

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
ANTECEDENTES	4
1.1 Importancia del cultivo de la papaya	4
1.2 Virus de la meleira de la papaya (PMeV)	6
1.3 <i>Umbravirus</i>	7
1.3.1 Similitud con otros taxones	8
1.3.2 Criterios de demarcación de especies en el género.....	9
1.4 Virus similares a <i>Umbravirus</i>	10
1.4.1 Virus similares a <i>Umbravirus</i> de la papaya	11
1.4.2 Virus de la meleira de la papaya variante mexicana (PMeV-Mx)	13
1.5 RNA largo no codificante (lncRNA).	14
1.5.1 RNA largo no codificante viral.....	14
1.6 Estructura secundaria del RNA	17
1.6.1 Estructuras secundarias de los lncRNA.....	18
1.7 Clones infecciosos de cDNA de virus de plantas.....	19
1.7.1 Métodos avanzados para el ensamblaje de clones infecciosos binarios	20
1.7.2 Método de ensamblaje de Gibson (GA).....	23
1.8 Inoculación de plantas con virus de mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPOTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
CAPITULO II.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29

2.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx.....	29
2.1.2. Síntesis de la secuencia de longitud completa de PMeV-Mx.....	29
2.1.3. Vector pGEM®-T-Easy	30
2.1.4. Transformación de pGEM-T Easy::PMeV-Mx	31
2.1.5. Verificación de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx	31
2.1.6. Vector pDIVA.....	32
2.1.7. Verificación del vector pDIVA	33
2.1.8. Subclonación de PMeV-Mx en el vector pDIVA (GA).....	33
2.1.9. Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA)	33
2.1.10. Purificación de los amplicones.....	34
2.1.11. Ensamblaje de la clona infectiva (GA)	34
2.1.12. Ensayos de digestión con enzimas restricción.....	35
2.1.13. Verificación de la clona infectiva por PCR	35
2.1.14. Verificación de la clona infectiva por secuenciación de Sanger	35
2.1.15. Transfección de las clonas infectivas a <i>A. tumefaciens</i>	36
2.1.16. Establecimiento de la agroinfiltración.....	36
2.2. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL RNA LARGO NO CODIFICANTE DE PMeV-Mx.....	38
2.2.1. Secuencia y estructura secundaria 3'OH de PMeV-Mx.....	38
2.2.2. Análisis de la estructura secundaria del RNA largo no codificante de PMeV-Mx	38
2.2.3. Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx.....	38
2.3. DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL lncRNA	39
2.3.1. Estrategia para el diseño de cebadores para el Ensamble Gibson	39
2.3.2. Verificación de las mutantes	41
2.3.3. Transfección de la Mutante 1 a <i>A. tumefaciens</i>	41
2.4. MATERIAL VEGETAL.....	41
2.4.1. Germinación	42

CAPITULO III	43
RESULTADOS.....	43
3.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx.....	43
3.1.1. Secuencia de longitud completa de PMeV-Mx.....	43
3.1.1. Vector pDIVA.....	44
3.1.2. Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA)	45
3.1.2. Ensamble de clona infectiva (GA).....	46
3.2. Verificación de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx.....	52
3.2.1. Verificación de digestión con enzimas de restricción	52
3.2.2. Cebadores para la verificación por PCR.....	54
3.2.3. Verificación por PCR de colonia	55
3.2.4. Verificación por PCR de DNA plasmídico	55
3.3. Secuenciación de las clonas infectivas.	57
3.3.1. Clona 1.....	57
3.3.2. Clona 2.....	74
3.4. Transfección directa a <i>A. tumefaciens</i>	77
3.5. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL lncRNA DE PMeV-Mx.....	78
3.5.1. Análisis de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx	78
3.5.2. Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx.....	82
3.5.3. Análisis del extremo 3' OH de PMeV-Mx	83
3.6. DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL lncRNA	86
3.6.1. Diseño de cebadores para las mutantes del lncRNA	88
3.7. Construcción de la Mutante 1.....	89
3.7.1. Verificación de la construcción de la Mutante 1	91
3.8. MATERIAL VEGETAL.....	92
CAPITULO IV.	97
DISCUSIÓN	97

CAPITULO V.	97
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	103
CONCLUSIONES.....	103
PERSPECTIVAS.....	104
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXO.	112

RESUMEN

PMeV-Mx es un virus nuevo similar a *Umbravirus* asociado a la meleira de la papaya en México, esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas en el cultivo de papaya. El virus tiene un genoma de RNA de cadena sencilla, de 4.3 Kb, codifica para dos marcos de lectura abiertos y tiene un RNA largo no codificante (lncRNA). Al igual que los umbravirus, no codifica una proteína de la cápside, por lo que no es posible purificar partículas virales para confirmar la etiología de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es determinar si el genoma viral es necesario y suficiente para producir la enfermedad, así como caracterizar la secuencia del lncRNA. En este proyecto se desarrolló una clona infectiva de PMeV-Mx por el método de ensamble de Gibson, la cual se encuentra bajo el control del promotor CaMV 35S y de una Ribozima viral para el control de la expresión del RNA viral en plantas mediante agroinfiltración. Los resultados de este estudio son el primer acercamiento a la caracterización de la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx, donde se identificaron regiones putativamente involucradas en la replicación del virus, para las cuales se realizó el diseño de mutantes sitio dirigidas y se culminó con la construcción de una mutante ensamblada por el método de Gibson. Lo anterior permitirá, en un futuro cercano, la caracterización *in vivo* de estas regiones mediante el análisis de su expresión en plantas. Complementariamente, la construcción de una clona infectiva del Virus asociado a la meleira de la papaya en México (PMeV-Mx) podría contribuir a facilitar la investigación de la patogénesis viral, así como ayudar al esclarecimiento de la etiología de enfermedad en México.

ABSTRACT

PMeV-Mx is a new Umbravirus-like associated with papaya meleira in Mexico, this disease causes serious economic losses in papaya cultivation. The virus has a single-stranded RNA genome of 4.3 Kb, encodes two open reading frames, and has a long non-coding RNA (lncRNA). Like the umbraviruses, it does not encode a capsid protein, so it is not possible to purify viral particles to confirm the etiology of the disease. The aim of this work was to determine if the viral genome is necessary and sufficient to cause the disease, as well as to characterize the sequence of the lncRNA. An infectious clone of PMeV-Mx was generated inserting the viral genome in a binary vector using Gibson assembly. The plasmid contains the CaMV 35S promoter and a viral Ribozyme to control viral RNA expression in plants. As an approach towards the characterization of the PMeV-Mx lncRNA, regions of secondary structure putatively involved in virus replication were identified for which the design of site-directed mutants was carried out, culminating in the construction of a mutant assembled by Gibson's method. This reverse genetic approach will allow, in the near future, the characterization of the secondary structure rich regions in plants. In addition, the construction of an infectious clone of PMeV-Mx could contribute to understand the etiology of the disease in Mexico and facilitate to identify genetic determinants of pathogenicity.