica de los begomovirus	4
1.4 Regulación de los genes virales	6
1.5 Genes tempranos. AC1, AC2 y AC3	7
1.5.1 AC1	8
1.5.2 AC2	8
1.5.3 AC3	15
1.6 Genes tardíos. CP, BV1 y BC1	16
1.6.1 CP	16
1.6.2 BV1 y BC1. Genes tardíos presentes en el DNA – B	19
1.6.3 Elementos involucrados en la activación de los genes tardíos	20
1.6.4 Mecanismo de activación mediada por TrAP (AC2)	23
<b>2. Objetivos</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo General	26
2.2 Objetivos específicos	26
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>27</b>
3.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	27
3.2 Purificación de los productos de PCR	27
3.3 Obtención de las construcciones	27
3.4 Delimitación del promotor del gen AC2	28

3.5 Mutaciones puntuales en el promotor AC2 de PepGMV	28
3.6. Construcciones para el estudio el promotor de CP del virus <i>Tomato golden mosaic virus</i> TGMV	29
3.7 Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de células NT1 en suspensión	30
3.8 Cuantificación de la proteína total y cuantificación de GUS	30
3.9 Tinción histoquímica del material vegetal para la detección de GUS	30
3.10 Germinación y crecimiento de las plantas utilizadas	31
3.11 Ensayos de infección	31
3.11.1 Método mecánico. Carborundum	31
3.11.2 Método de biobalística	32
3.12 Extracción de DNA de tejido vegetal	32
3.13 Análisis de Southern blot.	32
<b>4. Resultados</b>	<b>34</b>
4.1 Tema de investigación A. Análisis funcional del promotor AC2 de tres begomovirus pertenecientes a linajes evolutivamente distantes	34
A.1. Generación de promotores AC2 truncados fusionados a un gen reportero	34
A.2. Determinación de la actividad de los promotores (A)C2 truncados	34
A.3 Mutación de un elemento <i>cis</i> – regulador del promotor AC2 de PepGMV	36
A.4 Análisis in planta del virus AC2 <i>cis</i> – mutante	38
A.5 Conclusiones Tema A	43
4.2 Tema de investigación B. Delimitación de la función del Elemento Tardío Conservado (CLE) en la regulación de los genes tardíos de begomovirus	45
B.1 Antecedentes del estudio	45
B.2 Análisis histoquímico de la expresión del gen reportero de las plantas transgénicas	46
B.3 Cuantificación de GUS por fluorometría	48
B.4 Análisis de las plantas transgénicas en presencia de factores virales	51
B.5 Caracterización del CLE en el contexto de su promotor nativo	54
B.6 Conclusiones Tema B	58
4.3 Tema de investigación C. Aislamiento y caracterización molecular de un nuevo begomovirus: <i>Sida Yellow Speckled virus</i>	59
C.1 Obtención del material vegetal	59
C.2 Extracción de DNA, amplificación y caracterización del DNA viral	59
C.3 Análisis de secuencia de los virus encontrados	62
C.4 Obtención de clonas infectivas	63
<b>5. Discusión global</b>	<b>64</b>
<b>6. Referencias</b>	<b>68</b>



## Lista de tablas

1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	2
2. Resumen de los genes presentes en los begomovirus bipartitas.	6
3. Tabla de oligonucleótidos utilizados en el trabajo	36

## Lista de Figuras

1. Organización genómica de las nueve especies de Geminivirus	3
2. Esquema simplificado de la replicación viral	4
3. Esquema de los componentes A y B del virus tipo de los virus bipartitas	5
4. Regulación temporal de los genes virales	7
5. Representación de los transcritos en el sentido complementario del virus TGMV y MYMV	7
6. Análisis de los promotores de ACMV	9
7. Esquema de los transcritos, cajas TATA y sitios de poliadenilación de MYMV.	9
8. Resultados del análisis del promotor de AC2 de MYMV	10
9. Presencia y análisis de los ATG's presentes en el promotor AC2 de TGMV	12
10. Delimitación del promotor de AC2 en TGMV	13
11. Mutaciones en una secuencia importante para la expresión de AC2	14
12. Ensayos de expresión transitoria utilizando diferentes versiones del promotor de CP	17
13. Esquema del consenso de promotores del gen CP de diversos Begomovirus	20
14. Análisis de elementos presentes en promotores sintéticos	22
15. Diagrama de la proteína AC2	23
16. Diagrama de la activación mediada por VP16 en herpesvirus	24
17. Construcción de clonas con mutaciones puntuales dentro del promotor del gen AC2	29
18. Resultados de la cuantificación de las versiones del promotor AC2 del virus <i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	35
19. Resultados de la cuantificación de las versiones del promotor AC2 del virus <i>Pepper golden mosaic virus</i>	35
20. Resultados de la cuantificación de las versiones del promotor AC2 del virus <i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i>	36
21. Mutaciones introducidas en la secuencia necesaria para la producción de TrAP	37
22. PCR para detección de DNA viral y de plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con PepGMV silvestre y mutante	39
23. PCR en tiempo real de las plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas	40
24. RT PCR de las plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas	41
25. Experimento de infección con el virus PepGMV mutante	41
26. Experimento de infección con hemidímeros virales (silvestre y mutante)	42
27. Análisis de la replicación viral mediante Southern blot	43
28. Esquema de construcciones generadas para la transformación de plantas de tabaco	46
29. Tinciones histoquímicas de tejido vegetal de plantas de tabaco transgénicas con multímeros del CLE.	47
30. Tinciones del tejido vegetal de las plantas de tabaco transgénicas que tienen al CLE asociado a otro elemento	48
31. Resultados de la cuantificación de la actividad de	49

GUS en las plantas transgénicas con multímeros del CLE	
32. Resultados de la cuantificación de la actividad de GUS en las plantas transgénicas con combinación del CLE y otros elementos	50
33. Infección de las plantas 46s Tallo CLE con el virus PepGMV	51
34. Cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46sCLE-G	52
35. Cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46sTallo-CLE	53
36. Cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46s 3CLE	53
37. Cuantificación de la actividad del gen reportero GUS en plantas de tabaco transgénico en presencia o ausencia de una fuente de TrAP	54
38. Construcciones generadas del promotor de CP de TGMV fusionadas al gen reportero GUS	55
39. Cuantificación de la actividad del GUS en versiones truncadas del promotor CP de TGMV	56
40. Cuantificación de la actividad del GUS en versiones del promotor de CP de TGMV	57
41. Patrones de restricción del componente A utilizando las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>Hinfl</i>	60
42. Patrones de restricción del componente B digeridas con <i>EcoRI</i> y <i>Hinfl</i>	61
43. Alineamientos de las regiones intergénicas de los componentes A y B de diversos OkYMMV	62

## Anexos

a.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	72
a.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	72
a.3 Extracción de DNA plasmídico por el método de Birnboim	72
a.4 Preparación de protoplastos de células NT1 para ensayos de expresión transitoria	73
a.5 Electroporación de protoplastos de células NT1	74
a.6 Ensayo de actividad de GUS ( <i>uidA</i> ), adaptado para Fluorómetro lector de microplacas	76
a.7 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	78
a.8 Cultivo de células de tabaco (Línea <i>NT1</i> )	79
a.9 Inoculación viral de plantas por el método de biobalística	80
a.10 Extracción de DNA de plantas	81
a.11 Tinción histológica para GUS	81
a. 12 Artículo generado	83

## Resumen

### Estudio del promotor AC2 y secuencias que responden al transactivador TrAP en begomovirus

Los miembros del género *Begomovirus* son los virus de plantas más diversificados y constituyen un factor limitante para la producción agrícola en todas las regiones cálidas del mundo. En este trabajo abordamos aspectos relacionados con el gen *AC2/C2/TrAP* de los begomovirus (BGVs), que codifica a la proteína TrAP, un activador transcripcional de los genes tardíos del virus. El gen *AC2* se traslapa con otros dos genes virales, *AC1* y *AC3*; y su promotor reside en un segmento codificante del genoma viral. Dos trabajos previos mostraron que el promotor *AC2* de MYMV y TGMV, dos BGVs modelo, se traslapa con la mitad 5' del gen *AC1* (*Rep*). Para obtener un mayor conocimiento del promotor (*AC2*), generamos varias versiones truncadas del mismo en tres BGVs diferentes, fusionados al gen reportero GUS. Los análisis funcionales mostraron que la versión más corta (~300 bp) de los promotores de OkYMMV y TYLCV presenta la mayor actividad relativa, lo que indica que los elementos críticos se localizan en la región proximal del promotor. En esa región se localiza una secuencia conservada de 9 pb, que fue identificada en un estudio previo como sitio de unión de un factor transcripcional de la planta. Generamos mutaciones silenciosas en ese elemento dentro del promotor *AC2* de PepGMV, y evaluamos su impacto sobre la capacidad infectiva del virus. El efecto fue drástico, pues no se detectó DNA viral en las hojas nuevas en ninguna de las 19 plantas inoculadas con el virus mutante. Este fenotipo no fue causado por una alteración de la proteína Rep, ya que el mutante conservó la capacidad de autorreplicarse al mismo nivel que el virus silvestre. En este estudio analizamos plantas transgénicas con promotores sintéticos que contienen de una a 6 copias del CLE ("Conserved Late Element"). Se demostró que los CLEs son reconocidos por factores de la planta, pues el gen reportero se expresó a niveles elevados en ausencia de proteínas virales. Esa expresión se incrementó con la infección viral. La demostración más clara de que el CLE es un elemento de respuesta a TrAP la obtuvimos analizando el promotor *CP* de TGMV, otro BGV modelo. El promotor truncado en la posición -125 fue transactivado por TrAP, pero la mutación del CLE abolió la respuesta a TrAP; más aún, la adición de un CLE sintético al extremo 5' del promotor -125 potenció el nivel de transactivación por el factor viral. Estos resultados demuestran que el CLE es, efectivamente, un elemento de respuesta a TrAP. Finalmente, realizamos un análisis comparativo muy amplio de los promotores *CP* de geminivirus, e identificamos un elemento complejo conservado de 20-25 pb que exhibe simetría de díada parcial. Este elemento bipartita fue denominado TACE ("TATA box-associated composite element"), y contiene o se asocia a CLEs en la mayoría de los BGVs descritos a la fecha. Proponemos que el TACE está involucrado en la desrepresión del gen *CP* en el tejido vascular de las plantas, un proceso mediado por TrAP.

**Palabras Clave:** transactivador viral, genes tardíos, regulación transcripcional, evolución viral.

## Abstract

### Study of the AC2 promoter and sequences that respond to the TrAP transactivator in begomovirus

Members of the genus *Begomovirus* are the most diversified plant viruses (> 430 species) and constitute a limiting factor for agricultural production in all warm regions of the world. In this work we address several aspects related to the *AC2/C2/TrAP* gene of the begomoviruses (BGVs), which encodes the TrAP protein, a transcriptional activator of the virus late genes. The *AC2* gene overlaps with two other viral genes, *AC1* and *AC3*; and its promoter resides in a coding segment of the viral genome, which has made its study difficult. Two previous works showed that the *AC2* promoter of MYMV and TGMV, two BGV models, overlap with the 5' half of the *AC1 (Rep)* gene. To obtain a better knowledge of the (A)C2 promoter, we generated several truncated versions of it in three different BGVs, fused to the GUS reporter gene. The functional analyzes showed that the shorter version (~300 bp) of the OkYMMV and TYLCV promoters displays the highest relative activity, hence indicating that the critical regulatory elements are located in the promoter proximal region, where a conserved sequence of 9 bp is located, which was identified in a previous study as the binding site for a plant transcription factor. We generate silent mutations in that element within the *AC2* promoter of PepGMV, and we evaluate its impact on the infective capacity of the virus. The effect was drastic, since no viral DNA was detected in the new leaves in any of the 19 plants inoculated with the mutant virus. This phenotype was not caused by an alteration of the Rep protein, since the mutant retained the ability to self-replicate at the same level as the wild-type virus. The TrAP protein regulates the expression of late genes by mechanisms that are not fully understood yet. In this study we analyze transgenic plants with synthetic promoters that contain from one to 6 copies of the CLE ("Conserved Late Element"). It was shown that CLEs are recognized by plant factors, since the reporter gene was expressed at high levels in the absence of viral proteins. That expression increased with the viral infection. The clearest demonstration that the CLE is a TrAP responsive element was obtained by analyzing the *CP* promoter of TGMV. The truncated promoter at position -125 was transactivated by TrAP, but the CLE mutation abolished the response to the viral transactivator; moreover, the addition of a synthetic CLE to the 5'-end of the -125 promoter increased the level of transactivation by the viral factor. These results showed that the CLE is, effectively, an element of response to TrAP. Finally, we performed a very broad comparative analysis of the *CP* promoters of geminiviruses, and we identified a conserved complex element 20-25 bp long, that exhibits partial dyad symmetry. This bipartite element was named TACE ("TATA box-associated composite element"), and it contains or is associated with CLEs in most of the BGVs described to date. We propose that TACE is involved in the derepression of the *CP* gene in the plant vascular tissues, a process mediated by TrAP.

**Key words:** viral transactivator, late genes, transcriptional regulation, virus evolution.

# 1. Introducción

## 1.1- Generalidades

En el mundo de los virus que infectan plantas, la mayoría de las familias poseen genomas de RNA, y son pocos los grupos que poseen genomas de DNA, contrastando con los virus que infectan procariotes, vertebrados e invertebrados, los cuales son, en su mayoría virus de DNA (Hull, 2014). En la actualidad se reconocen 3 familias de virus con genomas de DNA que infectan plantas: *Caulimoviridae* (virus de DNA de doble cadena), *Nanoviridae* y *Geminiviridae* (éstas últimas dos familias con genomas circulares, de cadena sencilla) (Briddon, 2006)

Los geminivirus poseen genomas bipartitas o monopartitas, en tanto que los nanovirus tienen genomas multipartitas, algunos de ellos con 8 o más componentes genómicos [Gronenborn, 2009] lo que representa otra diferencia importante con los virus que infectan procariotes, vertebrados e invertebrados, que poseen, por lo general, genomas monopartitas. Los geminivirus figuran entre los fitovirus económicamente más importantes y mejor caracterizados a nivel molecular, y cuentan con varias características especiales como poseer un genoma circular de DNA pequeño, y el utilizar un intermediario de DNA de doble cadena durante su replicación, además de que se han desarrollado métodos eficientes de inoculación independiente del vector. Es por esto que los geminivirus han sido usados como una herramienta para el estudio de la regulación de la expresión génica y la replicación del DN en plantas (Rojas, et al., 2005).

## 1.2- Geminivirus

La familia *Geminiviridae* incluye virus que infectan una amplia variedad de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, causando severas pérdidas en cultivos económicamente importantes. Estos virus se caracterizan estructuralmente por una partícula geminada (dos icosahedros fusionados parcialmente) de un tamaño aproximado de 18-30nm, y genéticamente por

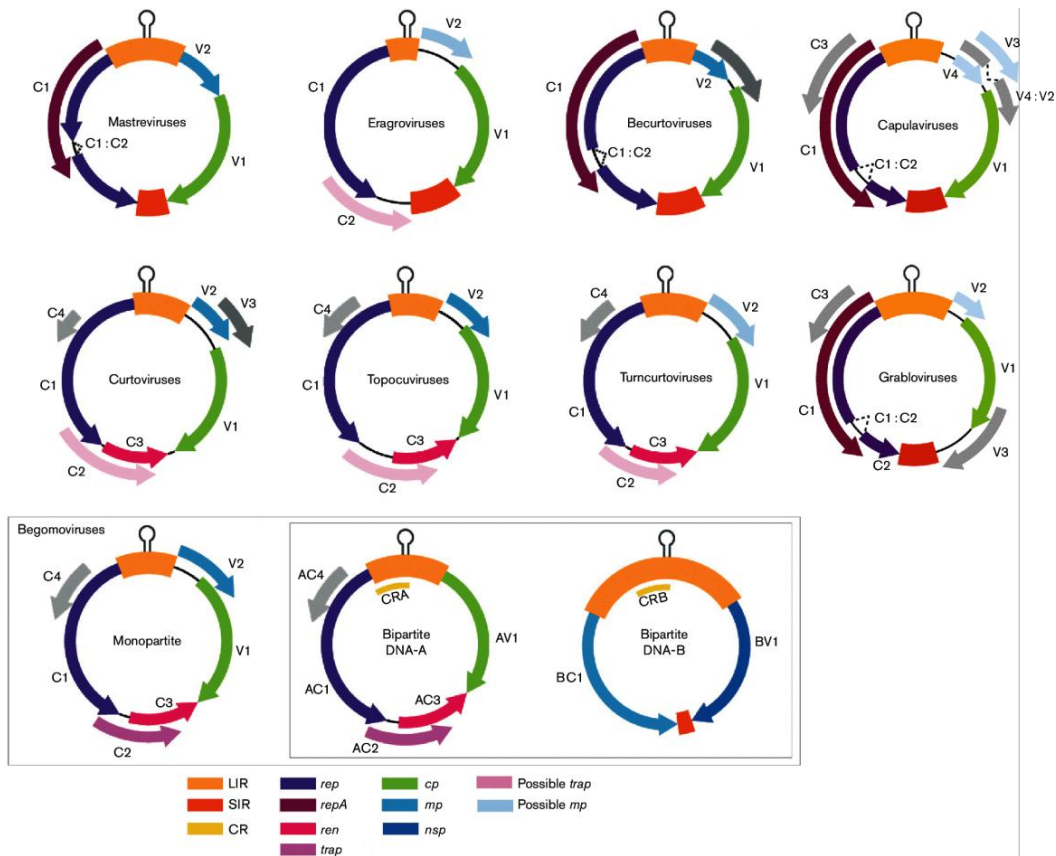
poseer un genoma compuesto por una o dos moléculas de DNA circular de cadena sencilla, de 2.5kb-3.0kb (Gutierrez, 2000).

En base a la organización genética, el insecto vector que los transmite y el tipo de hospedero, los geminivirus, se dividen actualmente en 9 géneros, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Glabovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, y *Turncurtovirus* (Varsani A.et al, 2014, Zerbini et al., 2017). (Tabla 1)

**Tabla 1.** Clasificación de la familia *Geminiviridae*

<b>Género</b>	<b>Genoma</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Vector</b>
Becurtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas ( <i>Cicadellidae</i> )
Begomovirus	Monopartita y Bipartita	Dicotiledóneas	Mosquita blanca ( <i>Bemisia tabaci</i> )
Capulavirus	Monopartita		Áfidos
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas ( <i>Cicadellidae</i> )
Eragrovirus	Monopartita	Monocotiledoneas	
Glabovirus	Monopartita		
Mastrevirus	Monopartita	Monocotiledóneas y Dicotiledóneas	Chicharritas ( <i>Cicadellidae</i> )
Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Membrácidos ( <i>Membracidae</i> )
Turncurtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharrita ( <i>Cicadellidae</i> )

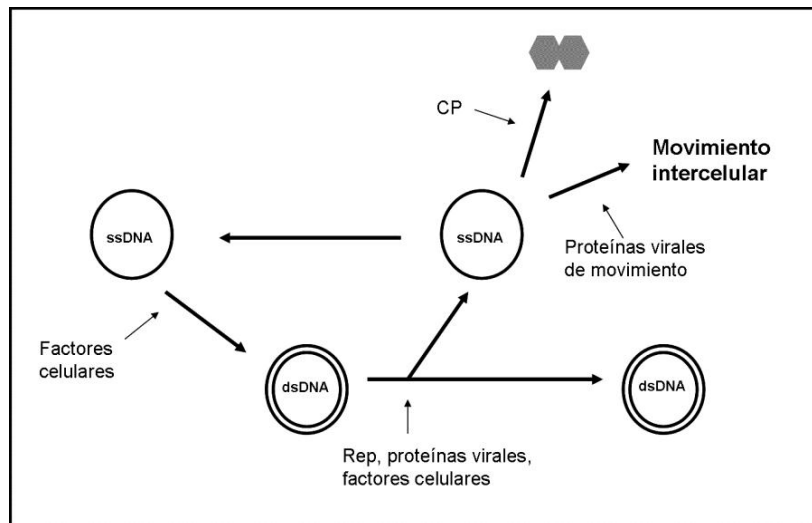




**Figura 1.** Organización genómica de los nueve géneros de la familia *Geminiviridae*. Genes codificados por los miembros de cada uno de los nueve géneros reconocidos en la actualidad (Reproducido de Varsani, 2014)

Entre las proteínas codificadas por los geminivirus no se encuentra una DNA o RNA polimerasa (Figura 1), por lo que dependen completamente de la maquinaria de replicación de las células del hospedero para multiplicar sus genomas. El proceso de la replicación se divide básicamente en tres etapas (Figura 2), en la primera etapa el DNA de cadena sencilla (ssDNA) es convertido en DNA de cadena doble (dsDNA); esta parte del ciclo replicativo es llevada a cabo enteramente por la maquinaria de replicación de la planta, y el dsDNA es ahora el intermediario para la transcripción de los genes virales tempranos. En la segunda etapa el nuevo dsDNA es usado para la formación de más dsDNA, lo que se lleva a cabo por el mecanismo de replicación conocido como Círculo Rodante (RCR), para lo que es necesaria la participación de la proteína viral Rep; y finalmente la tercera etapa, que consiste en la producción de nuevo ssDNA, el cual puede ser transportado a

las células vecinas para extender la infección, o ser encapsulado y transportado por el vector a otra planta (Gutiérrez, 2000).



**Figura 2.** Esquema simplificado de la replicación viral. (Modificado de Gutiérrez, 2000)

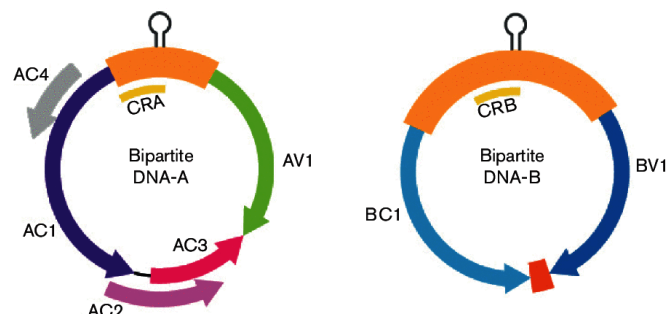
Además de utilizar la maquinaria de replicación del hospedero, existe evidencia de que estos virus alteran el ciclo celular de las células que infectan, haciéndolos un buen modelo para estudiar tanto la replicación como el ciclo celular de las plantas.

A fines del año 2017 el número de especies incluidas en cada uno de los géneros de la familia *Geminiviridae* eran los siguientes: más de 380 begomovirus, 2 becurtovirus, 4 capulavirus, 3 curtovirus, 37 mastrevirus, 2 turncurtovirus, y una sola especie en los géneros *Eragrovirus*, *Grablovirus* y *Topocuvirus*, según la página WEB del Internacional Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Como se puede apreciar, el subgrupo más grande y de mayor importancia económica de los geminivirus es el de los begomovirus, el cual será descrito con mayor detalle en las siguientes secciones.

### 1.3- Organización genómica de los begomovirus

Los begomovirus poseen genomas de DNA pequeños, compuestos por una o dos cadenas circulares de DNA monocatenario de 2.6 a 3.0 Kb, es decir.

pueden tener uno o dos componentes genómicos denominados DNA-A y DNA-B (Figura 3). Ambos componentes genómicos comparten una región de aproximadamente 200 pb denominada Región Común (RC) en la cual se encuentra localizado el origen de replicación, un segmento de ~30 pb compuesto por una secuencia de 9 nucleótidos conservada en todos los geminivirus (TAATATTAC) flanqueada por dos repetidos invertidos ricos en GCs, que le confiere la capacidad de formar una estructura tallo-asa ( Argüello-Astorga et al., 1994). El nonúmero es reconocido por la proteína viral Rep que realiza un corte endonucleolítico entre el octavo y noveno nucleótido, para de esta forma iniciar la replicación por círculo rodante. Además del origen de replicación, en la región intergénica se encuentran dos promotores divergentes que controlan la transcripción de los genes virales en el sentido de la cadena del virión (+) y en la cadena complementaria (-). Los RNAs virales son poliadenilados e inician ~30 pb corriente abajo de la caja TATA, lo que indica que la transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa II del huésped (Shung & Sunter, 2009).. La transcripción en el sentido complementario del virión del componente genómico A, a diferencia de la que se realiza en el sentido positivo, es compleja, ya que consiste en múltiples RNAs traslapados con diferentes extremos 5', pero todos tienen el mismo extremo 3' terminal, y son potencialmente multicistronicos (Tu & Sunter, 2007).



**Figura 3.** Esquema de los componentes A y B de los virus bipartitos (Reproducido de Varsani, 2014)

En el componente genómico A se encuentran codificadas las proteínas relacionadas a la replicación, la regulación de los genes tardíos del virus, varios supresores de la respuesta de silenciamiento génico, y la encapsidación del

DNA viral, mientras que en el componente B se codifican las proteínas relacionadas con el movimiento del DNA viral, tanto intracelular como intercelular y sistémico.

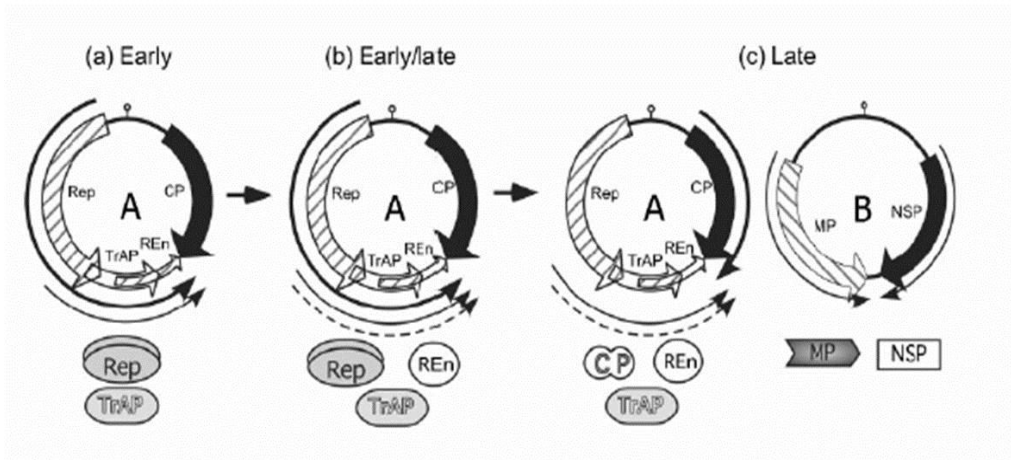
**Tabla 2.** Resumen de los genes presentes en los begomovirus bipartitas. En gris los genes presentes en el componente A y en morado los genes codificados en el componente B

Gen	Proteína	Tamaño (Aa)	Función
AV1	CP	254	Encapsidación
AV2	AV2	116	Estabiliza el ssDNA (TLCV)
AC1	Rep	345	Inicia la replicación viral
AC2	TrAP	130	Activación de los genes tardíos, supresión del silenciamiento
AC3	REn	132	Potencia la replicación viral
AC4	AC4	87	Supresor del silenciamiento
BV1	NSP	256	Movimiento intracelular
BC1	MP	281	Movimiento célula-célula

#### 1.4- Regulación de los genes virales: una regulación temporal

La mayoría de los virus tienen una expresión génica que se regula estrictamente en el tiempo, en el curso de la infección. Usualmente los primeros genes que son expresados son los que están involucrados en la replicación viral y en la trans-activación de los genes virales tardíos, mientras que los genes que codifican proteínas estructurales son expresados en etapas tardías de la infección. Un ejemplo típico de este tipo de regulación es el que presenta el virus SV40 (*Simian vacuolating virus 40*) cuyas regiones codificantes se dividen en regiones tempranas y tardías (Rosenthal, 1977)

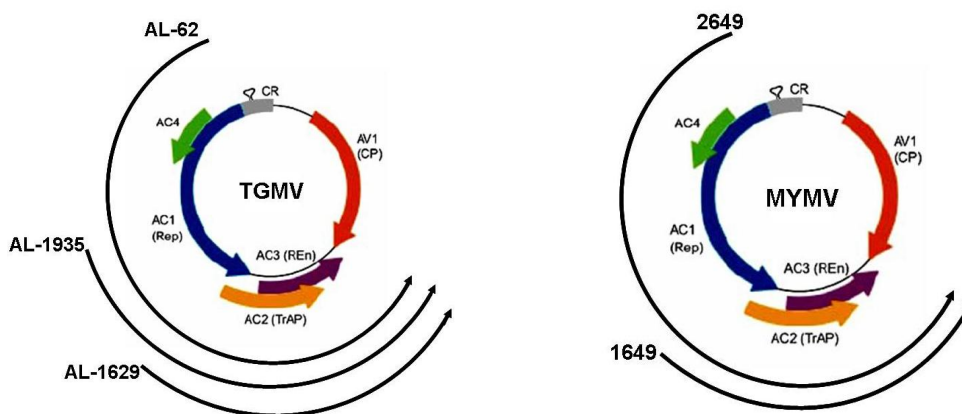
En los BGVs la transcripción de los genes virales es finamente regulada, de tal forma que los genes involucrados en los procesos de replicación y regulación génica son expresados en la etapa temprana del ciclo infectivo, mientras que los genes relacionados con la encapsidación y el movimiento del DNA viral se expresan en la fase tardía de la infección (Shimada-Beltran & Rivera-Bustamante, 2007). Las alteraciones en este sistema de regulación abortan la infección viral.



**Figura 4.** La regulación de los genes begomovirales es llevada a cabo de una manera temporal, de acuerdo con la etapa de la infección. (Reproducido de Shimada-Beltrán, y Rivera-Bustamante, 2007)

### 1.5- Genes tempranos. AC1, AC2 y AC3

Aún siendo genes considerados tempranos, cada uno de ellos es regulado de manera especial. Estos tres genes se encuentran en el sentido complementario del virión y sus ORF están traslapados, por lo que su regulación es compleja y consiste en múltiples transcritos con diferentes extremos 5' pero con el mismo extremo 3' terminal (Figura 5) (Shung & Sunter, 2009; Shivaprasad et al., 2005). A continuación se describe como es la regulación de cada uno de ellos.



**Figura 5-** Representación de los transcritos en el sentido complementario de los virus TGMV y MYMV.

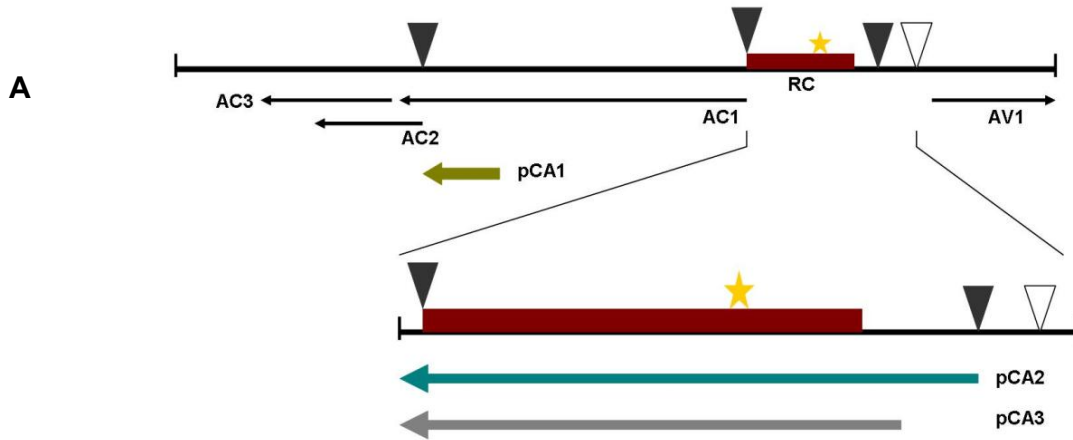
### **1.5.1- Gen AC1.**

La única proteína viral necesaria para la replicación es la proteína Rep, y la cual es codificada por este gen. Otra función descrita para esta proteína es la interacción con la proteína relacionada al retinoblastoma (RBR); ésta interacción provoca la transición de la célula de la fase G a la fase S, la cual es replicativamente activa, y permite la replicación viral (Hanley-Bowdoin et al., 2004).

En el virus TGMV la proteína AC1 regula negativamente la expresión de su propio gen mediante la interacción con un sitio de unión que se encuentra entre el inicio de la transcripción para AC1 (AL62) y la caja TATA ( Shung-et al., 2006). El sitio del promotor que es reconocido por AC1 es la secuencia conocida como iteron, y de ésta manera es bloqueada la transcripción. Los iterones son elementos de 8 a 12 nucleótidos, los cuales están repetidos de 3 a 6 veces dentro de la Región Común. La secuencia nucleotídica de los iterones generalmente es virus específica, pero su arreglo es conservado entre los virus que pertenecen a un mismo linaje, y ha sido señalados como los responsables de la especificidad replicativa entre los dos componentes de los virus bipartitas, de manera que la Rep de un virus no puede replicar el componente genómico B de un virus que posee una secuencia iterativa diferente ( Argüello-Astorga et al., 1994).

### **1.5.2- Gen AC2.**

A diferencia de lo que se conoce sobre la regulación del gen *AC1*, los mecanismos por los cuales se regula el gen *AC2*, no están bien definidos al presente. Uno de los primeros estudios realizados en este tema fue realizado en el virus *African cassava mosaic virus* (ACMV), que mostró que secuencias al extremo 5' del inicio del gen *AC2* pueden estar regulando su expresión con una fuerza tres veces menor a la que se observó para el promotor de *AC1* (Zhan et al.,1991) (Figura 6). Sin embargo no fue claro si el promotor dirige la expresión de *AC2*, de *AC3* o de ambos, ya que los experimentos fueron hechos con fusiones transcripcionales con el gen reportero GUS.

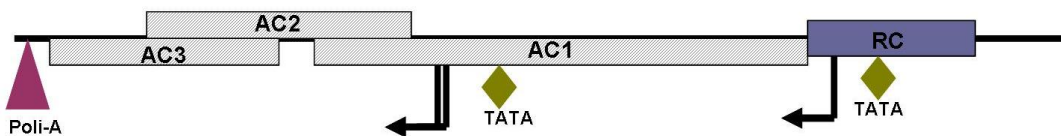


**B**

Construcción	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
pCA1	40.9	37.7	25.9
pCA2	100	100	100
pCA3	88.8	73.4	81.5

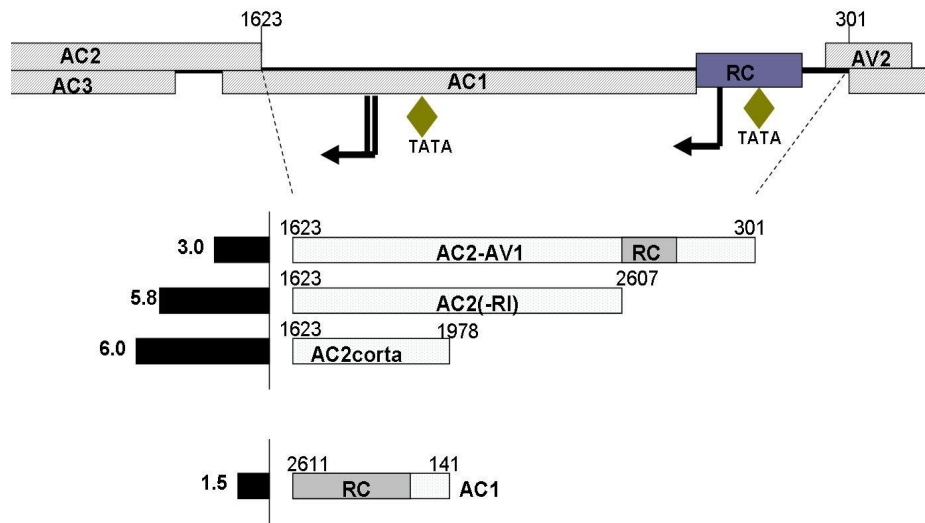
**Figura 6.** Análisis de los promotores de ACMV. A) Esquema del DNA-A de ACMV. En flechas negras se representan los genes codificados en este componente genómico; el rectángulo guinda representa la Región Común (RC); el origen de replicación es representado con la estrella. Los triángulos representan los sitios 5'CAP (reellenos para el sentido complementario y vacíos en el sentido del virion). Las flechas de colores representan las secuencias probadas como posibles promotores. B) Resultados de experimentos en los que se probaron las diferentes construcciones en protoplastos de células de *N. clevelandii*. Los valores fueron normalizados con la construcción que presentó una mayor actividad, pCA2, para el cual, el valor es 500pmol de MUG/mg de proteína/min. (Modificado de Zhan et al., 1991)

En un reporte posterior, se mapearon dos transcritos principales en el sentido complementario del virion de MYMV (*Mungbean yellow mosaic virus*), además de los sitios de poliadenilación y las cajas TATA (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de los transcritos, cajas TATA y sitios de poliadenilación de MYMV. Las flechas negras representan el inicio de los dos transcritos principales producidos en esta orientación viral, los rombos verdes representan la localización de las cajas TATA y el rectángulo lila representa el sitio de poliadenilación (de Shivaprasad et al., 2005).

Además de localizar sitios de inicio de transcripción en este virus, mediante experimentos realizados en protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*, se mapeo un promotor fuerte dentro del ORF de AC1, el cual está dirigiendo la expresión de los genes AC2 y AC3. Para hacer los experimentos se utilizaron fusiones traduccionales de ambos genes con el gen reportero CAT (*cloranfenicol acetiltransferasa*). Se probaron varias construcciones que difieren en la longitud del posible promotor (Figura 8)



**Figura 8.** Promotor AC2 de MYMV. Resultados de experimentos de expresión transitoria de las diferentes versiones del posible promotor de AC2. Los números indican la ubicación de los extremos de la secuencia probada como promotor. Las barras negras son los resultados de la cuantificación del gen reportero CAT (de Shivaprasad et al., 2005).

Estos resultados revelaron la existencia de un promotor fuerte dentro de las 346 pares de bases corriente arriba del codón inicial del gen AC2 (Shivaprasad et al., 2005)

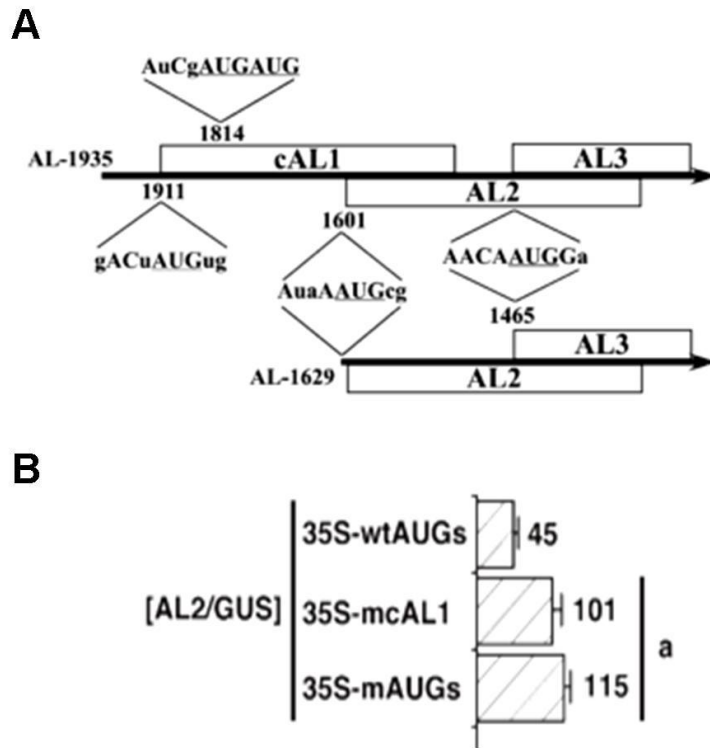
Otro modelo viral en el que se ha estudiado la regulación de AC2 es TGMV (*Tomato golden mosaic virus*). Al igual que en MYMV, en TGMV han sido reportados múltiples transcritos (tres: AL – 62, AL – 1935 y AL – 1629) (Figura 9) en el sentido complementario, que podrían producir a la proteína TrAP. Existen datos de traducción *in vitro* en los que se demuestra la traducción de AC1, AC2, AC3 y AC4 de un mismo mRNA polcistronico (Thömmes & Buck,



1994). Sin embargo plantas transgénicas de tabaco que expresan el RNA que potencialmente codifica a las cuatro proteínas, son capaces de complementar al mutante TGMV *ac1* y *ac3* en un 100% de los casos, pero solo complementa al mutante TGMV *ac2* en bajos porcentajes (0%-25%) (Hanley-Bowdoin, et al.,1989).

La regulación a la que está sujeto el gen AC2 se ve influenciada por la regulación que la proteína Rep ejerce sobre la actividad de su propio promotor (regulación negativa) ya que se ha demostrado que la reducción del transcrito que produce a Rep es requerida para la subsecuente expresión de los genes que se encuentran corriente abajo (AC2 y AC3)(Shung & Sunter, 2007).

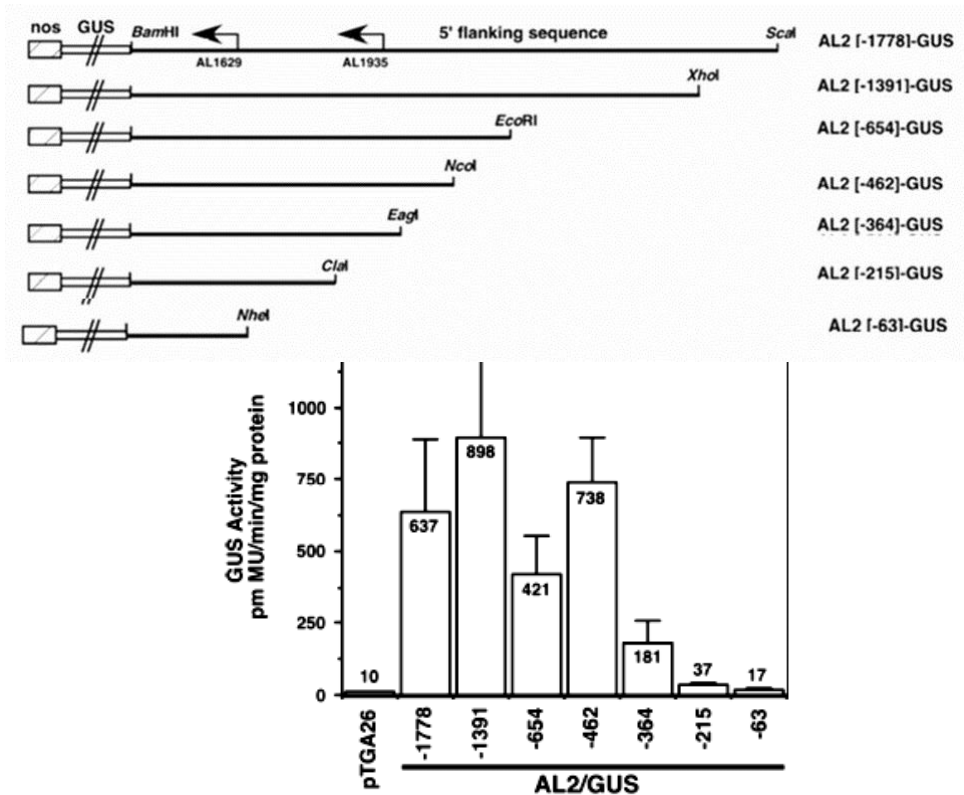
Por otra parte, la regulación de la expresión de AC2 depende también de la regulación del transcrito mediano (AL-1935) al menos en el caso de TGMV. Cuando se analizó la secuencia de este transcrito, se encontró un ORF que es capaz de codificar 122 aminoácidos del dominio carboxilo terminal de Rep; además fueron identificados otros dos ATGs adyacentes uno del otro que se encuentran antes del inicio del gen AC2; ambos son capaces de codificar pequeños péptidos (de más de ocho aminoácidos). A diferencia de lo observado en el transcrito AL-1629 del que se sabe que es codificada ésta proteína, ya que el ATG de AC2 es el primero que se encuentra en él (Figura 9). Para analizar la posibilidad de que la presencia de éstos ORFs antes del inicio de AC2 estén afectando su expresión, se llevaron a cabo experimentos en los cuales fueron mutados los distintos ATGs; por una parte el ATG que da origen al dominio C-terminal de Rep, y en una construcción diferente se realizó la mutación de los 3 ATGs; ambas construcciones en el contexto del transcrito AL-1935 y utilizando el promotor 35S de CaMV. Estas construcciones fueron transfectadas en protoplastos de *N. benthamiana*, y se realizó la cuantificación de la expresión del gen reportero GUS (Figura 9) (Shung & Sunter, 2009).



**Figura 9.** ATGs presentes en el 5' UTR de AL-1935 afectan la expresión de AC2. A) Mapa de la ubicación de los ATGs presentes en ambos transcritos B) Resultados del experimento de expresión transitoria de las mutantes en estos ATGs. Las barras representan la actividad del gen reportero GUS (Reproducido de Shung y Sunter, 2009)

Con estos resultados se demostró que la expresión de TrAP es regulada por distintas vías, y que todos estos puntos de regulación impiden su traducción de algunos transcritos que podrían producir esa proteína.

Mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos de una línea celular de *N. benthamiana*, se analizaron diferentes construcciones que variaban en longitud hacia el extremo 5' del posible promotor de AC2 y haciendo la fusión traduccional de éste ORF con el gen reportero GUS (Figura 10)

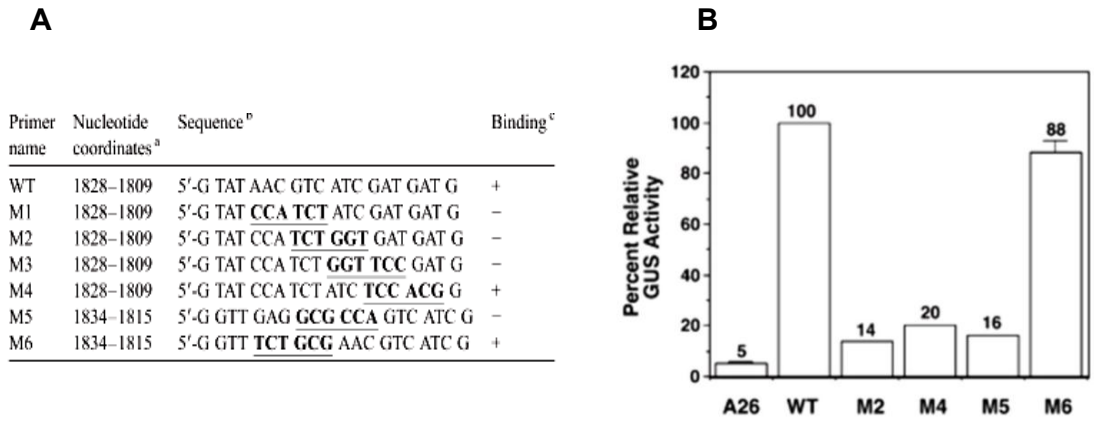


**Figura 10.** Delimitación del promotor de AC2 en TGMV. A) Esquema de las diferentes construcciones utilizadas. B) Resultados de la cuantificación del gen reportero en cada una de las construcciones analizadas (Reproducido de Shung y Sunter, 2009)

Como se puede apreciar en la figura anterior, las secuencias corriente arriba del ORF de AC2 se componen de una serie de elementos, tanto reguladores positivos como negativos, que vuelven complejo al promotor, pero las secuencias importantes para la expresión de AC2 fueron encontradas entre 160 y 462pb corriente arriba del inicio de la traducción del gen (Shung-et al., 2006).

Una de las características de los promotores es la capacidad que tienen de unir específicamente proteínas, como factores de transcripción, por lo que se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética, en los cuales se identificó en este mismo virus (TGMV) una secuencia de 9 nt que se encuentra localizada en la posición 1824-1816 en el DNA-A, que es unida específicamente por proteína(s) nuclear(es), que podrían ser factores de transcripción de hospedero. Esta secuencia (AACGTCATC) se encuentra localizada en la región -187/-195pb corriente arriba del inicio del mensajero que

produce a TrAP. Además de ser identificada, la secuencia de 9 pb mencionada fue analizada funcionalmente, mediante mutagénesis dirigida. Las mutantes obtenidas fueron evaluadas con respecto a su capacidad de unión a proteínas nucleares, su influencia en la producción del transcrito, así como en la expresión del gen AC2 (Figura 11)



**Figura 11.** Mutaciones en una secuencia importante para la expresión de AC2. A) Tabla que muestra las mutaciones introducidas y su influencia en la unión específica a proteínas del hospedero B) Actividad del promotor AC2 de las construcciones con las mutaciones en la secuencia fusionada al gen reportero GUS.

Como se observa en los resultados anteriores, la capacidad de la secuencia nonamérica conservada en este promotor, de unir proteínas del hospedero se puede correlacionar con el nivel de expresión de AC2, ya que los únicos casos en los que una mutante no pierde la capacidad de unión, son las mutantes M5 y M6, pero en M5 a pesar de seguir uniéndose a proteínas del hospedero, no es capaz de expresar al gen reportero a los mismos niveles que lo hace el WT o la mutante M6. Estos resultados confirman la presencia de una secuencia esencial para la expresión de AC2 a partir del mensajero más corto (Tu & Sunter, 2007).

### 1.5.3- Gen AC3.

Así como para AC2, los mecanismos por los cuales es regulado el gen que codifica para un potenciador de la replicación (REn), AC3, continúan siendo

poco claros. Además de los transcritos ya identificados en los diferentes virus en lo que se ha estudiado la regulación de estos promotores, no se ha descrito ningún transcrito capaz de codificar solamente a AC3, y no se ha encontrado evidencia de que se lleve a cabo “splicing” de alguno de los transcritos ya reportados. Los estudios para conocer la regulación de este gen han sido llevados a cabo de la misma forma que los realizados para AC2.

La proteína REn (el producto del gen AC3) a diferencia de TrAP, puede ser producida a partir de más de un transcrito, como se describió para el virus TGMV. Tanto en experimentos de expresión transitoria con diferentes versiones del posible promotor, como usando plantas transgénicas con los tres transcritos en el sentido complementario, se demostró que la proteína REn puede ser traducida de todos ellos. En los ensayos de expresión transitoria, se localizó una secuencia importante para la producción del transcrito del que es producida solamente esta proteína (AL-1935), además de que se observó que esta proteína puede ser producida también por el transcrito del cual se traduce AC2; por otra parte, se generaron plantas transgénicas de *N. benthamiana* con el transcrito mediano (AL-1935) y mediante ensayos de complementación de función, usando un virus mutante en el gen AC3, se demostró que plantas que llevan este transcrito, son capaces de complementar a las mutantes TGMV *ac3* (Shung et al., 2006). En reportes anteriores utilizando experimentos similares con plantas transgénicas, se demostró la capacidad de complementar la función del gen AC3, del transcrito largo AL-62 en el 100% de los casos (Hanley-Bowdoin et al., 1989).

#### **1.6- Genes tardíos: CP, BV1 y BC1**

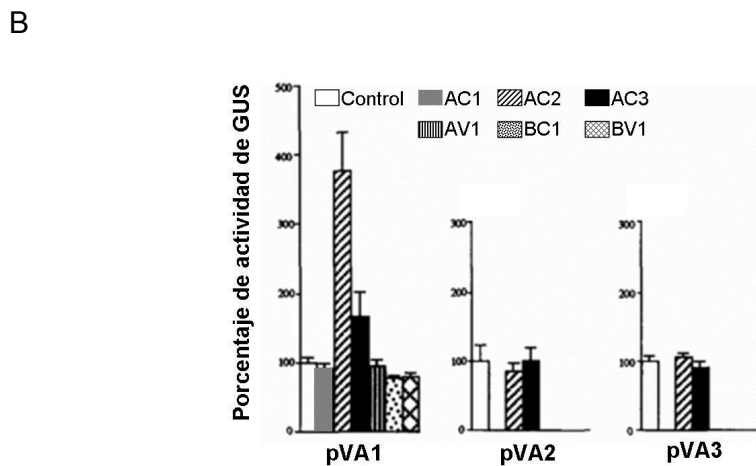
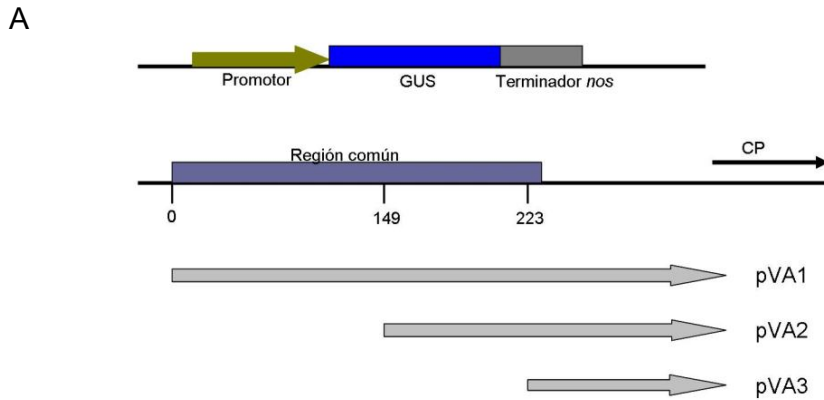
Como ya se mencionó, los begomovirus siguen un patrón de expresión génica controlada a través del tiempo, lo cual divide a los genes virales en tempranos y tardíos. En esta sección revisaremos los mecanismos hasta ahora conocidos por los que son regulados los tres genes tardíos de los begomovirus bipartitas: CP, y los genes BV1 y BC1, los cuales se encuentran codificados en el componente B.

### **1.6.1- Regulación de los genes tardíos. CP**

En los virus bipartitas ambos componentes comparten la llamada región común, dentro de la cual se localiza el origen de replicación y parte de dos promotores divergentes

La proteína CP no es requerida para la infección, pero cuando la proteína no está presente, los síntomas de la infección son atenuados o se tardan en aparecer (Yaakov, 2011). En ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco se observó un mismo fenotipo cuando se analizaron mutantes de CP y del gen AC2, esto es, una baja acumulación de la proteína de la cápside, lo cual sugería que el producto de AC2 es necesario para la activación de la expresión de CP.

Uno de los primeros estudios que se realizaron para ver la influencia de cada una de las proteínas virales sobre la actividad de este promotor se hizo en protoplastos utilizando al virus *African cassava mosaic virus* (ACMV). En este estudio se realizaron diversas construcciones, utilizando los promotores bidireccionales presentes en la región intergénica del componente A, fusionados al gen reportero GUS (Figura 12)



**Figura 12.** Ensayos de expresión transitoria utilizando diferentes versiones del promotor *CP*. A) Esquema de las construcciones utilizadas en el estudio B) Porcentajes de actividad del gen reportero en los ensayos de expresión transitoria en las diferentes construcciones del promotor de *CP* con cada una de las proteínas virales (reproducido de Haley et al., 1992)

Como se observa en la gráfica, el resultado más interesante se obtiene al utilizar la versión más larga del promotor en presencia de la proteína AC2 (TrAP). Esta fue una de las primeras evidencias de que AC2 aumenta la expresión del promotor de *CP* y sugirió que el gen *CP* es un gen tardío (Haley et al., 1992)

Años después se hicieron varios estudios sobre el promotor *CP* de un virus diferente, TGMV, empleando un sistema diferente. Se generaron plantas transgénicas de *N. benthamiana* portadoras de construcciones con variantes truncadas del promotor *CP*, fusionado traduccionalmente a GUS. Los resultados fueron similares a los que habían sido observados anteriormente, la

presencia de la proteína transactivadora incrementó la actividad del promotor de *CP* (Sunter & Bisaro, 1997).

La capacidad del promotor de *CP* de responder a TrAP fué demostrada en sistemas transitorios de expresión, pero años más tarde esta misma capacidad se observó en plantas transgénicas de tabaco, las cuales fueron obtenidas por agrotransformación con una construcción que consistía de 115 pb corriente arriba del gen *CP* del virus *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) fusionado a GUS. Estas plantas transgénicas no mostraron expresión significativa del gen reportero, pero dos semanas después de ser inoculadas con PHYVV por biobalística, los ensayos histoquímicos revelaron una fuerte expresión del gen reportero, a diferencia de las plantas no infectadas, en las que no se observó actividad de GUS. Con los resultados anteriores se confirmó que este promotor está sujeto a una regulación dependiente de factores virales, además que los elementos requeridos para esta regulación están presentes dentro de esos 115nt, al menos en el caso de PHYVV (Ruiz-Medrano et al., 1999)

Además de los resultados que muestran la transactivación del promotor *CP*, se han desarrollado estudios para conocer la conservación de este mecanismo entre los begomovirus; estos estudios fueron realizados en ensayos de complementación heteróloga, es decir, determinando si el producto del gen *AC2* de un virus es capaz de activar el promotor de *CP* de otro. Para esto se utilizaron los virus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) y TGMV; los experimentos llevados a cabo en protoplastos demostraron que el promotor de *CP* de BGMV y TGMV contienen secuencias funcionalmente equivalentes, que responden a TrAP del otro virus (Hung, & Petty, 2001). También se exploró la posibilidad de que el promotor de *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) pudiera responder a TrAP de TGMV, y se analizaron diferentes longitudes del promotor *CP* de CaLCuV, y se observó que 151 pb corriente arriba del codón de inicio del gen pueden responder tanto a TrAP de CaLCuV como al transactivador de TGMV (Lacatus & Sunter, 2008).



### 1.6.2- BV1 y BC1. Genes tardíos presentes en el DNA-B

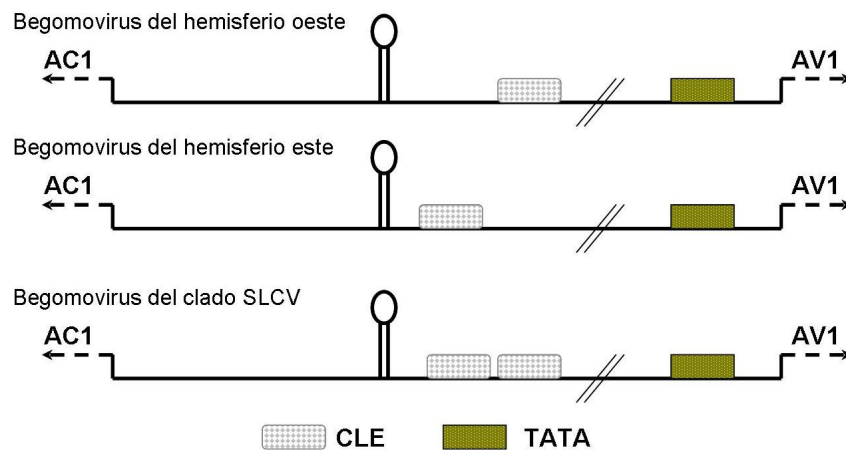
La forma en la que los dos genes del DNA-B son regulados ha sido estudiada de la misma forma que en el caso del promotor *CP*: así se llegó a la conclusión de que el mecanismo por el cual es regulada la expresión de BV1 es igual a la de CP, es decir, que la activación de este promotor depende de TrAP (Haley et al., 1992).

Para el caso del promotor del gen BV1 es clara la activación mediante el producto del gen AC2, pero para BC1 la activación de éste promotor no resultó tan fuerte en el sistema utilizado en los estudios iniciales (Haley et al., 1992). Por otro lado, estudios realizados en el 2001 en los que se analizó la capacidad de respuesta de los promotores virales tardíos del virus *African cassava mosaic virus* (ACMV) tanto en un sistema de expresión transitoria, como en sistemas de expresión estable (plantas transgénicas. En ambos sistemas se probaron construcciones bidireccionales (conservando la estructura de cómo se encontrarían en el virus) utilizando dos diferentes genes reporteros, de manera que se midió la expresión de *BV1* y de *BC1* en el mismo experimento y planta; en el caso de los experimentos realizados en protoplastos ambos promotores fueron fuertemente activados cuando se encontraba presente la proteína TrAP. En las plantas transgénicas de tabaco ambas orientaciones del promotor del DNA B fueron fuertemente activadas por TrAP, pero en casava se observó una diferencia en el nivel de activación entre los dos promotores de este genoma, siendo mucho más alta la del promotor BC1 que la del promotor de BV1 (Frey, Schärer-Hernández, Fütterer, Potrykus, & Puonti-Kaerlas, 2001). La activación mediada por TrAP de ambos promotores fue, años más tarde, observada en el virus *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) en el que la activación de promotor de BV1 por TrAP fue muy clara, aun y cuando se probaron diferentes versiones del promotor, que variaban en su longitud, pero para BC1 se encontró que los elementos necesarios para la transactivación están localizados en dos bloques principales, uno ubicado en su propio promotor, y el otro en el promotor de BV1, abarcando toda la región intergénica (Shivaprasad et al., 2005).

### 1.6.3- Elementos involucrados en la activación de los genes tardíos

El hecho de que los promotores de los genes tardíos (*CP*, *BC1* y *BV1*) respondan a la proteína transactivadora TrAP sugieren que los mecanismos y elementos necesarios para esta respuesta deben de estar conservados en ellos.

De esta manera y mediante un análisis comparativo de los promotores tardíos de numerosos begomovirus se identificó un elemento que esta presente en la mayoría de ellos (Figura 13), aunque varía en la posición y en el número de copias, usualmente presente en un mayor número de copias en el promotor BV1 que em el promotor CP. Este elemento fue llamado CLE “Conserved Late Element” (GTGGTCCC) y fue postulado como un posible blanco de la proteína transactivadora (Argüello-Astorga et al., 1994). Desde entonces se han realizado varios estudios para determinar si este elemento está, efectivamente, involucrado en la activación de los genes tardíos.



**Figura 13.** Esquema del consenso de promotores del gen CP de diversos begomovirus. Las cajas punteadas representan el elemento CLE, las cajas verdes representan la caja TATA. (Modificada de Argüello-Astorga et al., 1994)

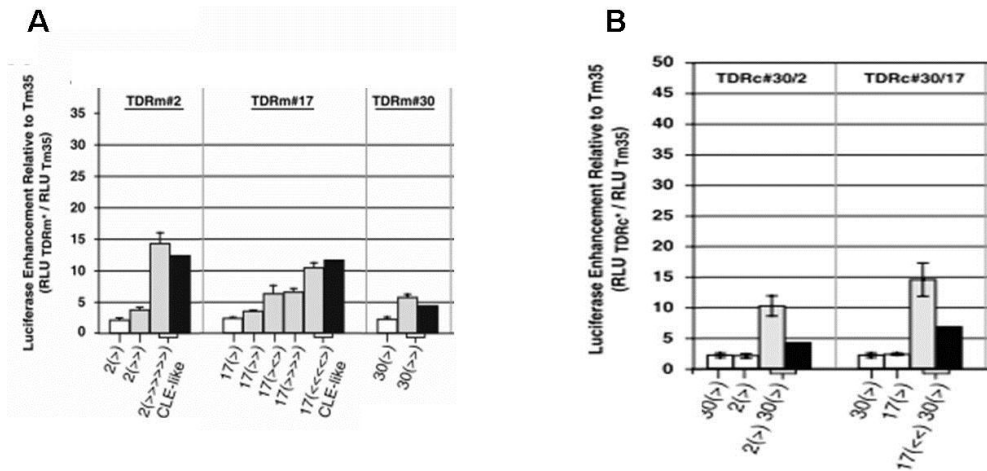
Para definir si el CLE está involucrado en la transactivación de los genes tardíos, uno de los primeros estudios analizó el promotor CP del virus PHYVV en el que se delimitó una secuencia de 115pb que es capaz de responder a TrAP; dentro de ésta secuencia se localizan tres copias del CLE. En este estudio se probaron construcciones que contaban con dos copias del CLE en dos diferentes contextos de promotor, ambas versiones truncadas del promotor fuerte 35S: la versión mínima -46/+8 (46s) que es inactiva por sí sola, y la

versión -90/+1 (90s) cuya diferencia con la anterior es la presencia del elemento regulador AS-1. Ambas construcciones fueron bombardeadas en hojas de tabaco y de chícharo, en ausencia y presencia de una fuente de AC2. Ambas construcciones al ser co-bombardeadas con la fuente de AC2 mostraron un aumento en la expresión del gen reportero GUS, a diferencia de lo observado cuando se co-bombardearon construcciones sin CLE y la fuente de AC2 (Ruiz-Medrano et al., 1999). La función del CLE ha sido puesta a prueba aun en un contexto no viral, como en el caso del estudio realizado en el 2005 por Cazonelli et al. en el cual se construyeron promotores sintéticos con dos, cuatro y seis copias de este elemento, fusionados a la versión mínima del promotor 35S (esto es, 46s). Este promotor sintético dirige la expresión del gen reportero *luciferasa*. La actividad de los promotores fue evaluada tanto en sistemas transitorios como estables, y en ambos se observó una clara correlación positiva entre el número de copias del CLE presentes en el promotor y en nivel de actividad de la *luciferasa*; además de este resultado, también se llegó a la conclusión de que la orientación del CLE no tiene un impacto sobre el grado del aumento en la expresión. Construcciones que tienen de ocho a doce copias de este elemento alcanzaron niveles de actividad cercanos a los que se obtuvieron con el promotor 35s intacto (Cazonelli, et al., 2005).

A pesar de los datos existentes de la función del CLE dentro de éstos promotores virales, en otro estudio se presentan datos opuestos a estas observaciones. En dicho estudio se realizó la mutación de la secuencia del CLE GTGGTCCC (mutación por delección) dentro del contexto de la región intergénica de TGMV (-657) Estas construcciones fueron probadas en protoplastos de *N. benthamiana*, usando al gen GUS como reportero.

De acuerdo con los resultados de la cuantificación de GUS no existió una diferencia significativa entre los niveles de transactivación obtenidos con la construcción que no tiene la mutación, con la que si la tiene, al ser co-transfectadas con una fuente de AC2. Por esa razón los autores del estudio llegaron a la conclusión de que el CLE no se requiere para la activación mediada por TrAP (AC2) en el promotor CP del virus TGMV (Sunter & Bisaro, 2003).

Es claro que la estructura de un promotor no esta determinada solamente por un elemento, es más bien la combinación ellos la que da como resultado un promotor funcionalmente activo, como fue demostrado en un estudio realizado por Cazonelli y Velten (2008), en el que diversos elementos presentes en promotores virales y con una función positiva comprobada, fueron analizados de manera independiente así como en combinación con otros elementos.. Entre los elementos utilizados en este estudio, dos construcciones independientes del CLE fueron probadas, tanto, en forma de multímeros como en combinación con otros elementos. Ambas construcciones mostraron una actividad que aumentó casi linealmente con el número de copias del elemento cuando fueron analizados los multímeros del mismo. Pero cuando se hicieron los experimentos con el CLE en combinación de un elemento (AAACTT-7nt-AAGTTT) los niveles de actividad fueron muy superiores a los predichos con la suma de los valores de los elementos individuales (Figura 14)



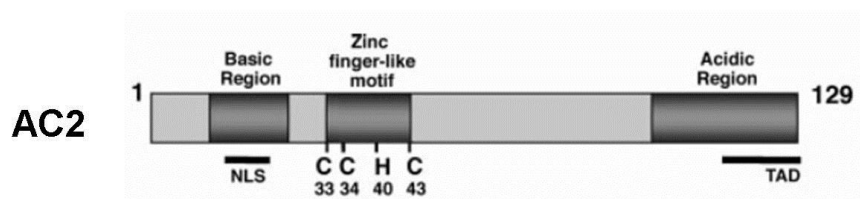
**Figura 14.** Análisis de elementos presentes en promotores. A) Resultados de la evaluación de dos construcciones diferentes del CLE (2 y 17) y de un elemento regulador nuevo reportado en este estudio (30). B) Resultado de la combinación del CLE con el elemento 30. Las barras blancas representan el resultado de una sola copia de la secuencia analizada, las barras grises son el resultado de los multímeros y las barras negras representan el resultado predicho de acuerdo de los valores individuales. (Modificado de Cazonelli y Velten, 2008)

De esta forma se demostró que la estructura de un promotor depende de la combinación de varios elementos, de manera que resulta difícil definir exactamente como es que las secuencias individuales contribuyen a su

función, o adjudicar la total funcionalidad de un promotor a un solo elemento (Cazzonelli & Velten, 2008).

#### 1.6.4- Mecanismo de activación mediada por TrAP (AC2)

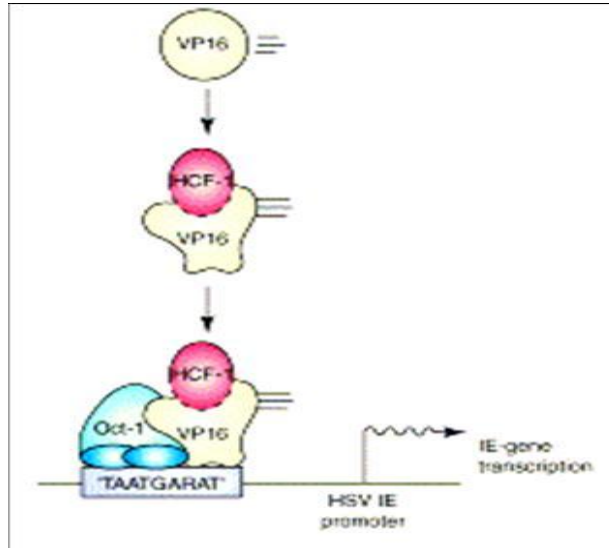
TrAP es un típico factor de transcripción por varias características: tiene un dominio básico con una señal de localización nuclear, un dominio central con un motivo de tipo “dedo de zinc” no-clásico, y un dominio activador en el extremo carboxilo terminal, que se ha demostrado que es funcional en diferentes tipos de células (Figura 15) (Trinks et al., 2005, Yang et al., 2007)



**Figura 15.** Diagrama de la proteína AC2. La señal de localización nuclear se encuentra localizada en el amino terminal, un motivo dedo de zinc no clásico y un dominio de activación en el carboxilo terminal. (Reproducido de Yang, 2007)

A pesar de contar con un dominio tipo dedo de zinc, TrAP no es una proteína que se una al DNA con alta afinidad, más bien se une débilmente y de una forma no específica, como fue demostrado mediante una serie de estudios en los que se confirma que la unión de la proteína con el DNA no es secuencia específica, además de que la afinidad por DNA de cadena sencilla es mayor que la que muestra por el DNA de cadena doble. (Noris et al., 1996).

Los factores de transcripción tienen, usualmente, una alta afinidad por una secuencia nucleotídica específica, por lo que se propone que el mecanismo de activación de los genes tardíos por el transactivador opera de forma indirecta, interactuando con proteínas o complejos de proteínas que se unen a secuencias específicas del promotor, como ha sido reportado para otros transactivadores virales, como VP16 del herpes virus y E1A de adenovirus. Estas últimas proteínas poseen dominios de activación y reconocen a sus promotores blanco mediante la interacción directa con factores transcripcionales del hospedero unidos al DNA (Berk 1992, Gerster 1988) (Figura 16).



**Figura 16.** Diagrama de la activación mediada por VP16 en herpesvirus. VP16 se une a factores transcripcionales del hospedero (Oct-1 por ejemplo). Reproducido de Wysocka & Herr, 2003.

A la fecha solo se tiene reporte de un factor transcripcional encontrado en *Arabidopsis thaliana* que por la técnica de dos híbridos se demostró que se une específicamente a una secuencia de 65 pares de bases localizada entre el nucleótido -125 y -60 respecto al inicio de la transcripción del gen *CP* de TGMV. El factor se denomina PEAPOD2 el cual ha sido caracterizado como un regulador del ciclo celular que específicamente afecta la división de las células progenitoras de los estomas y del tejido vascular.

Además se demostró la unión de este factor con el promotor *CP* del virus CaLCuV, lo que sugiere que las mismas proteínas unen secuencias dentro de estos dos promotores.

Como ya se había demostrado que AC2 (TrAP) no se une específicamente a DNA de doble cadena, y por lo tanto que su acción sobre el promotor debía involucrar un mecanismo indirecto, esto es, interacciones con proteínas de la planta, unidas a secuencias específicas, se realizaron experimentos para determinar si PEAPOD2 podía unirse con la proteína TrAP, de TGMV CaLCuV, ACMV y PepGMV. Para establecer si la unión es proteína específica, se utilizó como control a la *CP* de TGMV. En todos los experimentos, excepto en el control con *CP*, se observó una unión entre PEAPOD2 y las diferentes

proteínas AC2 (TrAP) analizadas. Lo que se concluyó de esos experimentos es que la función de activación transcripcional de AC2 no es virus-específica. En este mismo estudio se exploró la posibilidad de la formación de un complejo entre el factor PEAPOD2, la secuencia de 65pb del promotor de CP de TGMV y AC2 de TGMV, cuyo resultado fue positivo: estos tres elementos forman un complejo, con lo cual se refuerza la idea de que el mecanismo de activación de AC2 involucra la unión a factores del hospedero (Lacatus & Sunter, 2009). Cabe señalar que dentro de la secuencia activadora -125/-60 del promotor de CP de TGMV se encuentra el único CLE presente en el mismo.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

#### Tema A

- Establecer la existencia de un promotor independiente para el gen (A)C2 en begomovirus de tres linajes filogenéticos diferentes.

#### Tema B

Determinar si los CLEs funcionan como sitios de unión de factores de la planta y/o como elementos de respuesta a TrAP en los promotores de los genes tardíos de begomovirus.

### 2.2 Objetivos particulares

#### Tema A

- 1) Delimitar el promotor que regula al gen *TrAP* en begomovirus de tres linajes filogenéticos diferentes.
- 2) Establecer sus semejanzas y diferencias funcionales mediante análisis cuantitativos.
- 3) Identificar in silico algunos elementos reguladores en esos promotores.
- 4) Realizar mutaciones puntuales silenciosas en alguna potencial secuencia reguladora del promotor AC2 y examinar su impacto sobre la capacidad infectiva del virus.

#### Tema B

- 6) Cuantificar la actividad del gen reportero *uidA (GUS)* en plantas transgénicas de tabaco portadoras de promotores sintéticos que incluyen CLEs, en presencia o ausencia de una fuente de TrAP.
- 7) Determinar si la mutación del CLE en el promotor truncado -125 de TGMV afecta su capacidad de ser transactivado por TrAP.



## **3. Materiales y Métodos**

### **Manipulación del DNA**

#### **3.1- Reacción en cadena de la polimerasa PCR**

La amplificación de todos los fragmentos utilizados se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para todas las reacciones se utilizó cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25mM, Buffer de reacción 1x (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8.3), la concentración de los iniciadores fue de 10µM, y dNTPs 100µM.

(Ver Anexo 1)

#### **3.2- Purificación de los productos de PCR**

Los productos obtenidos por PCR fueron purificados con el kit de Promega (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System). Los productos purificados fueron utilizados para la clonación directa en el vector pGEM T-easy o para la digestión con la enzima correspondiente para ser posteriormente ligados en el vector pBlueScript.

La purificación de DNA a partir de geles de agarosa se hizo usando el mismo kit que se menciona arriba.

#### **3.3- Obtención de las construcciones**

Para la obtención de las construcciones utilizadas en este estudio se emplearon diferentes vectores en los cuales fueron clonados los fragmentos amplificados.

Para las construcciones usadas para determinar el promotor del gen AC2 y el análisis del promotor de CP de TGMV se utilizó el vector pBS-GUSnos.

Para las construcciones usadas para los ensayos de infección en plantas se utilizó el vector pBS.

Además se usó el vector pGEMT-easy, esto con el fin de tener disponible una mayor cantidad de los insertos.

### **3.4- Delimitación del promotor del gen AC2**

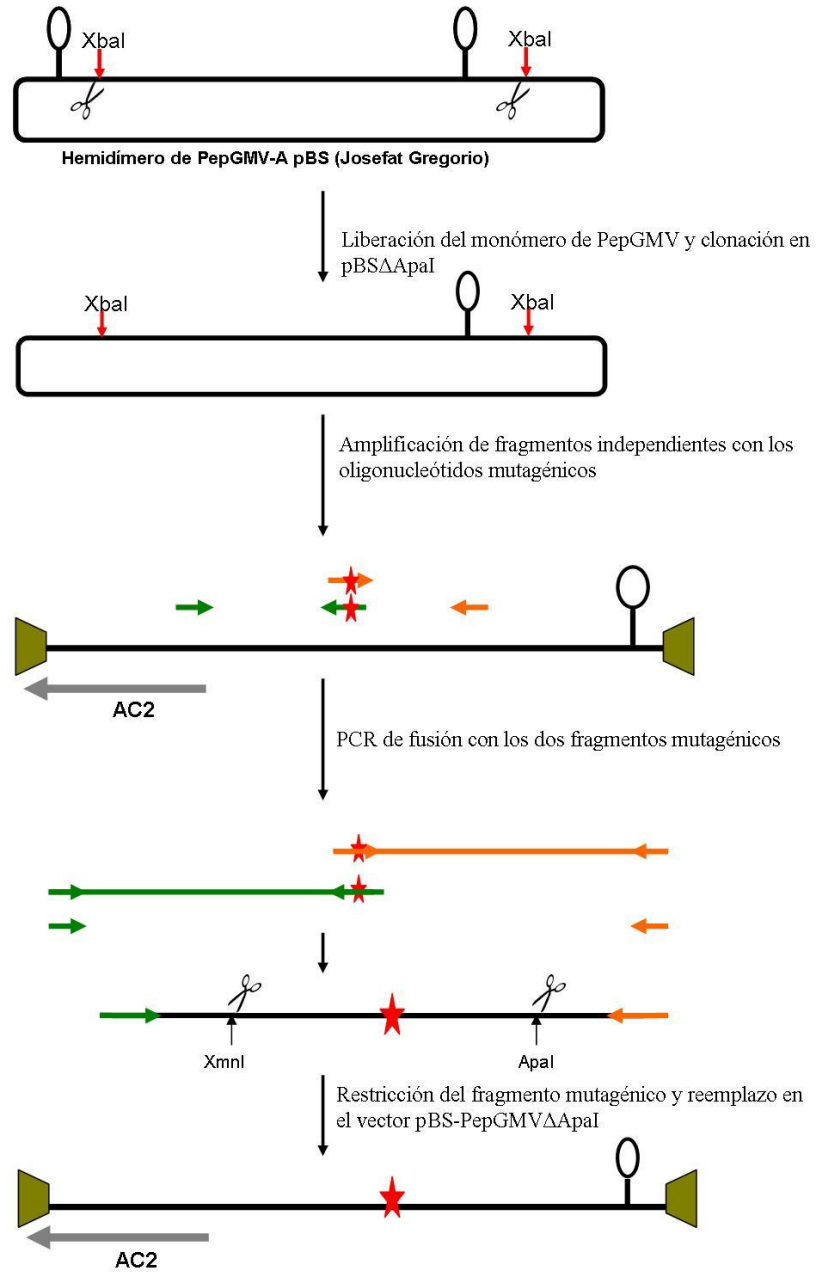
En esta parte se emplearon a los virus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* OkYMMV. De cada uno de los virus fueron amplificados tres diferentes fragmentos que varían en tamaño, los oligonucleótidos usado se enlistan en la Tabla 3. Los pares de oligonucleótidos que se usaron para TYLCV fueron: TYLCVPromAC2/CP70-rev para la versión larga, TYLCVProm AC2/DGR-rev para la versión mediana y TYLCVProm AC2/WAR-rev para la versión corta. Para PepGMV: PepGMVProm AC2/CP70-rev, para la versión larga, PepGMVPromAC2/ SL2080-rev para la versión mediana y PepGMVProm AC2/WAR-rev para la versión corta, y para OkYMMV: OkYMMVProm AC2 /CP 70-rev para la versión larga, OkYMMVProm AC2/DGR-rev y, OkYMMVProm AC2/WAR-rev para las versiones mediana y corta, respectivamente.

Una vez amplificados los fragmentos, éstos fueron digeridos con las enzimas correspondientes, purificados y ligados en el vector pBS-GUS-nos previamente digerido con las mismas enzimas que el inserto que iba a ser ligado (ver Tabla 3). La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA Ligasa (Promega) a 4°C toda la noche.

Debido a que ambos extremos de los insertos tienen el mismo sitio de corte, las clonas fueron analizadas mediante restricción con una enzima interna para comprobar la correcta orientación del inserto; posteriormente, fueron enviadas a secuenciar al CINVESTAV-Irapuato para verificar tanto la orientación como la correcta formación de la fusión traduccional.

### **3.5- Mutaciones puntuales en el promotor AC2 de PepGMV**

Para llevar a cabo la construcción con la mutación puntual en el promotor de AC2 del virus PepGMV se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos PepGMVmutFor/PepGMVmutRev. La estrategia utilizada se muestra en la Figura 17.



**Figura 17.** Construcción de clonas con mutaciones puntuales dentro del promotor del gen AC2

### 3.6- Construcciones para el estudio del promotor *CP* del virus Tomato golden mosaic virus (TGMV)

La generación de estas construcciones se llevó a cabo de la misma forma que las utilizadas para el estudio del promotor del gen AC2. Se amplificaron los

fragmentos de interés bajo las mismas condiciones de PCR, los productos fueron ligados en el vector pGEM T-easy y posteriormente escindidos por la restricción de las enzimas *XbaI* y *HindIII*. Después de su purificación, los fragmentos fueron clonados en el vector pBS-GUSnos el cual fue previamente digerido con ambas enzimas. Las condiciones de ligación fueron las mismas que se mencionaron anteriormente

### **3.7- Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de células NT1 en suspensión**

Todas las construcciones fueron probadas en ensayos de expresión transitoria en protoplastos de células NT1 cultivadas en suspensión; este protocolo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT por la Dra. María Aurora Londoño Avendaño (Tesis de Doctorado), el cual se basa en la degradación enzimática de la pared celular por la acción de dos enzimas la *pectoliase* y la *celulasa*. El método de transfección fue por electroporación bajo las siguientes condiciones: 500uF (Medida de resistencia), 250volts, por un tiempo mayor a 8mseg, en celdillas de electroporación de 2ml. (Ver Anexo a.5)

### **3.8- Cuantificación de la proteína total y cuantificación de GUS**

Este protocolo se utilizó tanto para la cuantificación de los extractos de proteína total de los protoplastos así como los de tejido vegetal. Para la cuantificación de proteína total se empleó el método de Bradford. Para la cuantificación del gen reportero GUS se utilizó el método de cuantificación fluorométrica, el cual se basa en la hidrólisis del sustrato MUG (4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido) por la enzima producida por el gen reportero, la  $\beta$ -Glucoronidasa, dicha hidrólisis da lugar a un compuesto llamado MU (4-metilumbeliferona) el cual al ser excitado a cierta longitud de onda emite fluorescencia que puede ser cuantificada. (Ver Anexos a.6 y a.7)

### **3.9- Tinción histoquímica del material vegetal para la detección de GUS**

Este método se basa en la hidrólisis del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt) por la  $\beta$ -

glucoronidasa, que da como productos al ácido glucorónico y cloro-bromoíndigo, este último forma un precipitado color azul. Para el ensayo se prepara una solución stock de X-Gluc 0.1M en dimetilsulfóxido. (Ver Anexo a.11)

### **3.10- Germinación y crecimiento de las plantas utilizadas**

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Capsicum annuum var.Sonora Anaheim*, además de plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para las cuales el marcador de selección es Kanamicina.

Las plantas que se usaron para los experimentos de infección fueron germinadas directamente en tierra estéril. Se crecieron en cámara bioclimática durante 15 días aproximadamente, a una temperatura de 25°C con un ciclo luz-oscuridad de 16/8.

La germinación de las semillas de tabaco transgénicas se llevó a cabo primero *in vitro* en cajas petri con medio MS con Kanamicina; las semillas fueron primero esterilizadas en una solución de cloro al 10% y posteriormente lavadas (al menos tres veces) con agua destilada estéril. Las cajas se colocaron en un cuarto de cultivo de tejido vegetal, con una temperatura de 25°C y un ciclo de luz-oscuridad de 16/8. Las cajas se dejaron en el cuarto de cultivo hasta que las plántulas tuvieran tamaño suficiente para ser pasadas a tierra estéril. Una vez en tierra, se siguieron los mismos procedimientos y cuidados que con las demás plantas, hasta ser utilizadas para los ensayos.

### **3.11- Ensayos de infección**

#### **3.11.1- Método mecánico (inoculación por abrasión)**

Este método consiste en la inoculación viral de la planta por el daño mecánico producido por partículas de carborundum al ser frotadas sobre una hoja de la planta. Este fue el método empleado para la infección de las plantas de tabaco transgénicas con el virus *Euphorbia mosaic virus – Jalisco* (EuMV-Jal A y B).

### **3.11.2- Método de inoculación por biobalística**

La inoculación viral llevada a cabo por éste método se realiza por medio de partículas de tungsteno recubiertas por el DNA viral, con la ayuda de presión y vacío las partículas son “bombardeadas” a la planta. Para hacer los bombardeos se utilizaron membranas de ruptura de 650psi (pounds per square inch, medida de presión), y en cuanto al DNA viral, se utilizó 1ug de cada uno de los componentes por planta. (Ver Anexo a.9)

### **3.12- Extracción de DNA de tejido vegetal**

La extracción de DNA de muestras vegetales se realizó por el método del buffer AP (Ascencio-Ibañez J.T, 2007) (Ver Anexo a.10)

### **3.13- Análisis de Southern blot.**

300 microlitros de protoplastos fueron electroporados con 7ug del DNA de PepGMV, tanto del virus silvestre como la mutante. Para el virus wt se utilizó un hemidímero del genoma, mientras que para PepGMV mutante el DNA fue utilizado tanto en forma lineal o como moléculas heterodímeras. La versión linearizada, se obtuvo mediante la digestión del plásmido pBluescript SKII, utilizando la enzima *Xba I*. Para evaluar los niveles del DNA viral, se aislaron 50µg del DNA total de los protoplastos electroporados, y fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posterior a la electroforesis, el DNA se transfirió a membranas Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare). Un fragmento de 547 pb (*Xba I a Kpn I*) del DNA A de PepGMV fue marcado con biotina (Thermo Scientific) para usarse como sonda de hibridación. La hibridación se llevó a cabo toda la noche a 55°C.

Después de la hibridación, la sonda no hibridada se eliminó lavando varias veces con buffer de lavado 1 (2x SSC, SDS al 1% (p / v)) durante 30 minutos y luego buffer de lavado 2: (SSC 1x, SDS al 0,1% (p / v)) por 30 minutos y finalmente con buffer de lavado 3 (0.5x SSC, 0.1% SDS) durante 15 minutos.

La detección de señal se realizó con un kit de detección de ácido nucleico quimioluminiscente (Thermo Scientific) al exponer la membrana a una película de rayos X y revelar la autoradiografía (GE Healthcare).

**NOTA:** Todos los protocolos son descritos a detalle en la sección de Anexos.

**Tabla 3.** Tabla de oligonucleótidos utilizados en el trabajo

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Sitio de restricción</b>
TYLCVProm AC2	gagg <u>gctagc</u> cgaaggtgCATtcttgag	<i>NheI</i>
PepGMVProm AC2	gg <u>tctaga</u> ggaggatgacgaattgagCAT	<i>XbaI</i>
OKYMMVProm AC2	aat <u>tctaga</u> tgaagagcgCATtcttgatgg	<i>XbaI</i>
TYLCV CP70-rep	gagg <u>gctagc</u> ctcgcttcgacatagtcacggg	<i>NheI</i>
CP70-Rev	gag <u>tctaga</u> acgccatggrgcatcncgcttagscat	<i>XbaI</i>
DGR-Rev	ctg <u>aagctt</u> cgaygghagatctgctagaggagg	<i>HindIII</i>
SL2080-Rev	<u>aagctt</u> acgacgtctaycayaacgc	<i>HindIII</i>
WAR-Rev	ctg <u>aagctt</u> acnggnaaracratgtgggc	<i>HindIII</i>
TGMV CP (Rev)	ata <u>tctaga</u> atcccgttaggCATtttga	<i>XbaI</i>
TGMV CP2 (Rev)		<i>XbaI</i>
TGMV 117	ata <u>aagctt</u> gcatatgtgaagggccaat	<i>HindIII</i>
TGMV 133	ata <u>aagctt</u> tcgtctaaGTGGTCCcgc	<i>HindIII</i>
TGMV 133-2CLE	ata <u>aagctt</u> GTGGTCCctcgtctaaGTGGTCCcg	<i>HindIII</i>
TGMV 188	ata <u>aagctt</u> accggatggccgcgcat	<i>HindIII</i>
TGMV CLEmut	ata <u>aagctt</u> taaGTAATAACgcatatgtgaagg	<i>HindIII</i>
TYLCVmut For	gcgtggtacAATGTAATAgatgacgtagacc	-----
TYLCVmut Rev	ggctacgtcatcTATTACATTgtaccacgc	-----
PepGMVmut For	gtggagtataATGTAATAgatgatcacgcccc	-----
PepGMVmut Rev	gtgatcatcTATTACATTatactccacatagttgaatagac	-----
OkYMMVmut For	agtggagtataATGTAATAgatgacatcgaccg	-----
OkYMMVmut Rev	gtcatcTATTACATTatactccacttcatttgagaacactctgg	-----

## 4. Resultados

### Nota aclaratoria:

Tomando en consideración que el presente trabajo de tesis incluye dos temas muy amplios, que están claramente relacionados pero difieren en sus objetivos, expondremos aquí los resultados y conclusiones de esos estudios de manera separada, para efectos de claridad. Adicionalmente, describiremos la caracterización molecular de una nueva especie de begomovirus, que fue utilizada en el estudio de los promotores AC2.

### Tema de Investigación A

#### **Análisis funcional del promotor AC2 de tres begomovirus pertenecientes a linajes evolutivamente distantes.**

##### **A.1- Generación de promotores AC2 truncados fusionados a un gen reportero.**

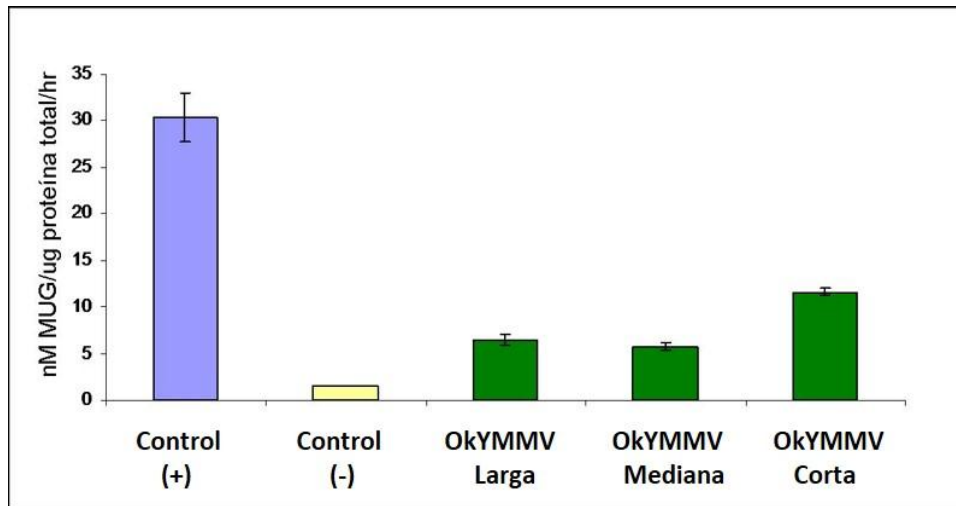
Para establecer la existencia de un promotor independiente para el gen AC2 se utilizaron 3 virus pertenecientes a linajes distintos: i) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) un virus monopartita del Viejo Mundo; ii) *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OKYMMV) un virus bipartita típico del Nuevo Mundo; iii) *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) un virus bipartita perteneciente al clado del SLCV, un linaje americano atípico. Se diseñaron una serie de iniciadores sintéticos para amplificar el promotor potencial del gen AC2, para cada virus se realizaron 3 diferentes versiones del promotor con diferente extensión por su extremo 5'. Los oligonucleótidos fueron diseñados de forma que el inicio de la traducción del gen AC2 quedara en fase con el gen reportero *uidA* (*GUS*) Una vez obtenidas las construcciones, éstas fueron enviadas a secuenciar para corroborar la correcta fusión traduccional.

##### **A.2- Determinación de la actividad de los promotores (A)C2 truncados.**

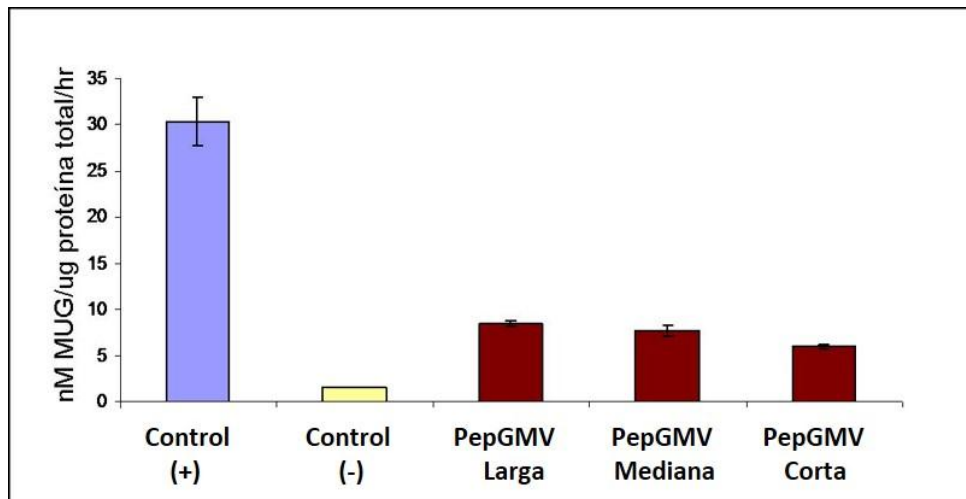
Cada una de las construcciones generadas, 3 para cada virus, fueron examinadas en ensayos de expresión transitoria en protoplastos de células NT1, y 2 días después de la transfección las células fueron cosechadas y se prepararon extractos proteicos de las mismas; las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, para posteriormente realizar la cuantificación de la



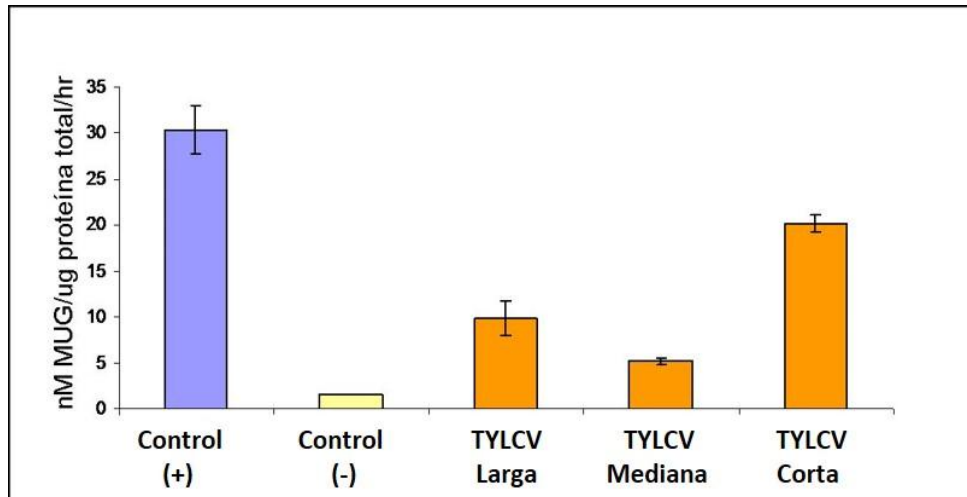
actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (el producto del gen reportero GUS). Los resultados son mostrados en las Figuras 18, 19 y 20.



**Figura 18.** Resultados de la cuantificación de las versiones del promotor AC2 del virus *Okra yellow mosaic Mexico virus*. La versión más larga del promotor cuenta con 1367pb, la versión mediana 658pb y la corta 326pb. La construcción 35S-GUS fue usado como control positivo, y pK19-GUS como control negativo.



**Figura 19.** Resultados de la cuantificación de las versiones del promotor AC2 del virus *Pepper golden mosaic virus*. La versión más larga del promotor incluye 1335pb, la versión mediana 623pb y la corta 330pb. 35S-GUS fue usado como control positivo, y pK19GUS como control negativo.



**Figura 20.** Resultados de la cuantificación de la actividad de las 3 versiones truncadas del promotor AC2 del virus *Tomato yellow leaf curl virus*. La versión más larga del promotor contiene 1479pb, la versión mediana 647pb y la corta 313pb. 35S-GUS fue usado como control positivo, y pK19GUS como control negativo.

En las gráficas podemos observar que la actividad de los promotores es diferente para cada virus analizado. Además, en los casos de OkYMMV y TYLCV, el nivel de actividad del promotor no mostró correlación con la longitud del mismo, ya que la versión más corta de esos virus es la que mostró un nivel de actividad mayor. En contraste, en el promotor AC2 de PepGMV la actividad sí disminuye en relación al tamaño del promotor, pero aún en este caso, la versión más corta analizada del promotor mantiene un nivel de actividad significativo (aproximadamente el 70% de la actividad de la versión más activa).

### **A.3- Mutación de un elemento *cis*-regulador del promotor AC2 de PepGMV**

En el 2007 Tu y Sunter reportaron una secuencia de 9 pb. que es necesaria para la formación del transcrito que codifica a TrAP, la cual se encuentra localizada ~220 nucleótidos corriente arriba del inicio del gen AC2, Esta secuencia se encuentra presente en las 3 versiones más cortas de cada uno de los 3 virus.

Para evaluar el efecto que la mutación de esa secuencia reguladora tendría en la actividad del promotor AC2 ya no en protoplastos de células cultivadas, como se hizo en el estudio antes citado, sino en las células que integran los

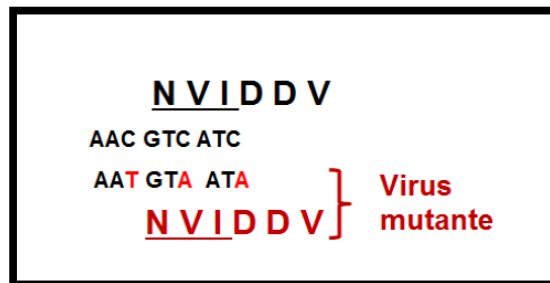
tejidos en los que el virus se localiza durante la infección, decidimos mutar el elemento regulador de 9 pb en el promotor AC2 de PepGMV. La elección de este virus entre los tres analizados, se basó en las siguientes consideraciones:

1) TYLCV codifica, como la mayoría de los begomovirus del Viejo Mundo, tres proteínas que funcionan como supresores del silenciamiento génico: V2, C4 y C2.

2) OkYMMV codifica dos supresores del silenciamiento, AC4 y AC2, como la mayoría de los begomovirus de América; sin embargo PepGMV es atípico porque carece del gen AC4, por lo que solo produce un supresor de silenciamiento, AC2.

3) Si la mutación de la secuencia conservada de 9 pb del promotor AC2 reduce significativamente la transcripción de ese gen, el proceso infeccioso puede verse comprometido por dos razones diferentes; por la baja o nula transactivación de los genes tardíos *CP*, *BV1* y *BC1*, y por la incapacidad del virus de contrarrestar la respuesta de silenciamiento de la planta por no producir suficiente TrAP, el único supresor viral de esa respuesta.

Así pues, se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos para producir 3 mutaciones puntuales “silenciosas” en la secuencia de 9pb (Figura 21), de tal forma que no se afectara la secuencia y expresión de la proteína Rep. Dichas mutaciones se introdujeron en el contexto del genoma viral completo para evaluar su implicación en el proceso infeccioso.

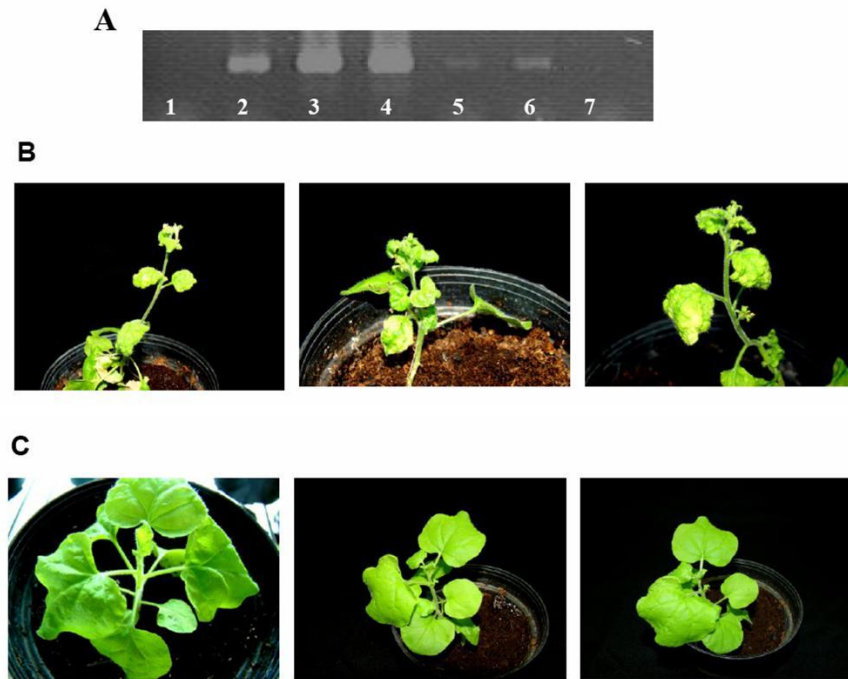


**Figura 21.** Mutaciones introducidas en la secuencia necesaria para la producción de TrAP. Estos cambios no afectan el ORF de Rep, que codifica en esa región un motivo altamente conservado en el dominio de helicasa de la proteína.

En el laboratorio se contaba con una clona infecciosa (hemidímero) de PepGMV-A, del cual se partió para producir el virus mutante, liberando primero el monómero del virus silvestre utilizando la enzima *XbaI*, y este monómero del DNA-A fue luego subclonado en el vector pBlueScript. Posteriormente y mediante cortes en sitios de restricción únicos, se hizo el reemplazo de la secuencia original con una secuencia de ~350-pb, que portaba la mutación generada, la cual fue verificada por secuenciación.

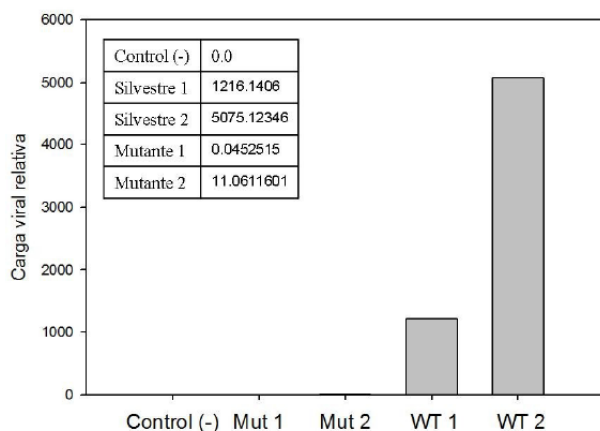
#### **A.4- Análisis *in planta* del virus *cis*-mutante AC2.**

Una vez obtenido el DNA-A de PepGMV con la mutación descrita, se realizaron experimentos de inoculación por biobalística en plantas de *Nicotiana benthamiana*, para evaluar el efecto de la mutación en el proceso infeccioso. Las inoculaciones fueron realizadas con el virus silvestre y mutante en forma de monómero. En un experimento preliminar se inocularon 3 plantas de *N. benthamiana* por tratamiento. La eficiencia de inoculación con el virus silvestre fue del 100% ya que las 3 plantas bombardeadas se detectó DNA viral en las hojas nuevas 15dpi, mediante PCR. En el caso de las plantas bombardeadas con el virus mutante, solo se detectó el DNA viral en 2 de ellas, pero en hojas cercanas a las bombardeadas (Figura 22); y no se desarrollaron síntomas de virosis, en contraste con las plantas inoculadas con el virus silvestre, que mostraron síntomas característicos.



**Figura 22.** Fotografías de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PepGMV silvestre y mutante. A) PCR para la detección del virus: carril 1, control, planta no inoculada; carriles 2,3 y 4, plantas inoculadas con el virus silvestre; 5, 6 y 7, plantas inoculadas con el virus mutante. B) Las tres plantas infectadas con el virus PepGMV silvestre mostraron síntomas característicos de éste virus C) Plantas infectadas con PepGMV mutante no presentaron síntomas de virosis.

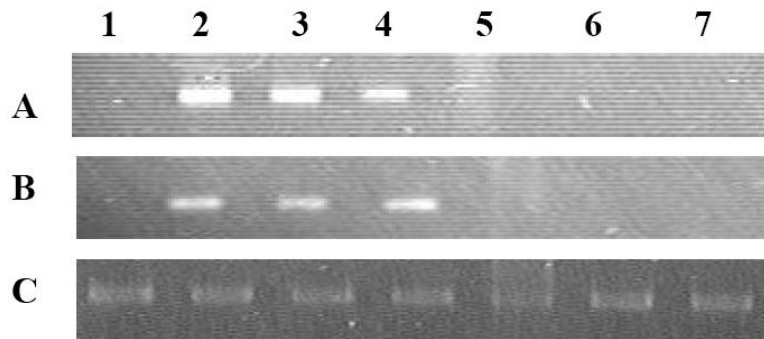
Con el DNA extraído de las plantas se realizó un PCR en tiempo real (Figura 23), con el fin de determinar la carga viral en cada planta inoculada ya sea con el virus silvestre como con el mutante (los PCR en tiempo real fueron realizados en el CINESTAV-Irapuato por Diana Trejo)



**Figura 23.** PCR en tiempo real de las plantas infectadas

Como se puede apreciar en la Figura 23, la carga viral de las plantas que fueron infectadas con el virus mutante es tan bajo que en la gráfica se vuelve imperceptible, este es un fenotipo ya reportado para el caso de virus mutantes en el gen AC2.

Por otro parte, se realizó la extracción de RNA de las plantas infectadas con el fin de saber si el transcrito que codifica a la proteína TrAP estaba presente. Para esto se diseñaron oligonucleótidos dentro del gen AC2, como este transcrito se traslapa con el que produce a la proteína Rep, se hizo también la amplificación de un fragmento dentro de este gen, para poder establecer una relación entre estos dos transcritos y observar la disminución de aquel que origina TrAP. Debido a que el promotor de CP es activado por TrAP, se hizo la amplificación de un fragmento de CP para observar el efecto que causa la ausencia del transcrito, y por lo tanto de TrAP, en su regulación (Figura 24).



**Figura 24.** RT PCR de las plantas infectadas, carril 1 planta sin infectar como control negativo, 2, 3 y 4 plantas infectadas con el virus silvestre, 5, 6 y 7 plantas infectadas con el virus mutante. A) Amplificación con oligonucleótidos dentro del ORF de Rep. B) Amplificación de un fragmento del gen CP. C) Control de actinas

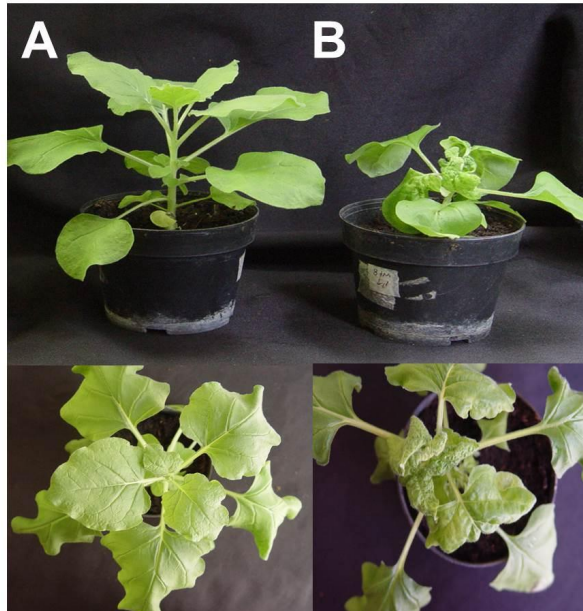
Con los resultados obtenidos, se decidió ampliar el estudio, incrementando el número de plantas utilizadas, por lo que se repitió el experimento utilizando 10 plantas para el virus wt y 10 plantas para el virus mutante. Los resultados de dicho experimento arrojaron los mismos resultados, obteniendo síntomas evidentes de infección en 9 de las 10 plantas infectadas con el virus wt, sin observar síntomas en las plantas infectadas con el virus mutante (Figura 25)



**Figura 25.** Resultados del experimento de infección (n=10). A) Nueve de las diez plantas infectadas con el virus PepGMV silvestre mostraron síntomas característicos de éste virus B) Plantas infectadas con PepGMV mutante no presentaron síntomas de virosis

Los resultados de los experimentos mostrados en la figura 25, fueron realizados utilizando el virus mutante en forma de monómero, mientras que el virus silvestre se encuentra en forma de hemidímero, lo cual introduce un factor

diferencial entre los tratamientos, que decidimos eliminar. En consecuencia, generamos un hemidímero del virus mutante y se realizaron los experimentos de inoculación por biobalística, utilizando 6 plantas para el virus silvestre y 6 para el virus mutante (Figura 26)



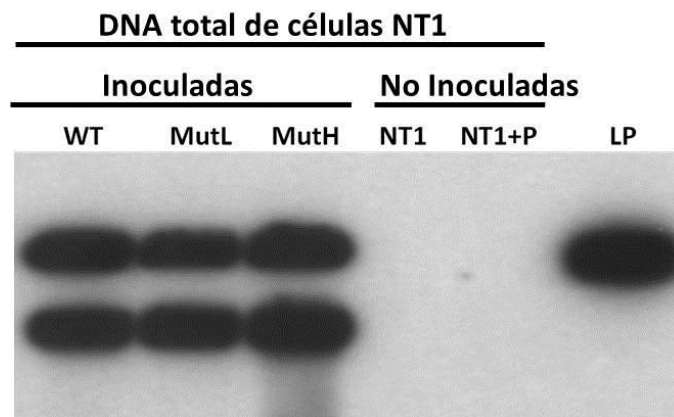
**Figura 26.** Resultados del experimento de infección con hemidímeros virales (silvestre y mutante) (n=6). A) Plantas inoculadas con el PepGMV mutante no presentaron síntomas de virosis B) Cinco de las seis plantas infectadas con el virus PepGMV silvestre mostraron síntomas característicos de este virus

La mutación de las tres posiciones dentro del elemento conservado, claramente afecta la infección por el virus PepGMV, lo que se determinó por la ausencia de síntomas y la ausencia del DNA viral en las hojas nuevas de las plantas inoculadas.

Ahora bien, aunque los datos de secuenciación confirmaban que la mutación “silenciosa” del elemento de 9 pb se había realizado exitosamente, sin afectar el marco de lectura del gen Rep, decidimos verificar de modo experimental que la capacidad de replicación del PepGMV-A mutante no se había afectado realmente durante el proceso de mutagénesis. Para esto evaluamos la replicación de las dos versiones mutantes del virus (la versión monomérica y la hemidimérica) en un sistema de protoplastos de la línea celular *NT1*, transfectados por electroporación. La replicación del DNA viral fue determinada



por la técnica el Southern blot, usando como sonda un fragmento del DNA-A de PepGMV: La señal detectada mediante este análisis mostró niveles de replicación similares entre el virus silvestre y el virus mutante, tanto en la forma monomérica como hemidimérica (Figura 27). Estos resultados indican que la mutación no alteró el marco de lectura de Rep, y que la ausencia de síntomas en las plantas no se debe a la incapacidad del DNA-A mutante de autorreplicarse, sino más bien que las funciones que dependen de TrAP como la expresión de las proteínas del movimiento o la supresión de la respuesta de silenciamiento de la planta, no se realizan eficientemente en el virus mutante.



**Figura 27.** Análisis de la replicación viral mediante Southern blot. WT= representa al DNA obtenido de los protoplastos inoculados con el virus silvestre (PepGMV hemidimérico), MutL= Virus mutante monomérico previamente linearizado, MutH= virus mutante en forma de hemidimero. NT1= DNA de protoplastos control, NT1 + P= DNA de protoplastos con DNA viral plasmídico, LP= control positivo DNA-A linearizado.

## A.5- Conclusiones Tema A

En esta parte del trabajo se exploró la posibilidad de la existencia de un promotor interno (traslapado con el gen *Rep*) que dirige la expresión del gen AC2, para lo cual se emplearon tres begomovirus pertenecientes a linajes diferentes. De cada uno de éstos virus, se generaron tres versiones de este posible promotor, que difieren en la longitud de la secuencia promotora, teniendo por tanto, una versión corta, una mediana y una larga para cada uno de los virus.

Como se puede observar en las figuras 18, 19 y 20, el nivel de actividad de los promotores (determinado por la actividad del gen reportero GUS) difiere en relación a la longitud del mismo, mostrando básicamente dos comportamientos, uno observado en los virus OkYMMV y TYLCV, en los cuales la versión más corta del promotor tiene los niveles más altos de actividad, lo cual conduce a la conclusión de que todos los elementos importantes para su activación están contenidos dentro de los primeros ~320 pb corriente arriba del ORF. El segundo patrón, observado solo en PepGMV, en el que el nivel de actividad del promotor está directamente relacionado con su longitud, es decir, la versión más corta presentó la actividad más baja; sin embargo, aún dicha actividad es considerable.

En el 2007 se describió una secuencia importante para la actividad del promotor AC2 de TGMV, pero debido a que dicha secuencia fue examinada en ensayos de expresión transitoria mediante una mutación que afectó el ORF del gen Rep (responsable de la replicación viral), nosotros decidimos examinar la secuencia homóloga de PepGMV pero mediante mutaciones silenciosas, y en experimentos de infección en plantas de *N. benthamiana*. Como se aprecia por los resultados obtenidos, la mutación silenciosa eliminó la capacidad del virus de infectar a la planta, aún cuando la replicación del mismo no se vio afectada, lo que conduce a la conclusión que los cambios realizados en el DNA mutante incapacitan al virus para realizar algunas de las funciones relacionadas con la proteína TrAP, como el movimiento viral, y la supresión del silenciamiento, lo que implica que la secuencia mutada es de suma importancia para la transcripción del gen AC2.

## Tema de Investigación B

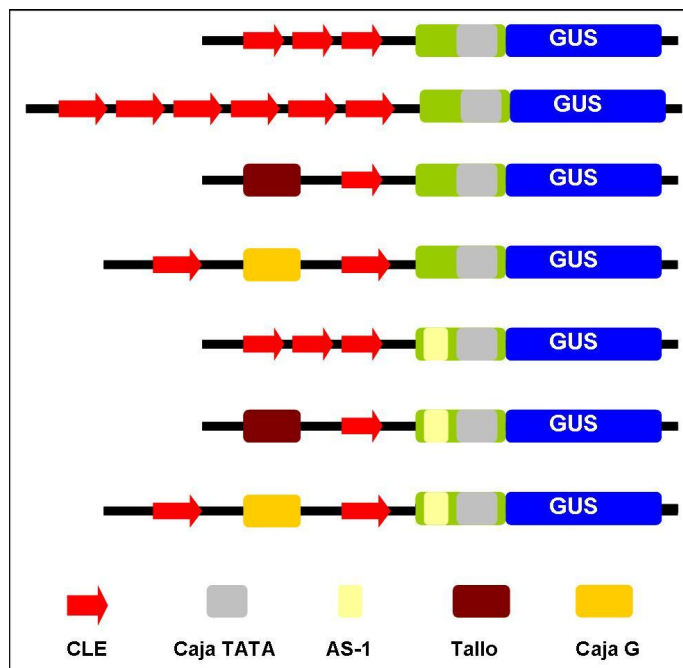
### Delimitación de la función del Elemento Tardío Conservado (CLE) en la regulación de los genes tardíos de begomovirus.

#### B.1 Antecedentes del estudio.

Esta parte del trabajo es una continuación del realizado por el Dr. Alejandro Juárez Reyes en su trabajo de Maestría titulado “Delimitación de secuencias involucradas en el silenciamiento y transactivación de los genes tardíos del *Virus Huasteco del Chile* (PHV)”, por esta razón haré un breve resumen sobre su trabajo ya que es el punto de partida del presente.

Para hacer la caracterización funcional del CLE se realizaron una serie de construcciones en vectores binarios derivados de pBI12, que contiene el promotor 35S de CaMV (+700 pb.). El primer vector derivado es el pBI46s la cual tiene truncado el promotor 35s en la posición -46, y consta solamente de la caja TATA y el iniciador: este promotor es inactivo por sí mismo (llamado por ello “promotor mínimo 35S”). El segundo vector binario derivado es el pBI90S, truncado en la posición -90: este promotor además de incluir a la caja TATA posee un elemento AS-1, el cual es un sitio de unión para un factor activador. Todos estos vectores binarios contienen el marcador de selección *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina, y el gen reportero *uidA* (GUS). En los vectores pBI46S y pBI90S se subclonaron, arriba de los promotores mínimo y truncado, respectivamente, oligonucleótidos sintéticos que contienen uno o más CLEs en diversos contextos, ya sea asociado a otros elementos reguladores, o en forma de trímeros o hexámeros. (Figura 28).

Con estos vectores fueron transformadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante el método de co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* con discos de hoja. Estas plantas To fueron crecidas hasta la obtención de sus semillas.



**Figura 28.** Esquema de las construcciones que fueron generadas para la transformación de plantas de tabaco

Una vez que tuvimos las semillas, fueron germinadas *in vitro* en medio MS con kanamicina como marcador de selección, las plántulas que germinaron en este medio fueron transferidas a tierra estéril para su crecimiento. Después de aproximadamente 2 meses, se colectó material vegetal para realizar la tinción histoquímica, así como la cuantificación fluorométrica de la actividad del gen reportero.

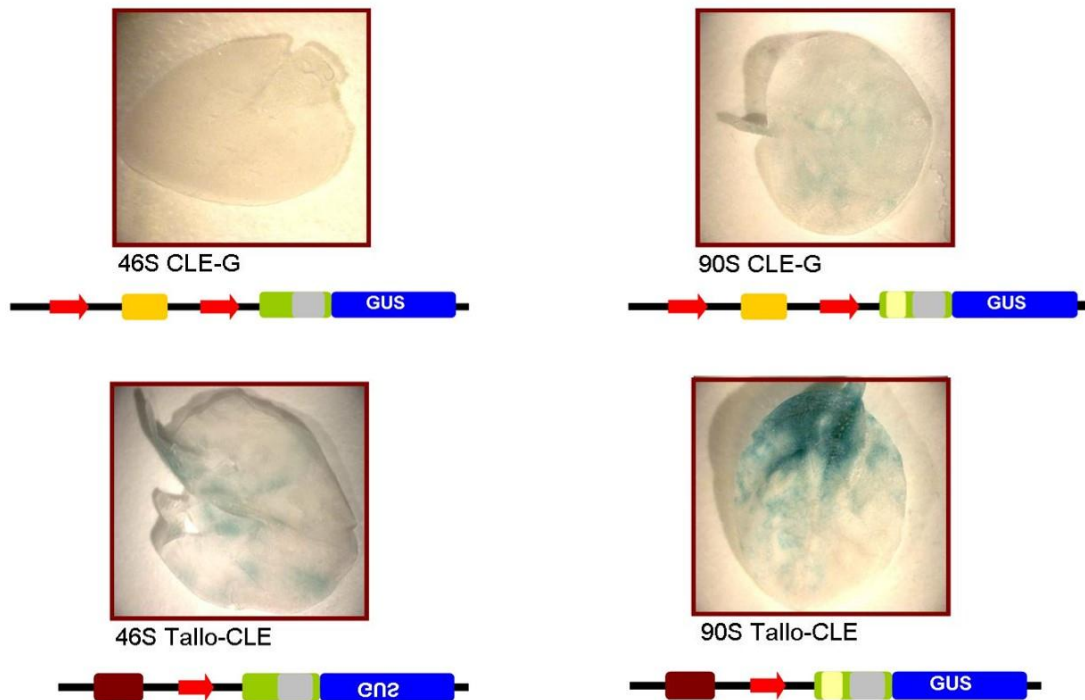
### **B.2- Análisis histoquímico de la expresión del gen reportero en las plantas transgénicas**

Los niveles de expresión observados fueron diversos, dependiendo del contexto en el que se encuentre el CLE, así como entre diferentes líneas de una misma construcción. Los niveles más altos de expresión fueron los observados en las líneas 90s3CLE, 46s3CLE y 46s6CLE. Dicha expresión fue observada en el tejido fotosintético (mesófilo) de las hojas (Figura 29).



**Figura 29.** Fotografías de las tinciones histoquímicas de tejido vegetal de las plantas de tabaco transgénicas con multímeros del CLE.

Para el caso de las plantas transgénicas con promotores sintéticos en los que el CLE está asociado a otro elemento, como la llamada Caja G, o el repetido invertido 3' del "tallo" de la horquilla de replicación, la expresión del gen reportero fue baja, pero se observó una mayor expresión para aquellas que fueron colocadas corriente arriba de la versión 90s del promotor (Figura 30).

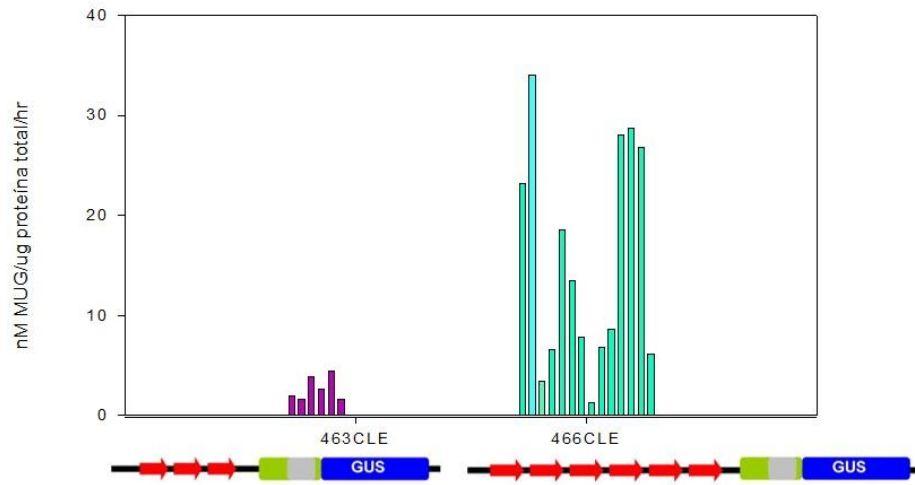
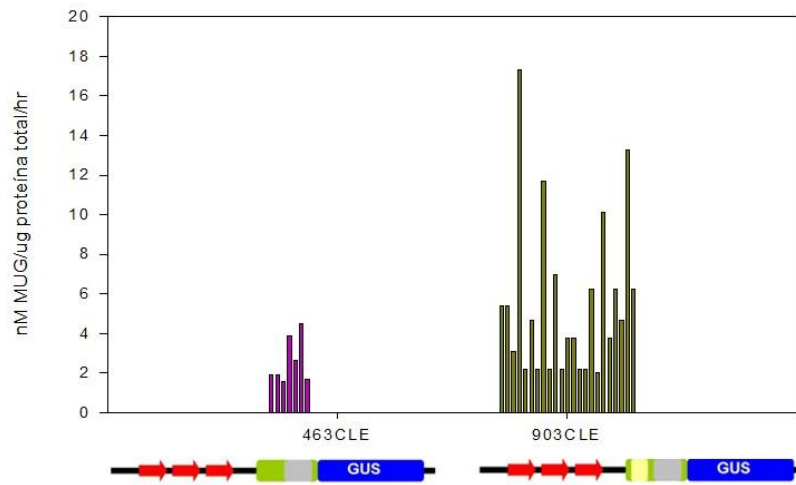
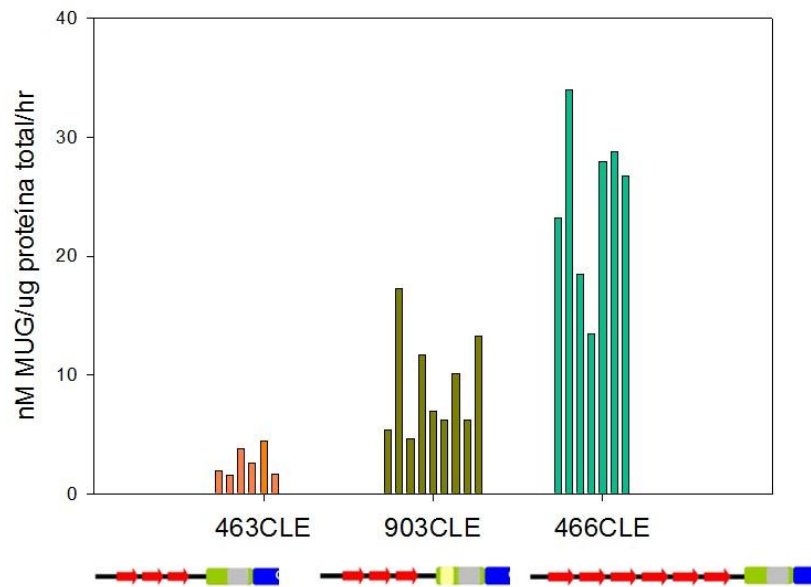


**Figura 30.** Fotografías de las tinciones del tejido vegetal de plantas de tabaco transgénicas que tienen al CLE asociado a otro elemento

### B.3- Cuantificación de GUS por fluorimetría

Además de los análisis por tinción hisitquímica de las plantas transgénicas, se realizó la cuantificación de la actividad del producto del gen reportero GUS (que codifica para la proteína  $\beta$ - glucoronidasa) mediante un ensayo fluorométrico utilizando el reactivo MUG (glucoronido de metilumbeliferona) que al ser hidrolizado por la  $\beta$ - glucoronidasa produce el compuesto 4-metil umbeliferona, que al ser excitado a cierta longitud de onda, emite fluorescencia. Estos ensayos se realizaron usando tanto tejido de hojas jóvenes como de hojas de mayor edad; se observó en la mayoría de los ejemplares evaluados, una mayor actividad en las hojas jóvenes.

Los resultados obtenidos están reportados como nM de MUG hidrolizados por  $\mu$ g de proteína total, en relación al tiempo (1 hora). Los resultados son mostrados en las Figuras 31 y 32, y en las mismas se muestran las comparaciones de los diferentes contextos del CLE presentes en las plantas transgénicas.

**A****B****C**





**Figura 32.** Gráficas de los resultados de la cuantificación de la actividad de GUS en las plantas transgénicas. A) Comparación de los resultados obtenidos de las plantas que tienen al Tallo o a la caja G asociados al CLE en diferentes contextos del promotor (46s y 90s). B) Comparación de la actividad del gen reportero de las plantas que tienen otro elemento asociado al CLE con los resultados obtenidos de las plantas que tienen 6 copias del CLE en el contexto del promotor 46s.

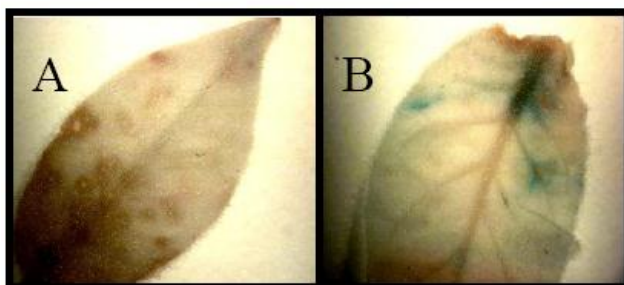
#### **B.4- Análisis de las plantas transgénicas en presencia de factores virales**

Los datos hasta ahora mostrados fueron observados en ausencia de todo factor viral, es decir, son el resultado de la actividad basal de los promotores.

Con el fin de evaluar el comportamiento de estos promotores en presencia de factores virales, se realizó la infección de plantas que mostraron un nivel de actividad bajo, para poder ver claramente si su presencia afectaba la actividad de dichos promotores.

Se utilizaron plantas con la construcción 46s Tallo CLE, y como fuente de factores virales (TrAP) se utilizó el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV). El método de infección que se empleó fue la infección mecánica con carborundum. Material vegetal de las plantas fue colectado a los 8, 15 y 21 días post infección y se realizó la tinción histoquímica de este tejido.

Se observó que el nivel de expresión de gen reportero aumentó a los 8dpi en relación a las plantas transgénicas no infectadas (Figura 33), aunque esto no se realizó cuantificando fluorométricamente la actividad de GUS.

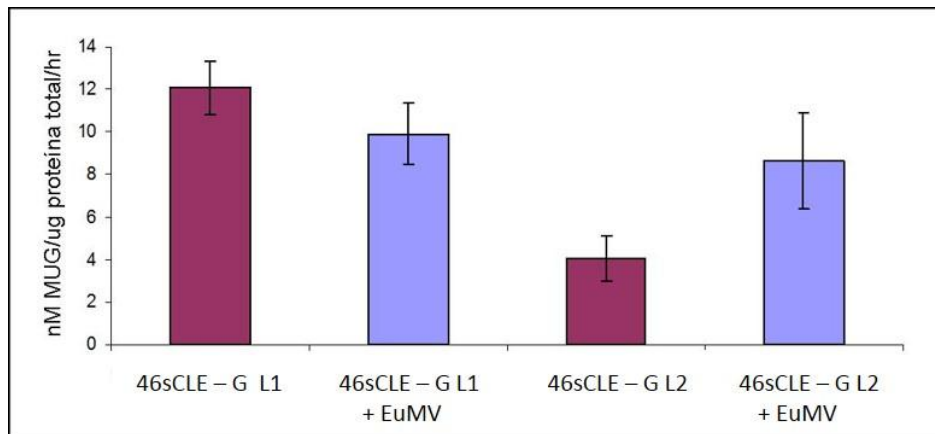


**Figura 33.** Infección de las plantas 46s Tallo CLE con el virus PepGMV. A) Hoja de planta control inoculada con el vector pBS. B) Hoja de planta infectada con el virus PepGMV 8dpi.

Después de observar que la actividad de los promotores, al menos para el caso de 46s Tallo-CLE aumenta en presencia de factores virales, se realizó la infección de plantas que se encuentran en el contexto del promotor 46s (3CLE, Tallo-CLE y CLE-G) con el virus del mosaico de la euforbia (EuMV), ya que este virus a diferencia del anteriormente usado, no se restringe al floema de la planta, es decir, es capaz de infectar el mesófilo.

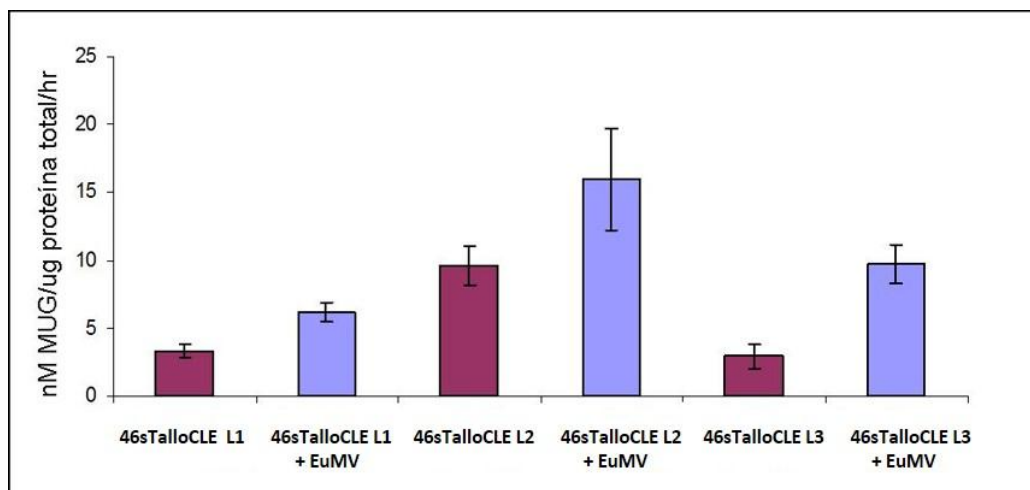
Se utilizó el mismo método de infección (carborundum), se tomaron muestras de las plantas al tiempo cero (antes de la infección) y 15 días después de la infección, con el fin de evaluar el efecto de la presencia del virus en el nivel de actividad de los promotores. De este tejido colectado se extrajo la proteína total, la cual fue cuantificada para después determinar la actividad del gen reportero, GUS.

Los resultados de las cuantificaciones se presentan en las Figuras 34 y 35. La gráfica 34 representa los datos obtenidos de las cuantificaciones de las plantas 46sCLE-G de la cual fueron analizadas dos líneas independientes.



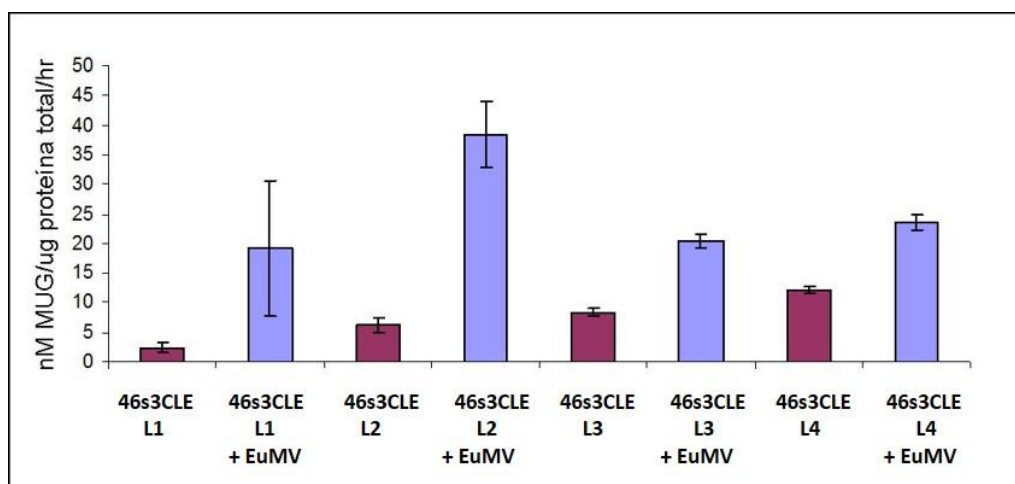
**Figura 34.** Resultados de la cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46sCLE-G. Las barras lilas representan los resultados obtenidos antes de la infección y las barras azules, 15 días después de la infección. Para 46sCLE-G Línea 1(L1) n=19, y para 46sCLE-G Línea 2(L2) n= 11.

Para las plantas 46sTallo CLE fueron analizadas tres líneas diferentes, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35.



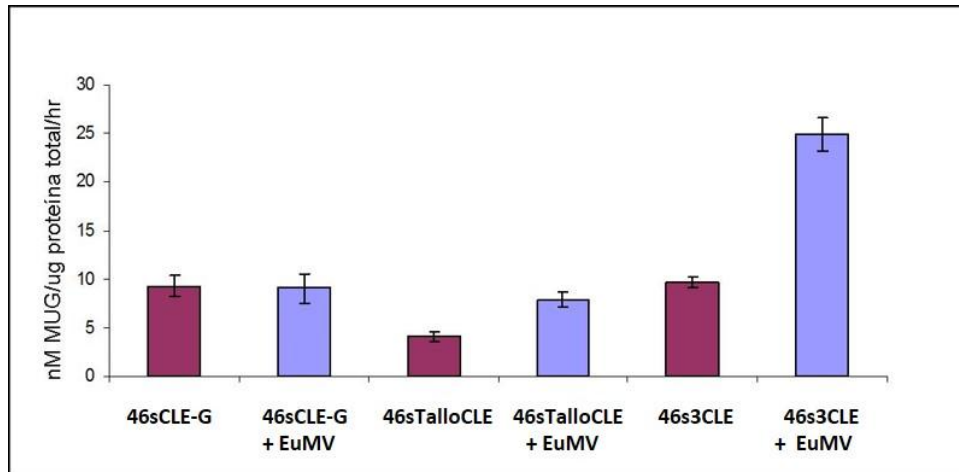
**Figura 35.** Resultados de la cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46sTallo-CLE. Las barras lilas representan los resultados obtenidos antes de la infección y las barras azules, 15 días después de la infección. Para 46sTallo-CLE Línea 1(L1) n=19, para 46sTallo-CLE Línea 2(L2) n= 6 y para 46sTallo-CLE Línea 3(L3) n=6.

Para las plantas con la construcción 46s3CLE se analizaron 4 líneas diferentes, los resultados son mostrados en la Figura 36.



**Figura 36.** Resultados de la cuantificación de la actividad del gen reportero GUS de las plantas transgénicas 46s 3CLE. Las barras lilas representan los resultados obtenidos antes de la infección y las barras azules, 15 días después de la infección. Para 46s 3CLE Línea 1(L1) n=4, para 46s 3CLE Línea 2(L2) n= 5, 46s 3CLE Línea 3(L3) n=7, y para 46s 3CLE Línea 4(L4) n=9.

Como puede observarse las líneas independientes de cada construcción, presentan variaciones en el nivel de actividad del gen reportero, pero de manera general se observa una mayor actividad en las plantas 46s 3CLE como se puede apreciar en la Figura 37, donde se resumen todos los resultados de las 3 diferentes construcciones analizadas.



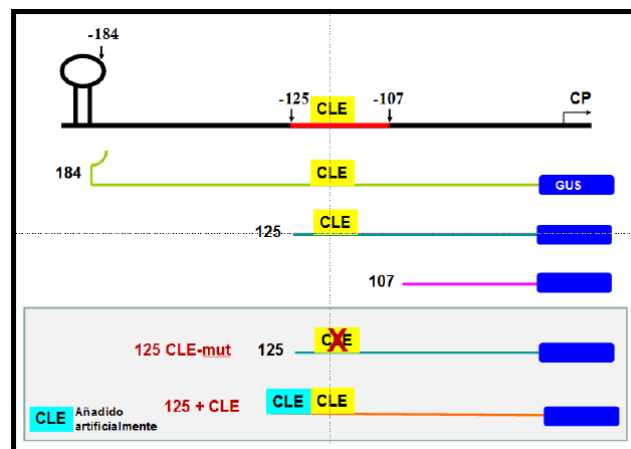
**Figura 37.** Resultados de la cuantificación de la actividad del gen reportero GUS en plantas de tabaco transgénico. Las barras lilas representan los resultados obtenidos antes de la infección y las barras azules, 15 días después de la infección. Para 46s CLE-G n=30, para 46s TalloCLE n= 31, y para 46s 3CLE n=25.

### B.5- Caracterización del CLE en el contexto de su promotor nativo.

Con los resultados anteriores logramos establecer que el CLE es un factor importante dentro de un promotor sintético, y que además responde de forma positiva a la presencia de factores virales. Ahora en esta parte evaluaremos la hipótesis de que el CLE es un blanco funcional para la proteína TrAP, lo cual es clave para la activación de los promotores de los genes virales tardíos, como el gen que codifica a la proteína de la cápside, CP.

Para ello, se realizaron una serie de construcciones progresivamente más cortas del promotor de CP del virus del mosaico dorado del tomate (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV), el cual cuenta solamente con una copia del CLE (Figura 38). Para generar estas construcciones se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 3) para amplificar las secuencias deseadas dentro de este promotor. La versión más larga (-184) de este promotor va desde la secuencia conservada que forma la estructura del tallo en el origen de replicación, hasta

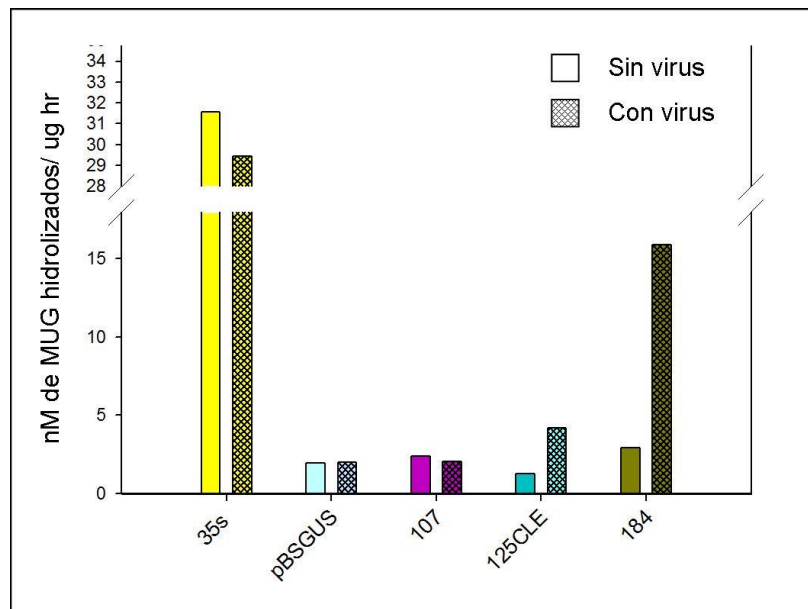
el inicio del gen CP; en una segunda versión (-125CLE) se eliminan 60pb del extremo 5' del promotor, dejando al CLE en el extremo del promotor, en la versión -117 se elimina la secuencia del CLE, y ésta es la versión más corta del promotor. Adicionalmente a estas construcciones, se realizaron otras dos introduciendo cambios a las secuencias originales, en una de estas construcciones se introdujo artificialmente una copia del CLE con la ayuda de un oligonucleótido a un lado de la copia nativa, y en la otra construcción se realizó, por medio de un oligonucleotido mutagénico, el cambio de la secuencia del CLE (de GTGGTCCC a GTAATAAC). Los oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de restricción, de manera que los productos de PCR pudieran ser digeridos y posteriormente clonados en el vector pBlueScript, al que previamente se le había introducido el gen reportero GUS, después de obtener las construcciones en el vector, fueron enviadas secuenciar para corroborar que no existiera algún cambio en la secuencia, además de verificar que se hubiera llevado a cabo correctamente la fusión traduccional entre el ORF de CP y el gen reportero. Estas construcciones reproducen de manera general los experimentos realizados por Sunter y Bisaro en el 2003 en los que ellos concluyen, de una forma poco clara, que el CLE no es un elemento de respuesta a TrAP en este promotor.



**Figura 38.** Construcciones generadas del promotor de CP de TGMV fusionadas al gen reportero GUS

Una vez obtenidas estas construcciones se probaron en experimentos de expresión transitoria en protoplastos de células NT1, a las que dos días después de la transfección se les realizó la extracción de proteína total; ésta fue cuantificada por el método de Bradford, y posteriormente se cuantificó la actividad de GUS en el extracto. Los experimentos fueron realizados bajo dos condiciones: la primera utilizando las construcciones en ausencia de factores virales, para determinar la actividad basal de esos promotores; la segunda, co-transfectando las construcciones con el componente A del virus del mosaico de la euforbia (*Euphorbia mosaic virus*, EuMV), esto con el fin de medir la actividad de los promotores en presencia de una fuente de TrAP.

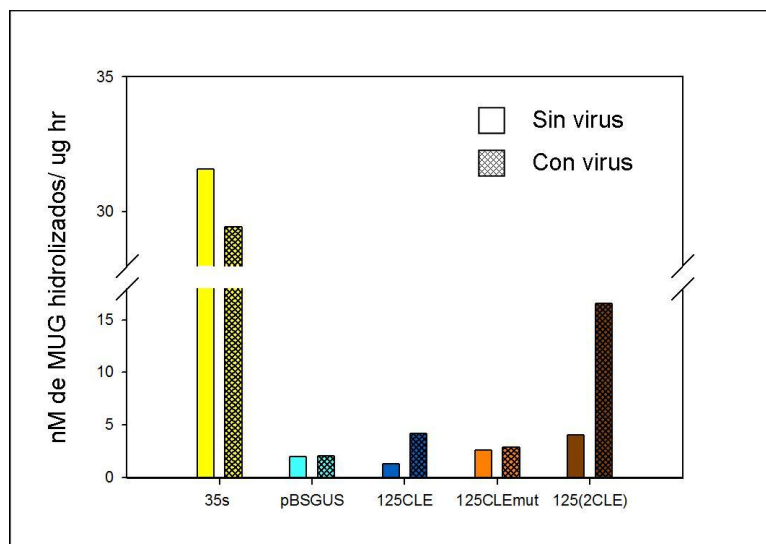
Como controles del experimento se utilizaron dos vectores: el control positivo fue un cartucho de expresión que incluía el promotor 35s (CaMV) fusionado al gen reportero GUS, y como control negativo se utilizó al vector pBS el cual cuenta solo con el gen reportero, y carece de regiones promotoras que lo regulen. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 39.



**Figura 39.** Resultados de la cuantificación de la actividad del GUS de diversas versiones truncadas del promotor CP de TGMV. Las barras amarillas representan los resultados del control positivo (35S-GUS), y las barras azul claro para el control negativo; en barras moradas, azul fuerte y verde se representan los resultados de las construcciones 107, 125CLE, y 184 respectivamente. Las barras vacías indican la ausencia del componente A del virus EuMV, y las barras rayadas indican su presencia.

En la gráfica se puede apreciar que los controles, tanto el positivo como el negativo no se ven afectados con la presencia del virus; la versión del promotor que tuvo una mayor actividad basal fue la más extensa (-184) y es la que experimentó el mayor aumento en presencia de una fuente de TrAP. La versión troncada -125CLE incrementó sustancialmente su actividad en presencia del DNA-A de EuMV, a diferencia de lo que se observó en la versión más corta del promotor, -107, cuyo nivel de actividad no incrementó con la presencia del virus.

Los resultados anteriores fueron vistos cuando se van haciendo deleciones del promotor nativo de TGMV. En la Figura 40 se muestran los resultados de los promotores modificados, en los que se ha mutado el CLE original, o se ha introducido, de manera artificial, una copia extra del CLE



**Figura 40.** Resultados de la cuantificación de la actividad del GUS. Las barras amarillas representan los resultados para el control positivo, las barras azul claro para el control negativo, en barras azul fuerte, anaranjado y café se representan los resultados de las construcciones 125CLE, 125CLEmut, y 125(2CLE) respectivamente. Las barras vacías indican la ausencia del componente A del virus EuMV, las barras rayadas indican su presencia.

La mutación en la secuencia del CLE parece eliminar la capacidad de respuesta al virus (la fuente de TrAP), y por otra parte la adición de una copia extra de éste elemento conservado potencia la actividad del promotor alcanzando niveles de actividad comparables a los que fueron observados en la versión más larga, -184.

## **B.6- Conclusiones Tema B**

El estudio de los promotores tardíos de los begomovirus, reveló hace ya tiempo la presencia de algunos elementos conservados en ellos, como el llamado “Conserved Late Element” o CLE; dicho elemento fue propuesto como un potencial elemento de respuesta a TrAP.

Para estudiar el efecto que tienen los CLEs en los promotores, se analizaron plantas de tabaco transgénicas generadas en trabajos previos, las cuales cuentan con múltiplos del CLE, así como en asociación con otros elementos reguladores con los cuales se encuentran naturalmente en los promotores begomovirales. Como se observa por los datos obtenidos, los promotores son activos aún en ausencia de factores virales, y su actividad varía dependiendo del número de copias del CLE presente, así como del elemento asociado. Sin embargo, la actividad del promotor incrementa considerablemente al agregar una fuente de TrAP, que en este caso fue el componente genómico A de EuMV. Tomados en conjunto, nuestros resultados implican que el CLE es un sitio blanco para factores transcripcionales de la planta, y que la proteína TrAP potencia su actividad de un modo indirecto.

Dichos elementos tardíos fueron analizados además en el contexto de un promotor viral (como se encontraría de manera natural), y en este caso los resultados fueron similares, en el sentido de que la respuesta de activación del promotor depende del número de elementos presentes, y que responden positivamente a la adición de TrAP. Más aún, la mutación del CLE provoca la pérdida de la respuesta funcional a la presencia del transactivador. Por lo anterior podemos concluir que el CLE es sitio de unión de un activador celular presente en las plantas, y un blanco funcional de la proteína viral TrAP.



## **Tema de Investigación C**

### **Aislamiento y caracterización molecular de un nuevo begomovirus: *Sida yellow speckled virus.***

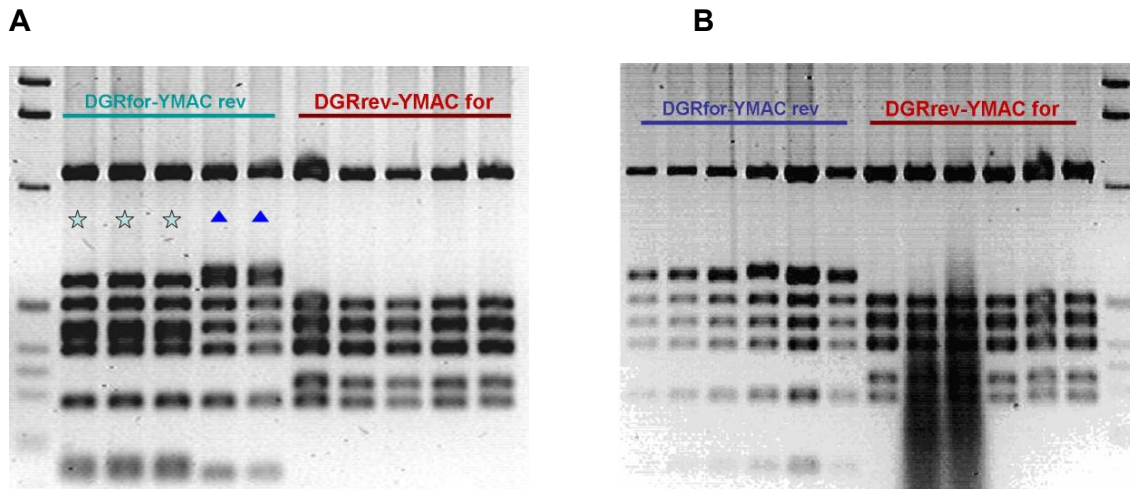
#### **C.1 Obtención del material vegetal**

En el año 2006, como resultado de una colaboración entre grupos de la UNAM y del IPICYT se caracterizó el componente A del virus OkYMMV en plantas de okra con síntomas de virosis colectadas en el estado de Morelos, México.

En enero del 2010 se colectaron en el estado de Colima muestras de dos plantas diferentes, *Herissantia crispa* y *Sida rhombifolia* con síntomas de virosis.

#### **C.2 Extracción de DNA, amplificación y caracterización del DNA viral**

A estas muestras se les extrajo el DNA y se detectó por medio de PCR la presencia de begomovirus. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para realizar la detección (Tabla 3) la combinación DGRN For e YMAC-N Rev los cuales dan un producto de amplificación de 1395pb que abarca secuencias de los genes CP y Rep, además de un segundo par de iniciadores para la amplificación de la secuencia viral restante, YMAC-N For y DGRS Rev cuyo producto es de 1270pb, ambos juegos de oligos se traslapan, de manera que los productos de las amplificaciones se puedan ensamblar para así obtener la secuencia del genoma completo, por otro lado para la amplificación del DNA B se utilizaron los oligonucleótidos BC1 290 For/BV1 310 Rev y BV1 310 For/BC1 290 Rev obteniendo un producto de 1485 y 1200pb respectivamente. Estos productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM T-easy y analizados mediante patrones de restricción con las enzimas *EcoRI* y *Hinfl* (Figura 41); las clonas que presentaron patrones de restricción diferentes fueron enviadas a secuenciar.

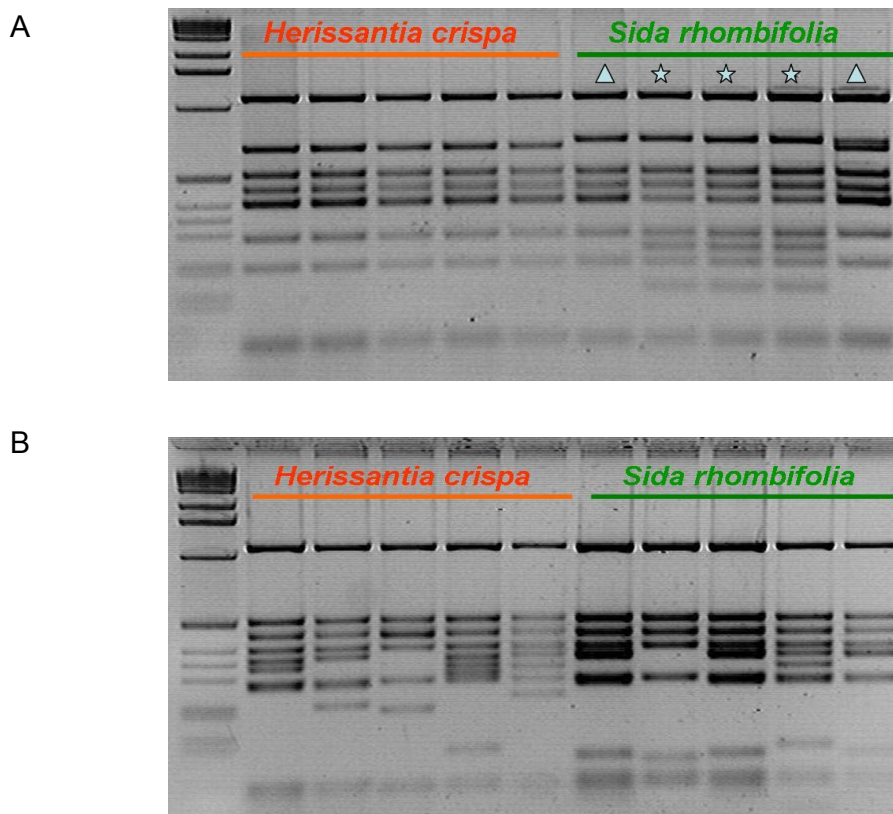


**Figura 41.** Patrones de restricción del componente A utilizando las enzimas *EcoRI* y *Hinfl*. A) Clonas obtenidas a partir del PCR del extracto de la planta de *Sida rhombifolia*, con estrellas y triángulos están señalados los dos patrones de restricción que se obtuvieron. B) Clonas obtenidas a partir del PCR del extracto de la planta de *Herissantia crisper*.

Como se puede observar en la figura anterior, en la planta de *Sida rhombifolia* se encuentran dos virus infectándola, ya que se pueden distinguir dos patrones de restricción diferentes de las clonas que fueron obtenidas de los productos de PCR, utilizando la combinación de los iniciadores DGRfor-YMACrev.

Como se puede apreciar en la figura 42, los patrones de restricción de las clonas obtenidas para el componente B son diversos, en el caso de *Herissantia crisper*, cuando las clonas son obtenidas con la combinación BC1 290 For/BV1 310 Rev se observa un solo patrón, pero para *Sida rhombifolia* se distinguen dos patrones diferentes. Cuando las clonas fueron obtenidas con los productos de PCR amplificados con la combinación 310 Rev/BC1 290 For se ve una mayor diversidad de patrones para ambas plantas.

Tanto para el componente A como para el B fueron enviadas a secuencias aquellas clonas que tuvieron patrones de restricción diferentes, con el fin de conocer que virus estaban infectado a ambas plantas.



**Figura 42.** Patrones de restricción del componente B digeridas con *EcoRI* y *Hinfl*. A) Clonas obtenidas a partir del producto de PCR amplificado con la combinación de oligonucleótidos BC1 290 For/BV1 310 Rev. B) Clonas obtenidas a partir del producto de PCR amplificado con la combinación de oligonucleótidos BV1 310 Rev/BC1 290 For.

De los resultados de secuenciación se obtuvieron 3 diferentes virus, dos de los cuales son dos nuevos “strain” de OkYMMV uno proveniente de *H. crisper* y otro de *S. rhombifolia*, el tercer virus se encontró en infección mixta en la planta *S. rhombifolia* y es una variante del encontrado en *H. crisper*, las secuencias para los componentes A de estos tres virus pueden ser encontradas en la base de datos del GeneBank con los números de acceso, GU990614 OkYMMV [Herissantia:Colima1], GU009612 OkYMMV [Sida:Colima2] y GU990613 OkYMMV [Sida].

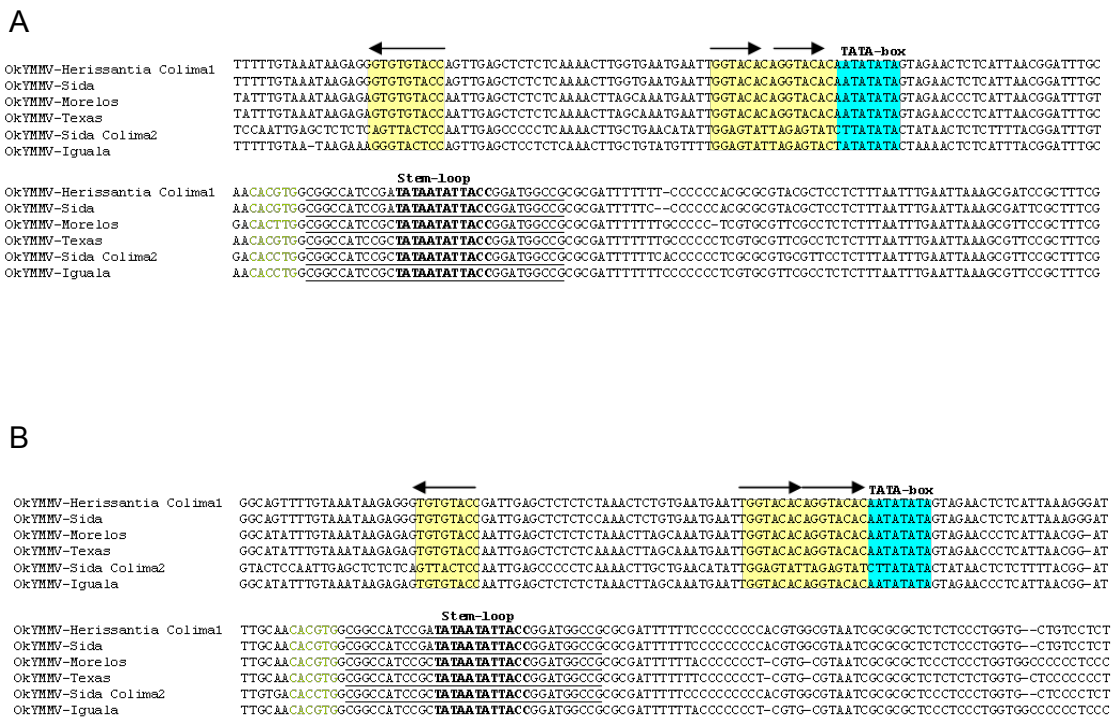
Recientemente se modificaron los criterios para definir especies separadas en el género *Begomovirus* mediante el análisis filogenético con un nuevo programa computacional (Brown et al., 2015). Utilizando este nuevo software, los virus aislados de *H. crisper* y *S. rhombifolia* forman una especie nueva

diferente a OkYMMV, a la que denominamos provisionalmente *Sida yellow speckled virus* (SiYSV).

### C.3 Análisis de secuencia de los virus encontrados.

Una vez obtenidas las secuencias de los genomas completas de los virus encontrados en las muestras del estado de Colima, fueron analizadas para obtener sus relaciones filogenéticas con otros begomovirus.

Una característica importante que se encontró en el genoma de uno de estos virus, es la secuencia de sus iterones (Figura 43), la cual es única y no se encuentra en otros geminivirus de América.



**Figura 43.** Alineamientos de las regiones intergenicas de los componentes A y B. A) Alineamiento de las IR del componente A de los tres virus encontrados con otros OkYMMV reportados previamente. B) Alineamiento de las IR del componente B de los virus encontrados con otros reportados previamente. Las cajas amarillas señalan los iterones, las cajas azules representan la Caja TATA, la caja G es representada por las letras verdes, la estructura tallo-asa esta subrayada y en negritas la secuencia del asa, las flechas indican la dirección de los iterones.

#### **C.4- Obtención de clonas infectivas**

Mediante el uso del kit ThempliPhi se enriqueció el DNA viral en los extractos de DNA total de las muestras. Se digirieron las muestras con diferentes enzimas las cuales son únicas en los genomas de los virus encontrados, esto para obtener monómeros de los genomas virales completos, los que después fueron clonados en el vector pBlueScript previamente digerido con la enzima adecuada. Las clonas obtenidas se digirieron con la misma enzima para verificar la presencia del genoma viral completo. De esta forma se obtuvieron los componentes genómicos A y B completos de la nueva especie, SiYSV. Los ensayos de inoculación fueron realizados en plantas de *Nicotiana benthamiana* por el método de biobalística, pero no se logró producir una infección sistémica en este huésped.

## 5. Discusión Global

Diversos estudios han demostrado que la regulación génica de los begomovirus es un proceso ordenado temporalmente, en el que la regulación de los genes que se transcriben en el sentido complementario a la cadena del virión es más compleja, ya que se han reportado múltiples transcritos que se traslapan, todos ellos con un diferente extremo 5' pero con el mismo 3' terminal. De acuerdo a los reportes que existen sobre este tema, la regulación difiere entre begomovirus específicos, ya que para los virus TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) (Hanley-Bowdoin et al., 1988) y AbMV (*Abutilon mosaic virus*) (Frischmuth et al., 1991) se reportaron tres transcritos, a diferencia de MYMV (*Mungbean yellow mosaic virus*) (Shivaprasad et al., 2005), ACMV (*African cassava mosaic virus*) (Zhan et al. 1991) y TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) (Mullineaux et al. 1993), en los cuales solo dos transcritos fueron encontrados en el sentido complementario. A pesar de diferir en el número de transcritos, los estudios de expresión que se han realizado para conocer qué proteínas son producidas de cada uno de los transcritos, revelaron que solo el más pequeño de ellos es el que puede dar origen a la proteína TrAP. La presencia de transcritos de diversos tamaños supone la existencia de al menos un promotor adicional al ya bien caracterizado promotor bidireccional localizado en la región común, el cual dirige la expresión de los genes AV1 y AC1.

En este estudio se exploró la posible existencia de dicho promotor "interno", utilizando tres virus pertenecientes a diferentes clados, dos de ellos bipartitas y del Nuevo Mundo, OkYMMV y PepGMV, además de un virus monopartita y perteneciente al Viejo Mundo, TYLCV. Mediante experimentos usando promotores truncados en el extremo 5' delimitamos secuencias que tienen la capacidad para dirigir la expresión del gen AC2 en los tres virus analizados, - Secuencias equivalentes a estas ya han sido reportadas, ya que estudios previos identificaron un promotor mínimo localizado entre -129 y -213 corriente arriba del inicio del transcrito del cual es producida la proteína TrAP en TGMV (Shung et al., 2006), y regiones similares en los virus ACMV y MYMV, las

cuales también dirigen la expresión de AC2 (Zhan et al., 1991; Shivaprasad et al., 2005). De acuerdo a nuestros resultados las versiones más cortas del promotor de los tres virus evaluados son capaces de mantener una expresión significativa del gen AC2. Nuestros resultados muestran dos comportamientos distintos, uno para los virus OkYMMV y TYLCV, en los cuales la versión más corta es la que muestra la mayor actividad, y otro para PepGMV en el que el nivel de la actividad disminuye en relación al tamaño del promotor. La diferencia de estos comportamientos podría ser un reflejo de las diferentes estrategias de regulación que tienen los virus de acuerdo al linaje al cual pertenezcan. Tanto OkYMMV como PepGMV son virus del Nuevo Mundo, pero la diferencia entre ellos radica justamente en la región del ORF de Rep, lo cual ubica a PepGMV en el clado del SLCV. Por otra parte TYLCV, cuya versión más corta del promotor analizada en este trabajo fue la que mostró el nivel de actividad más alto de todas las probadas, es un virus que además de ser del Viejo Mundo, posee un genoma monopartita, y por lo tanto no son capaces de producir las proteínas especializadas en el movimiento viral, por lo que esta función es realizada por la proteína de la cápside, cuya regulación depende de TrAP, proteína producida por el gen AC2. Este hecho podría ser la razón de la necesidad del virus de producir mayores cantidades de TrAP y por consecuencia de CP.

Al mapear elementos importantes dentro de la región necesaria para la regulación de AC2 se localizó una secuencia de 9pb (AACGTCATC) en TGMV que puede unir específicamente proteínas tanto de células de tabaco crecidas en suspensión, como de hojas de *Arabidopsis*. Esta secuencia se encuentra en la región que es requerida para la formación del transcrito que produce a TrAP, además, cuando se analizó mediante experimentos de mutación, la acumulación del transcrito de AC2 disminuyó 5 veces (Tu & Sunter, 2007).

Además de su implicación funcional, ésta secuencia se encuentra conservada todos los virus analizados en este estudio, e incluso en dos curtovirus (*Beet curly top virus* y *Spinach curly top virus*). Al analizar las secuencias de las versiones más cortas de los promotores que fueron probadas en nuestro estudio, este elemento de 9 pb está conservado en los tres virus. Los experimentos que se realizaron para conocer la función de este elemento en el promotor de AC2 se llevaron a cabo en un sistema de expresión

transitoria (protoplastos de células de *N. benthamiana* en suspensión) además, cuando las mutaciones de esta secuencia fueron hechas, se alteró el marco de lectura del gen AC1, lo cual pudiera estar afectando la producción de la proteína Rep y, por consiguiente, los resultados obtenidos pudieron ser el reflejo de una falla en la replicación. Por esa razón evaluamos la función de ese elemento nonamérico al introducir mutaciones silenciosas en el mismo, es decir, sin alterar el ORF de AC1, y empleando un sistema diferente, infectando plantas de *N. benthamiana* con PepGMV. Al observar las plantas 15 días post-infección, éstas mostraron una clara diferencia comparadas con las plantas infectadas con el virus silvestre, con una nula aparición de síntomas. Se extrajo DNA de las hojas nuevas de las plantas y se realizó la detección viral mediante PCR, tanto en las plantas infectadas con el virus silvestre como en las que fueron infectadas con el virus mutante se logró la detección del virus solo en dos plantas de 19 inoculadas y esto a niveles muy bajos, lo cual se pudo comprobar cuando se realizó un PCR en tiempo real.

Los estudios que han sido realizados para conocer la(s) función(es) de AC2 en el proceso infeccioso, fueron llevados a cabo con virus mutantes, los cuales no producen a la proteína transactivadora por tener una mutación en el ATG de este gen. El fenotipo observado en estos experimentos fue una pérdida de la capacidad infectiva del virus (TGMV) (Elmer et al., 1988), por otra parte, cuando se probó a este virus en un sistema transitorio (discos de hojas o protoplastos) los resultaron mostraron que la replicación viral no es afectada, pero si la acumulación de ssDNA viral (Sunter, Hartitz, Hormuzdi, & Brough, 1990). Los resultados obtenidos al realizar la infección con el virus mutante pudieron deberse a que la proteína TrAP es necesaria para la activación del gen tardío BC1 el cual es necesario para el movimiento viral. Por otra parte se sabe que TrAP es una proteína multifuncional, que además de activar la expresión de los genes tardío, es un supresor del silenciamiento, un mecanismo que es activado por la planta como defensa ante la presencia del virus. La supresión del silenciamiento llevada a cabo por esta proteína se realiza a varios niveles, por un lado, TrAP puede activar genes supresores del silenciamiento endógenos en las plantas (por ejemplo WEL1), además se une e inactiva a una adenosín-kinasa (ADK) la cual forma parte del mecanismo de



mutilación, el cual es otra forma de defensa de la planta (Sharma & Ikegami, 2008), TrAP puede unirse e inactivar a otra kinasa SNF1, la cual es un regulador global del metabolismo en respuesta al estrés (Wang et al., 2003).

La ausencia de síntomas observada en los experimentos llevados a cabo en este trabajo, son un reflejo de los mecanismo en los cuales está involucrada la proteína codificada por el gen *AC2*, debido a que la mutación según lo previamente reportado, no elimina por completo su producción pero sí reduce la cantidad de TrAP sintetizada, a niveles que no son suficientes para realizar sus funciones; por una parte, la transactivación de los genes que codifican las proteínas de movimiento pudiera no llevarse a cabo a los niveles requeridos, por lo que el virus podría no ser transportado a través de la planta, y por otro lado, las bajas cantidades de TrAP no son suficientes para suprimir las respuestas de silenciamiento génico de la planta, como mecanismo de defensa ante la infección viral.

## 6. Referencias

- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*, *203*, 90-100.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. (1994). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol Biol*, *26*, 553-556.
- Berger, M. G., Sunter, G. (2013). Identification of sequences required for AL2 – mediated activation of the tomato golden mosaic virus – yellow vein BR1 promoter. *J Gen Virol*. *94*(Pt6): 1398 – 406.
- Berk, A. J., Adenovirus E1A trans-activation: Understanding it will require learning how  
Briddon, R. W., Stanley, J.,(2006) Subviral agents associated with plant single – stranded DNA viruses. *Virology* *344*. 198 – 210.
- Carmo LS, Resende RO, Silva LP, Ribeiro SG, Mehta A. (2013) Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics*. *13* (12 – 13).
- Cazzonelli, C. I., & Velten, J. (2008). In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters. *Transgenic Research*, *17*, 437-457. doi:10.1007/s11248-007-9117-8
- Cazzonelli, C. I., Burke, J., & Velten, J. (2005). Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant Mol Biol*, *58*, 465-481. doi:10.1007/s11103-005-6589-x
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Mol Plant Path*. DOI: 10.1111/mpp.12032
- Frey, P. M., Schärer-Hernández, N. G., Fütterer, J., Potrykus, I., & Puonti-Kaerlas, J. (2001). Simultaneous Analysis of the Bidirectional African Cassava Mosaic Virus Promoter Activity Using Two Different Luciferase Genes. *Virus Genes*, (11), 231-242.
- Gerster, T., and Roedor, R. G., A herpes trans-activating protein interacts with transcription factor OF-1 and other cellular proteins. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *85* 6347- 6351.
- Grigoras, I., Timchenko, T., Grande – Pérez, A., Katul, L., Vetten, H. J., Gronenborn, B. (2010). High Variability and Rapid Evolution of a Nanovirus. *J Virol*. *Sep*, *84*(18): 9105 – 9117.
- Gutierrez, C. (2000). Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol Biol*, *43*(5-6), 763-72.
- Haley, A., Zhan, X., Richardson, K., Head, K., & Morris, B. (1992). Regulation of the Activities of African Cassava Mosaic Virus Promoters by the AC1, AC2, and AC3 Gene Products. *Virology*, *188*, 905-909.

Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:777–788. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3117>. PubMed PMID: 24100361.

Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., & Rogers, S. G. (1989). Functional Expression of the Leftward Open Reading Frames of the A Component of Tomato Golden Mosaic Virus in Transgenic Tobacco Plants. *The Plant Cell*, 1(November), 1057-1067.

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., & Robertson, D. (2004). Reprogramming plant gene expression : a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Path*, 5, 149-156. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00214.X

Hehne, S., Wege, C., & Jeske, H. (2004). Interaction of DNA with the Movement Proteins of Geminiviruses Revisited. *J Virol*, 78(14), 7698-7706. doi:10.1128/JVI.78.14.7698

Hogenhout, S. A, Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Ann. Rev. Phytopathol*, 46, 327-59. doi:10.1146/annurev.phyto.022508.092135

Hung, Hsiu-Cheng, & Petty, I. T. D. (2001). Functional equivalence of late gene promoters in bean golden mosaic virus with those in tomato golden mosaic virus. *J Gen Virol*, 82, 667-672.

Jackel, J. N., Buchmann, R. C., Singhal, U., Bisaro, D. M. (2015). Analysis of geminivirus AL2 and L2 proteins reveals a novel AL2 silencing suppressor activity. *J Virol*. 89(6): 3176 – 87.

Kumar V, Mishra SK, Rahman J, Taneja J, Sundaresan G, Mishra NS, Mukherjee SK. (2015) Mungbean yellow mosaic Indian virus encoded AC2 protein suppresses RNA silencing by inhibiting Arabidopsis RDR6 and AGO1 activities. *Virology*. 486: 158 – 72.

Lacatus, G., & Sunter, G. (2008). Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. *Virology*, 376, 79-89. doi:10.1016/j.virol.2008.03.012

Lacatus, G., & Sunter, G. (2009). The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2009.07.004

Lacatus, G., & Sunter, G. (2009). The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2009.07.004

McKnight, S. L., Yamamoto, K. R (1992) The general transcription factors function. In *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor N.Y. pp 727 – 742.

Noris, E., Jupin, I., Accotto, G. P., & Gronenborn, B. (1996). DNA-Binding Activity of the C2 Protein of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus. *Virology*, 217, 607-612.

Ohnesorge, S., & Bejarano, E. R. (2009). Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). *Insect Mol Biol*, 18(6), 693-703. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00906.x

Rajeswaran R, Sunitha S, Shivaprasad PV, Pooggin MM, Hohn T, Veluthambi K. (2007). The mungbean yellow mosaic begomovirus transcriptional activator protein

transactivates the viral promoter – driven transgene and causes toxicity in transgenic tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 20 (12): 1545 – 54.

Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Ann Rev Phytopathol*, 43, 361-94. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939

Rosenthal, Leonard J., and Brown, Myles. (1977). The control of SMV40 transcription during a lytic infection: late RNA synthesis in the presence of inhibitors of DNA replication. *Nucleic Acids Res.* Vol 4 Number 3, p(551 – 565)

Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R. G., Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). Identification of a Sequence Element Involved in AC2-Mediated Transactivation of the Pepper Huasteco Virus Coat Protein Gene. *Virology*, 253, 162-169.

Selth, L. A, Dogra, S. C., Rasheed, M. S., Randles, J. W., & Rezaian, M. A. (2006). Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. *Plant Mol Biol*, 61(1-2), 297-310. doi:10.1007/s11103-006-0028-5

Settlage, S. B., See, R. G., & Hanley-Bowdoin, L. (2005). Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions. *J Virol*, 79(15), 9885-9895. doi:10.1128/JVI.79.15.9885

Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Trinks, D., Rajeswaran, R., Veluthambi, K., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2005). Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. *J Virol*, 79, 8149-8163.

Shung, C.-Y., & Sunter, G. (2007). AL1-dependent repression of transcription enhances expression of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3. *Virology*, 364, 112-122. doi:10.1016/j.virol.2007.03.006

Shung, C.-Yi, & Sunter, G. (2009). Regulation of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3 gene expression by a conserved upstream open reading frame. *Virology*, 383, 310-318. doi:10.1016/j.virol.2008.10.020

Shung, C.-Yi, & Sunter, G. (2009). Regulation of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3 gene expression by a conserved upstream open reading frame. *Virology*, 383, 310-318. doi:10.1016/j.virol.2008.10.020

Shung, C.-Yi, Sunter, J., Sirasanagandla, S. S., & Sunter, G. (2006). Distinct Viral Sequence Elements Are Necessary for Expression of. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 19(12), 1394-1405.

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): Evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*, 232, 269-280.

Thömmes, P. a, & Buck, K. W. (1994). Synthesis of the tomato golden mosaic virus AL1, AL2, AL3 and AL4 proteins in vitro. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 8), 1827-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046385>

Trinks, D., Rajaswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T., Pooggin, M. M. (2005) Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *J Virol.* Feb; 79(4): 2517 – 2527.

Tu, J., & Sunter, G. (2007). A conserved binding site within the Tomato golden mosaic virus AL-1629 promoter is necessary for expression of viral genes important for pathogenesis. *Virology*, 367, 117 - 125. doi:10.1016/j.virol.2007.04.018

Varsani, A., Navas – Castillo, J., Moriones, E., Hernández – Zepeda, C., Idris, , A., Brown, J. K., Zerbini, F. M., Martin, D. P. (2014) Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch Virol*, Volume 159, issue 8, pp 2193 – 2203.

Wysocka, J., & Herr, W. (2003). The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Bioch Sci*, 28(6), 294-304. doi:10.1016/S0968-0004(03)00088-4

Yaakov, N., Levy, Y., Belausov, E., Gaba, V., Lapidot, M., and Gafni, Y. (2011) Effect of a single amino acid substitution in the NLS domain of Tomato yellow leaf curl virus – Israel (TYLCV – IL) capsid protein (CP) on its activity and on the virus life cycle. *Virus Res.* Jun;158(1-2):8-11. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.016. Epub 2011 Mar 3

Yang X., Baliji S., Buchmann R. C., Wang, H., Lindbo, J. A., Sunter, G., Bisaro, D. M. (2007). Functional Modulation of the Geminivirus AL2 Transcription Factor and Silencing Suppressor by Self-Interaction. *J Virol.* Nov, 81(21): 11972 - 11981

Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *J Gen Virol* 98: 31 – 133.

Zhan, X. C., Haley, A., Richardson, K., & Morris, B. (1991). Analysis of the potential promoter sequences of African cassava mosaic virus by transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene. *J Gen Virol*, 72, 2849-2852.

# ANEXOS

## a.1- Reacción en cadena de la polimerasa PCR

La amplificación de todos los fragmentos utilizados en este estudio se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Las condiciones en las que fueron realizadas las amplificaciones fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial:

94°C por 5 minutos

32 ciclos:

94°C por 1 minuto

55°C por 1 minuto

72°C por 1\* minuto

\* Para la amplificación de fragmentos mayores de 1Kb se añadió 1 minuto por cada Kb a amplificar

Extensión final:

72°C por 10 minutos

## a.2- Transformación de *Escherichia coli* por choque térmico

1. Adicionar 5uL del plásmido a transformar a un tubo con células calcio competentes
2. Dejar incubar por 10 minutos en el hielo
3. Dar un choque térmico durante un minuto en un baño con agua a 42°C
4. Transcurrido el minuto regresar inmediatamente al hielo
5. Incubar por 15 minutos
6. Agregar 250uL de medio líquido LB
7. Incubar a 37°C con agitación durante una hora
8. Sembrar 100uL en una placa con medio sólido LB con ampicilina (100mg/uL) \*Adicionar IPTG y X-Gal a las placas cuando la construcción permita ser seleccionada por su coloración
9. Dejar incubar a 37°C durante 16 horas

## a.3- Extracción de DNA plasmídico por el método de Birnboim

1. Poner un cultivo de la bacteria de 3ml de medio LB líquido con antibiótico a 37°C con agitación toda la noche.
2. Vaciar 1.5ml aproximadamente del cultivo en un tubo eppendorf
3. Centrifugar a 8000rpm durante 2 minutos

4. Descartar el sobrenadante
5. Agregar 100uL de solución Birboim I, resuspender la pastilla con vórtex
6. Agregar 200uL de solución Birboim II y mezclar suavemente por inversión
7. Agregar 150uL de solución Birboim III, mezclar por inversión suave
8. Dejar reposar en hielo durante 5 minutos
9. Centrifugar a 13,000rpm durante 15 minutos
10. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, tener cuidado de no tomar el precipitado blanco
11. Añadir 5uL de RNasa 8mg/ml y dejar incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos
12. Agregar 900uL de etanol absoluto y 45uL de acetato de sodio 3M, mezclar por inversión
13. Dejar reposando en hielo durante 5 minutos
14. Centrifugar a 13,000rpm por 5 minutos
15. Desechar el sobrenadante y agregar 500uL de etanol al 70%
16. Centrifugar a 13,000rpm durante 3 minutos
17. Eliminar el sobrenadante
18. Dejar secar la pastilla
19. Resuspender en 50ul de TE pH 8

#### Soluciones empleadas

Birboim I

Glucosa 50mM

Tris 25mM pH8

EDTA 10mM pH8

Birboim II (Se prepara antes de usarse)

NaOH 0.2M

SDS 20%

Birboim III

Acetato de potasio 3M

Acido acético glacial 11.5% v/v

Las soluciones I y II se esterilizan en autoclave

#### **a.4- Preparación de protoplastos de células NT1 para ensayos de expresión transitoria**

1. Mantener las células NT1 en fase logarítmica subcultivando cada cuatro días.
2. En campana de flujo laminar, transferir 15 ml del cultivo de células NT1 (3-4 días después del subcultivo, al final se obtiene un paquete +/- de 1.0 ml de células, suficiente para seis electroporaciones) a un tubo cónico y centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Retirar el sobrenadante

4. Lavar con Manitol 0.4M
5. Centrifugar a 1000 rpm por 2 min y retirar sobrenadante
6. Agregar 1.5 volúmenes de solución enzimática por cada volumen de células compactadas
7. Mezclar lentamente por inversión hasta que todo el pellet esté disuelto.
8. Incubar en el mismo tubo, a 25°C con agitación a 65 rpm por unos 45 minutos
9. Para evaluar la eficiencia de la preparación, observarla en microscopio de luz a los 30 minutos y mientras se estandariza el protocolo, hacerlo cada media hora hasta establecer el momento en el que más del 95% de las células adquieren una forma redondeada.

**Nota:** No se recomienda dejarlos en la solución enzimática más de una hora. En caso de no irse a usar inmediatamente, se centrifugan a 500 rpm por 2 min y se retira cuidadosamente el líquido con pipetas Pasteur (los protoplastos pueden quedar flotando); se lavan con manitol 0.4 M y se ponen en frascos con medio de cultivo para protoplastos. Pueden ser cultivados en oscuridad por 1-2 días, sin agitación, pero al tercer día ya tendrán la pared completamente regenerada.

### **a.5- Electroporación de protoplastos de células NT1**

#### Preparación del DNA

1. Cuantificar el DNA plásmidico a transfectar y tener disponibles 15 ug de DNA purificado por cada transfección a realizar.
2. Precipitar el DNA a electroporar y eluirlo en buffer de electroporación a una concentración de 1ug/ul.

#### Electroporación

1. Esterilizar las celdillas y tenerlas en hielo.
2. Colectar protoplastos a los 30 min de incubación a 25°C (tiempo al que más del 95% son células redondas)
3. Centrifugar a 1000 rpm por 2 min
4. Retirar cuidadosamente el líquido con pipeta Pasteur
5. Agregar 15 ml de Manitol 0.4 M
6. Centrifugar a 1000 rpm 2 min
7. Repetir pasos 3-5
8. Repetir pasos 3-6, lavando ahora dos veces con 15 ml de Buffer de electroporación
9. Resuspender las células en unos 10 ml de Buffer de electroporación  
**Nota:** Una buena preparación de protoplastos se puede resuspender en 2 volúmenes de éste buffer y tendrá en promedio la concentración final requerida, evitando el conteo de células.
10. Contar la cantidad de células por ml poniendo 100 ul en la cámara de Neubauer, contar en los cuatro cuadros de las esquinas y en el del centro.



11. Diluir las células en Buffer de electroporación hasta una concentración de  $3-5 \times 10^6$  células/ml, poner en hielo y electroporar cuanto antes, ya que este buffer no es muy favorable para las células.
12. Mezclar cuidadosamente en un tubo las células con el DNA. Se ponen 300 ul de células resuspendidas con por cada 15 ug de DNA a electroporar.
13. Poner 300 ul de células + DNA en la celda de electroporación.
14. Dejar 5 min a temperatura ambiente
15. Electroporar a 500 uF y 250 volts.
16. Reposar las células en hielo durante 15 minutos
17. Colectar las células electroporadas lavando cuidadosamente la celdilla con medio NT1+ manitol 0.4M y ponerlas en cajas Petri pequeñas (Un volumen final de 7 ml de cultivo de protoplastos en NT1+manitol).
18. Incubar a 25 °C por 48 horas, sin agitación.

## Soluciones

### Solución enzimática

50 ml deben alcanzar para generar material para 50 electroporaciones.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad/50 ml</b>	<b>Conc. Final</b>
Manitol	3.64g	0.4M
MES	0.213g	20 mM
Celulasa	0.5g	1%
Pectoliasa	0.05g	0.1%

Disolver todo en agua destilada estéril durante toda la noche a 4°C. Esterilizar la solución pasándola a través de un filtro de 0.22 um. Poner a temperatura ambiente antes de usar.

### Medio de cultivo de protoplastos

Medio NT1 líquido + Manitol a concentración final 0.4 M (72.86 g para 1.0 L). Ajustar el pH entre 5.5- 5.7 y autoclavar. Almacenar protegido de la luz.

### Buffer de electroporación

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad/ 500 ml</b>	<b>Conc. Final</b>
NaCl	4g	0.8%
KCl	0.1g	0.02%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1g	0.02%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5g	0.11%
Manitol	36.43g	0.4M

Ajustar pH a 6.5 con HCl y esterilizar

### a.6- Ensayo de actividad de GUS (*uidA*), adaptado para Fluorómetro lector de microplacas

1. Pesar 100 mg de tejido o de células en cultivo, incluyendo controles negativos. Almacenar a -80°C mientras se usan.
  2. Triturar el tejido con pistilo estéril, usando nitrógeno líquido en los casos necesarios.
  3. Agregar 500 ul de buffer de extracción de proteína
  4. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min
  5. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo. Almacenar a -80°C (NUNCA A -20) hasta su uso.
  6. Cuantificar el contenido de proteína total (Ver método de Bradford)
  7. En una serie de tubos nueva servir 60 ul de buffer de ensayo de GUS. Agregar a los tubos anteriores 6.0 ul de cada extracto de proteínas, mezclar bien.
  8. Poner 18 ul de la dilución anterior en 182 ul de Buffer de parada previamente servido en la microplaca (Tiempo 0). Mezclar bien
  9. Incubar el volumen restante en los tubos a 37°C durante media o una hora, tomando alícuotas de 18 ul a cada intervalo que se quiera hacer una medición (Tiempos 1 y 2)\*, y poniéndolas en el buffer de parada en el pozo respectivo.
  10. Para la curva estándar de Metil Umbeliferona servir 200 ul de cada dilución de la curva en el pozo correspondiente (por triplicado).
  11. Leer en fluorómetro a longitud de onda de excitación de 365 nm y emisión de 450 nm. (el rango de excitación de la metil umbeliferona esta entre 360 y 372 nm, y el de emisión entre 440 y 470 nm).
- \*Los intervalos de tiempo se pueden modificar según convenga.

Reportar los datos como:

$$\text{Actividad GUS} = \frac{\text{nmoles MUG hidrolizados}}{\text{Hora}}$$

**Nota.** Este protocolo también sirve para cuantificar indirectamente la producción de b-glucuronidasa, usando una curva de emisión de fluorescencia de la metil umbeliferona de sodio (NaMU) y datos de cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford. En este último caso se cuantifica la concentración de proteína extraída y el valor en la curva se lee como:

$$\text{Actividad GUS} = \frac{\text{nmoles MUG hidrolizados}/\mu\text{g proteína}}{\text{Hora}}$$

NOTA. Al montar este proceso en un nuevo equipo, ajustarlo a un nuevo volumen para la medición o cambio en la longitud de onda, es conveniente hacer una curva de emisión de fluorescencia del producto de la enzima purificada, para comparar con la curva estándar y así estimar la cantidad de GUS que produce el sistema.

#### Soluciones:

##### Buffer de extracción de proteínas (Buffer de extracción de GUS)

Reactivo	Concentración Final
Fosfato de sodio 0.5 M pH 7.0	50 mM
Ditiotreitol	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
Lauril-sarcosina	0.1% w/v
Triton X-100 10% v/v	0.1% v/v

##### Buffer de ensayo de GUS

Reactivo	Concentración final
Buffer de extracción de GUS	
4-Metil-umberil- $\beta$ -glucuronido (MUG)	1 mM

Alicuotar en volúmenes de 1.0 ml y almacenar a -80°C.

##### Buffer de parada de la reacción

Reactivo	Concentración final
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.2 M

##### Curva estándar de metil umbeliferona

Reactivo	Concentración final
Metil umbeliferona de sodio (NaMU)	1 $\mu$ M
Buffer de parada de reacción	

Hacer las diluciones necesarias para una curva entre 0 y 5 nM de Na-metil umbeliferona.

## a.7- Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

- Preparar varias celdillas, para el estándar y las muestras. Mantener en frío.
- Poner 10 ul de la solución problema (y/o dilución de ésta en caso necesario) en 1 ml de Solución B. Hacer igual para las diluciones de la curva.
- Mezclar bien e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 595 nm
- Graficar valores de la curva estándar y extrapolar lectura de la muestra problema.

Soluciones

### Solución A

Reactivo	Cantidad
Etanol 95%	25 ml
Ácido fosfórico 85%	50 ml
Azul de Coomasie	87.5 mg

Mezclar y agitar hasta disolver completamente. Filtrar con filtro de 0.22 um y almacenar a 4°C.

### Solución B (Reactivo de Bradford)

Reactivo	Cantidad
Etanol 95%	7.5 ml
Ácido fosfórico 85%	15 ml
Solución A	15 ml

Aforar a 250 ml con agua destilada estéril y almacenar a 4°C.

### Curva estándar de BSA

Hacer un stock de BSA a 1mg/ml en el mismo buffer de fosfatos en que se tiene la muestra de proteínas a cuantificar.

La curva recomendable para extractos vegetales: 0, 1, 5, 10 y 20 ug/ul.

## a.8- Cultivo de células de tabaco (Línea NT1)

### **Cultivo en suspensión**

Este se hace con el fin de mantener la línea celular. Las células se crecen en volúmenes de unos 100 ml de medio NT1 líquido, en oscuridad y con agitación constante a 125 rpm. El cambio de medio de cultivo se hace cada 7-10 días, vaciando una alícuota de unos 20 ml de cultivo al nuevo frasco recién esterilizado con el medio NT1 (a T° ambiente).

### *Medio líquido NT1*

1. Preparar las siguientes soluciones stock

<b>Solución</b>	<b>Contenido</b>	<b>Cantidad (g)/ 250 mL (stock 100X)</b>
<b>I</b> (Nitratos)	Nitrato de amonio	41.25
	Nitrato de potasio	47.5
<b>II</b> (Sulfatos)	Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O	8.57
	Sulfato de manganeso H <sub>2</sub> O	0.4225
	Sulfato de Zinc 7H <sub>2</sub> O	0.215
	Sulfato de cobre 5H <sub>2</sub> O	0.000625
<b>III</b> (Halógenos)	Cloruro de calcio 2H <sub>2</sub> O	11
	Yoduro de potasio	0.021
	Cloruro de cobalto 6H <sub>2</sub> O	0.000625
<b>IV</b> (Fosfatos)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.25
	Ácido bórico	0.155
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.000625
<b>V</b> (Quelatos y vitaminas)	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.695
	EDTA 2H <sub>2</sub> O	0.9325
	Myo-inositol	2.5
	Tiamina HCL	0.025

Almacenar la solución **I** a temperatura ambiente y las soluciones **II-V** a -4°C.

Preparar por separado un stock de ácido 2-4, Diclorofenoxiacético (2-4, D) a una concentración de 1.0 mg/ml. Almacenar a -20°C.

2. Preparar el Medio NT1 de la siguiente manera:

Para un litro:

- Agregar 10 ml de cada una de las soluciones stock en 500 ml de agua destilada
- Agregar 30 g de sacarosa
- Agregar 2 ml de 2-4, D 1.0 mg/ml
- Aforar a 1.0 L
- Ajustar a un pH entre 5.2 – 5.7 con KOH
- Esterilizar al momento de la preparación y almacenar a -4°C

- Esterilizar nuevamente cada alícuota que se vaya a usar para cambio de medio

### **a.9- Inoculación viral de plantas por el método de biobalística**

Preparación de micropartículas de tungsteno

1. Pesar 60mg de partículas de tungsteno
2. Resuspender en 2ml de  $\text{HNO}_3$  0.1N y sonicar por 20 minutos (en frío)
3. Centrifugar a 10,000rpm durante 2 minutos
4. Eliminar el sobrenadante y agregar 2ml de etanol absoluto
5. Sonicar brevemente
6. Centrifugar a 10,000rpm durante 2 minutos
7. Eliminar el sobrenadante y agregar 1 ml de agua desionizada estéril
8. Resuspender las partículas en el agua
9. Tomar alícuotas de 250uL y repartirlas en 4 tubos eppendorf nuevos
10. Agregar 750uL de agua desionizada estéril a cada una de las alícuotas
11. Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$

La concentración final de las partículas de tungsteno es de 15mg/uL

Preparación de DNA para el bombardeo (esta preparación alcanza para 6 plantas)

1. Mezclar en un tubo eppendorf de 1.5ml nuevo y estéril:  
50uL de las partículas de tungsteno  
5uL de DNA (para cada planta a bombardear se utilizan 2mg de DNA)  
50uL de  $\text{CaCl}_2$  2.5M  
20uL de espermidina base libre 0.1M
2. Mezclar y sonicar hasta observar homogéneas las partículas
3. Centrifugar 10 segundos a 10,000rpm
4. Eliminar el sobrenadante y agregar 400uL de etanol absoluto
5. Sonicar brevemente hasta homogenizar
6. Centrifugar 10 segundos a 10,000rpm
7. Eliminar el sobrenadante
8. Resuspender en 60uL de etanol absoluto
9. Sonicar brevemente
10. Utilizar 10uL para cada disparo

Soluciones

$\text{HNO}_3$	0.1N
$\text{CaCl}_2$	2.5M
Espermidina base libre	0.1M
Etanol absoluto	

#### **a.10- Extracción de DNA de plantas**

1. Pesar 100mg de tejido vegetal y congelar con nitrógeno líquido
2. Agregar 250uL de buffer AP y macerar el tejido
3. Dejar 30 minutos a temperatura ambiente
4. Centrifugar a 12,000rpm durante 5 minutos
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5ml
6. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1)
7. Mezclar y centrifugar a 12,000rpm durante 3 minutos
8. Repetir los pasos del 5 al 7
9. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo
10. Agregar 8uL de RNasa y dejar incubando a temperatura ambiente durante media hora
11. Agregar 0.2 volúmenes de acetato de amonio o de sodio 10M y 1 volumen de isopropanol, mezclar por inversión
12. Incubar a -20°C durante una hora
13. Centrifugar a 12,000rpm durante 10 minutos
14. Lavar dos veces con etanol al 70%, agregando 500ul y centrifugando a 12,000rpm durante 5 minutos
15. Dejar secar la pastilla de DNA
16. Resuspender en 30ul de agua estéril

Buffer AP

Urea 7M

NaCL .35M

Tris 0.05M pH8

EDTA 0.02M

Sarcosina 1%

#### **a.11- Tinción histológica para GUS (Jefferson, R.A, 1987)**

1. Colocar el material vegetal en un tubo eppendorf nuevo. En caso de que la muestra sea más grande se pueden usar tubos Falcon de 15ml.
2. Someter a vacío las muestras por 3 minutos.
3. Incubar las muestras a 37°C por 18-24 horas.
4. Eliminar el buffer de reacción
5. El tejido se destiñe utilizando etanol absoluto e incubando a 37°C con agitación, cambiando el etanol cuando sea necesario, hasta eliminar todo el pigmento verde de la hoja.
6. Las muestras se pueden conservar en glicerol al 50%

Buffer de reacción	
Fosfato monobásico de sodio	12.0 g/L
Fosfato dibásico de sodio	14.2 g/L
EDTA	10.0 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Tritón	0.1% vol/vol
*X-Gluc	2.0 mM

\* Se agrega justo antes de usarse



## a. 12- Artículo Generado

Mariana Cantú-Iris, Guillermo Pastor-Palacios, Jorge Armando Mauricio-Castillo, Bernardo Bañuelos-Hernández, Jesús Aarón Avalos-Calleros, Alejandro Juárez-Reyes, Rafael Rivera-Bustamante, Gerardo Rafael Arqüello-Astorqa. Analysis of a new beqomovirus unveils a composite element conserved in the *CP* gene promoters of several *Geminiviridae* genera: clues to comprehend the complex regulation of late genes. PLoS One. 2019 January. El trabajo fue aceptado para su publicación el día 7 de enero del 2019