

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



CONSTRUCCIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DE ToBRFV:
AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA Y DE LA RIBOZIMA

Por:

AYLIN DE JESUS GUTIERREZ JUAREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Abril 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Construcción de un clon infeccioso de ToBRFV: amplificación del genoma y de la
ribozima

por:

AYLIN DE JESUS GUTIERREZ JUAREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

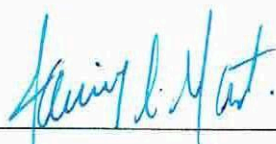
Aprobada por el comité de Asesoría:



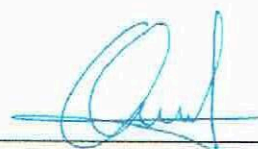
Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Director principal



Dra. Mona Kassem
Director externo



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Co-Asesor



Dra. Yolanda Ortega Ortega
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico
Abril 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Construcción de un clon infeccioso de ToBRFV: amplificación del genoma y de la
ribozima

por:

AYLIN DE JESUS GUTIERREZ JUAREZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito
para obtener el título:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

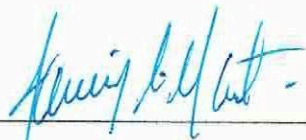
Aprobada por:



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Director principal



Dra. Mona Kassem
Director externo



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Co-Asesor



Dra. Yolanda Ortega Ortega
Co-Asesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico
Abril 2025

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El contenido de esta tesis es de exclusiva autoría y está protegido conforme a la legislación vigente en materia de derechos de autor. El autor principal asume la total responsabilidad sobre su autenticidad y declara, bajo protesta de decir verdad, que este trabajo es original y no incurre en plagio ni en ninguna otra conducta académica deshonesta.

Se ha evitado la reproducción de fragmentos o textos sin la debida citación de la fuente original. Asimismo, no se ha reutilizado material propio previamente publicado sin la referencia correspondiente. Tampoco se han adquirido, tomado prestados o manipulado datos ajenos con la intención de presentarlos como propios.

Todas las referencias bibliográficas han sido correctamente citadas y atribuidas a sus respectivos autores. No se han omitido citas ni se han utilizado ideas o razonamientos de otros sin el debido reconocimiento. Del mismo modo, cualquier material digital empleado, como imágenes, gráficos, videos o mapas, ha sido incluido con la autorización o citación correspondiente.

Soy consciente de que cualquier uso indebido de este material, como su reproducción, distribución, edición o modificación sin permiso, puede derivar en consecuencias legales. Por ello, asumo la plena responsabilidad de este trabajo y afirmo que no ha sido presentado anteriormente en ninguna institución educativa, medio de comunicación o entidad pública o privada.



Aylin de Jesús Gutiérrez Juárez
Autor principal

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi más sincero agradecimiento por haber sido el espacio donde adquirí las bases para mi formación profesional y personal. Su compromiso con la educación me permitió desarrollar habilidades y conocimientos que llevé conmigo a lo largo de mi carrera.

A mi asesor, el Dr. Marco Adán Juárez Verdayes, por su constante apoyo, dedicación y paciencia. Su guía fue fundamental en mi crecimiento académico, brindándome siempre orientación y motivación para mejorar y superar cada reto.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por abrirme sus puertas y facilitarme los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo. Gracias a sus laboratorios y espacios, pude desarrollar habilidades esenciales para mi formación.

A mis asesoras, la Dra. Mona Kassem y la Dra. Yolanda Ortega Ortega, por su valiosa orientación, el tiempo dedicado a la revisión, su enseñanza y sus consejos. Su compromiso y experiencia fueron fundamentales en la realización de esta tesis, y siempre estaré agradecida por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros, quienes hicieron de esta etapa una experiencia enriquecedora y memorable. Aprecio cada momento compartido, las enseñanzas mutuas y el apoyo incondicional. En especial, agradezco a Iván Aguilar, Aide Ramírez, César Morales, Karen Martínez, Vicente García, Sharlett Ramírez, Diego Guevara y Lilian Jiménez, por su amistad y compañerismo.

A Jesús Pinto, por estar a mi lado en todo momento. Gracias por tu compañía, comprensión y apoyo constante. Tu presencia ha sido un verdadero regalo, y me siento muy afortunada de haber compartido esta etapa de mi vida contigo.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres y a mis hermanos, quienes no solo están a mi lado en los momentos de alegría, sino que también han sido mi apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A mi madre, quien se desveló en más de una ocasión para acompañarme mientras realizaba mis tareas, para que nunca estuviera sola en esos momentos de esfuerzo. Su dedicación y amor han sido fundamentales en mi camino. A ella, a quien tanto amo y admiro, le dedico cada uno de mis logros.

A mi padre, por haberme brindado cuidado, sus valiosos consejos y su afecto incondicional. Gracias a ti comprendí la importancia del esfuerzo y la responsabilidad, y cómo, a través del trabajo constante, es posible forjar oportunidades y alcanzar un futuro prometedor.

A Alber Gutierrez, hermano mayor, a ti te debo el haberme enseñado la importancia de prepararme y seguir aprendiendo. Fuiste quien primero me mostró la relevancia de la educación y el compromiso personal. Gracias por estar siempre presente y por impulsar mis sueños.

A Aldo Gutierrez, dedico también esta tesis a ti, por ser ese hermano que me ha orientado y respaldado en cada paso. De ti aprendí el valor de la lealtad y del esfuerzo continuo. Es un privilegio contar contigo en mi vida.

A Ray Gutierrez, hermano, gracias por ser compañía en todo momento, por compartir conmigo no solo alegrías, sino también desafíos. Este logro también es tuyo, por estar presente en cada paso.

A Adolfo Juarez, quien a lo largo de los años ha sido parte importante de mi vida. Aunque en ocasiones no estemos cerca, has estado pendiente de mí, brindándome tu apoyo cuando más lo necesito. Compartimos momentos de aprendizaje, desafíos y muchas risas, y me siento orgullosa de contar contigo.

A Yair Juarez, te dedico esto porque eres una de las alegrías más grandes en mi vida. Gracias por tu cariño, por acompañarme siempre con una sonrisa y por ser ese apoyo incondicional en cualquier situación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIA.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
TABLA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Justificación.....	18
1.2. Hipótesis.....	19
1.3. Objetivo general.....	19
1.3.1. Objetivos específicos.....	19
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
2.1. Virus de plantas.....	20
2.2. El género Tobamovirus.....	20
2.3. El virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV).....	21
2.3.1. Descubrimiento y distribución.....	21
2.3.2. Estructura y composición molecular.....	21
2.3.3. Transmisión.....	22
2.3.4. Sintomatología.....	22
2.3.5. Métodos de detección.....	22
2.4. Clon infectivo.....	23
2.4.1. Elementos para la construcción de clones infecciosos.....	23
2.4.1.1. Vector binario.....	23
2.4.1.2. El promotor 35S CaMV.....	24
2.4.1.3. Terminación de la transcripción.....	25
2.4.1.4. Ribozima.....	25
2.4.1.5. Las regiones LB/RB.....	26
2.4.1.6. Gen de resistencia a antibióticos.....	26
2.5. Desafíos en la construcción de clones infecciosos.....	26
2.6. Clones infecciosos estudiados.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Aislados virales e identificación por RT-PCR.....	29
3.2. Material vegetal.....	30
3.2.1. Desinfección de semillas.....	30
3.2.2. Germinación de semillas.....	30
3.2.3. Mantenimiento de plántulas.....	30
3.3. Extracción del material genético.....	31

3.4. Amplificación de Ribozima.....	31
3.5. Amplificación del genoma total de ToBRFV.....	33
3.6. Preparación del inóculo viral e Inoculación.....	33
3.7. Evaluación de síntomas.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Extracción de ARN total e identificación del virus.....	36
4.2. Construcción del fragmento ribozima-NosT.....	38
4.3. Amplificación del genoma completo de ToBRFV.....	39
4.4. Comparación de virulencia de aislados de ToBRFV y análisis moleculares. 40	
4.4.1. Ensayo de inoculación de N. benthamiana.....	40
4.4.2. Ensayo de inoculación de tomate comercial.....	42
4.4.3. Ensayo de inoculación de tomate silvestre.....	46
5. DISCUSIÓN.....	49
6. CONCLUSIÓN.....	51
7. BIBLIOGRAFÍAS.....	52
8. ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño y ensamblaje del fragmento [HDRz-NosT].	32
Figura 2. Extractos de ARN total en gel de agarosa al 1%.	36
Figura 3. Identificación del ToBRFV mediante RT-PCR.	37
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados en la construcción de la ribozima con el gen NosT 140.	38
Figura 5. Amplificación del genoma completo de ToBRFV mediante RT-PCR.	39
Figura 6. Comparación de la infección sistémica en plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con los diferentes aislados.	41
Figura 7. RT-PCR de muestras de <i>N. benthamiana</i> inoculadas con ToBRFV	42
Figura 8. Síntomas observados en plantas de tomate infectadas con el aislado de ToBRFV-Ja.	43
Figura 9. Comparación de la infección sistémica en plantas de tomate comercial inoculadas con los diferentes aislados.	44
Figura 10. RT-PCR de muestras de tomate comercial inoculadas con ToBRFV	45
Figura 11. Primeros síntomas del ToBRFV en tomate silvestre a los 15 dpi	46
Figura 12. Síntomas más evidentes del ToBRFV en tomate silvestre a los 28 dpi	47
Figura 13. RT-PCR de muestras de tomate silvestre inoculadas con ToBRFV	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para la construcción [HDRz-NosT].	58
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados.	58

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Descripción
ADN-T	Ácido desoxirribonucleico Transferido
ADN-Ti	Ácido desoxirribonucleico Transferido de <i>Rhizobium radiobacter</i>
ARNasa	Enzima que degrada RNA
ARNss+	RNA monocatenario de sentido positivo
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor (del inglés <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
cDNA	DNA complementario
CIQA	Centro de Investigación en Química Aplicada
Cola poli (A)	Secuencia de adeninas en el extremo 3' del RNA mensajero
CuMMV	Virus del Mosaico Suave del Pepino (del inglés <i>Cucumber Mild Mottle Virus</i>)
DAS-ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas en Sándwich de Doble Anticuerpo (del inglés Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
DBA-CIQA	Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Días post-inoculación
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
F1	Fragmento amplificado 1 (291 pb)

F2	Fragmento amplificado 2 (311 pb)
F3	Fragmento amplificado 3 (336 pb)
F4	Fragmento amplificado 4 (359 pb)
F5	Fragmento amplificado 1 (385 pb)
GC	Contenido de guanina y citosina en el DNA
HDRz	Ribozima del virus de la hepatitis delta (del inglés Hepa Delta Ribozyme)
HDV	Hepatitis Delta Virus
kDa	Kilodalton (unidad de masa molecular)
LB	Borde izquierdo del ADN-T (del inglés <i>Left Border</i>)
MCS	Sitio de Clonación Múltiple (del inglés <i>Multiple Cloning Site</i>)
mRNA	RNA mensajero
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> (planta modelo en estudios de virología vegetal)
Nos	Gen de la nopalina sintasa
NosT	Terminador de la nopalina sintasa
ORF1a	Proteína de Metiltransferasa y Helicasa de 126 kDa
ORF2b	Proteína de Metiltransferasa, Helicasa y Replicasa de 183 kDa
ORFs	Marcos de lectura abiertos (del inglés Open Reading Frame)
PC	Proteína de la Cápsida (del inglés capsid protein)
PM	Proteína de movimiento (del inglés protein Movement)

PMMoV	Virus del Mosaico Suave del Pimiento (del inglés <i>Pepper Mild Mottle Virus</i>)
R. radiobacter	<i>Rhizobium radiobacter</i> (antes <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
RB	<i>Right Border</i> (borde derecho del ADN-T)
RdRP	RNA polimerasa dependiente de RNA (del inglés RNA-dependent RNA polymerase)
RT	Reacción de transcripción inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
T0	Tratamiento como control negativo
T1	Tratamiento 1 inoculación con un aislado del virus ToBRFV
T2	Tratamiento 2 inoculación con un aislado del virus ToBRFV
T3	Tratamiento 3 inoculación con un aislado del virus ToBRFV
Ti	Plásmido de <i>Rhizobium radiobacter</i> involucrado en la transferencia de ADN (del inglés Tumor-Inducing)
TMGMV	Virus del Mosaico Verde Suave del Tabaco (del inglés <i>Tobacco Mild Green Mosaic Virus</i>)
TMV	Virus del Mosaico del Tabaco (del inglés <i>Tobacco Mosaic Virus</i>)
ToBRFV	Virus del Fruto Rugoso Marrón del Tomate (del inglés <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus</i>)
ToBRFV-Hgo	Aislado del Virus del Fruto Rugoso del Tomate en Hidalgo, México
ToBRFV-Ja	Aislado del Virus del Fruto Rugoso del Tomate en Jalisco, México

ToBRFV-Mrc	Aislado del Virus del Fruto Rugoso del Tomate del mercado, México
------------	---

ToBRFV-Pue	Aislado del Virus del Fruto Rugoso del Tomate en Puebla, México
ToMMV	Virus del Mosaico Moteado del Tomate (del inglés <i>Tomato Mottle Mosaic Virus</i>)
ToMMV-LN	Variante del ToMMV aislada de Liaoning, China
ToMV	Virus del Mosaico del Tomate (del inglés <i>Tomato Mosaic Virus</i>)
USA	Estados Unidos de América
VIGS	Silenciamiento Génico Inducido por Virus (del inglés <i>Virus-Induced Gene Silencing</i>)
Vir	Región del plásmido Ti responsable de la transferencia de ADN

RESUMEN

El virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV) es un virus emergente que afecta gravemente los cultivos de tomate y pimiento, ocasionando pérdidas económicas a nivel mundial. Debido a su rápida propagación y persistencia, es necesario desarrollar herramientas moleculares para estudiar su biología y patogenicidad. Los clones infecciosos son una estrategia fundamental en virología, ya que permiten analizar el comportamiento del virus en condiciones controladas. En esta tesis se tuvo como objetivo amplificar el genoma completo de ToBRFV y obtener la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) con el terminador de la sintasa de nopalina (NosT), con el fin de construir un clon infeccioso en un futuro. El genoma de cuatro aislados virales, obtenidos en diferentes regiones de México, fue amplificado mediante RT-PCR, logrando obtener un amplicón completo de 6.4 kb para cada uno. Adicionalmente, el fragmento ribozima-NosT fue construido mediante PCR de solapamiento. Tres de los cuatro aislados estudiados, fueron inoculados en *Nicotiana benthamiana* y en plantas de tomate comercial por el fin de determinar su grado de virulencia. Los resultados mostraron que el aislado ToBRFV procedente de Jalisco presentó la mayor virulencia, seguido de ToBRFV procedente de mercado local con efectos moderados, mientras que ToBRFV procedente de Hidalgo no mostró síntomas. La detección del virus se confirmó mediante RT-PCR. Estos resultados demuestran que existe una variabilidad de virulencia en la población de ToBRFV en México, y proporcionan elementos para el desarrollo de un clon infeccioso, que permitirá estudiar el ToBRFV y contribuir al diseño de estrategias para su control.

Palabras clave: ToBRFV, clon infeccioso, NosT, PCR, RT-PCR, *Nicotiana benthamiana*, tomate, ribozima.

ABSTRACT

The tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is an emerging virus that severely affects tomato and pepper crops, causing significant economic losses worldwide. Due to its rapid spread and persistence, it is essential to develop molecular tools to study its biology and pathogenicity. Infectious clones are a fundamental strategy in virology, as they allow the analysis of viral behavior under controlled conditions. The objective of this thesis was to amplify the complete genome of ToBRFV and obtain the ribozyme sequence of the hepatitis delta virus (HDV) along with the nopaline synthase terminator (NosT), with the aim of constructing an infectious clone in the future. The genome of four viral isolates, collected from different regions of Mexico, was amplified by RT-PCR, successfully obtaining a complete 6.4 kb amplicon for each. Additionally, the ribozyme-NosT fragment was constructed through overlap PCR. Three of the four isolates studied were inoculated in *Nicotiana benthamiana* and commercial tomato plants to determine their degree of virulence. The results showed that the ToBRFV isolate from Jalisco exhibited the highest virulence, followed by the ToBRFV isolate from a local market with moderate effects, while the ToBRFV isolate from Hidalgo showed no symptoms. Virus detection was confirmed by RT-PCR. These findings demonstrate the existence of virulence variability within the ToBRFV population in Mexico and provide essential elements for the development of an infectious clone, which will enable further study of ToBRFV and contribute to the design of control strategies.

Keywords: ToBRFV, infectious clone, NosT, PCR, RT-PCR, *Nicotiana benthamiana*, tomato, ribozyme.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV de sus siglas en inglés “Tomato Brown Rugose Fruit Virus”) es un virus emergente que afecta cultivos de tomate y pimiento, causando graves pérdidas económicas a nivel mundial (Cambrón Crisantos *et al.*, 2019). El ToBRFV pertenece al género de los tobamovirus que se transmiten fácilmente de forma mecánica y a través de semillas (partículas infecciosas en la testa) que infectan los brotes cuando germinan. El virus puede permanecer en los residuos vegetales y en los suelos contaminados con el virus durante varios meses, y en las semillas infectadas durante varios años (Dombrovsky & Smith, 2017). Su rápida propagación y persistencia han generado la necesidad de desarrollar herramientas moleculares para su estudio en condiciones controladas.

Los virus representan patógenos que alteran las funciones fisiológicas de las plantas, interfiriendo con su funcionamiento normal y, generalmente, reduciendo los rendimientos. En casos más graves, estos patógenos pueden llegar a causar la muerte de las plantas afectadas. Debido a su tamaño, los virus requieren el uso de técnicas especializadas para su detección. Para el diagnóstico de infecciones virales en plantas, se emplean métodos como ELISA, las pruebas de inoculación y la PCR. Sin embargo, ELISA y la inoculación no se consideran de alta sensibilidad en comparación con la PCR. Mientras que la PCR permite detectar concentraciones mínimas de material genético viral con gran precisión, ELISA depende de la concentración del virus y la calidad del anticuerpo utilizado. Por su parte, la inoculación en plantas indicadoras se basa en la manifestación de síntomas, lo que puede variar según diversos factores (Vásquez Gutiérrez *et al.*, 2025).

Para entender el comportamiento del virus en la célula y estudiar procesos moleculares como la replicación y las interacciones virus-hospedador, se desarrollan los clones infecciosos como herramienta de estudio (Teodoro Junqueira *et al.*, 2014). Estos clones se construyen clonando el genoma viral de longitud completa en un vector de expresión bajo el control de un promotor fuerte y estable como el promotor 35S CaMV. Sin embargo, la clonación exige varios pasos: elegir el vector

binario adecuado, añadir los elementos necesarios, construir cDNAs de genomas de RNA virales, entre otros (Tu *et al.*, 2021).

A pesar de que se ha logrado obtener cDNA de longitud completa, Boyer & Haenni, (1994) destacaron que varios factores pueden influir en la infectividad de los transcritos de RNA, como la presencia de mutaciones en las regiones no traducidas (UTRs) tanto 5' como 3'. Para garantizar el éxito de la clonación y la infectividad del transcrito, es necesario realizar ciertos ajustes técnicos. Primero, se debe eliminar cualquier nucleótido entre el inicio de la transcripción y el extremo 5' del genoma viral. En segundo lugar, es fundamental añadir una estructura ribozímica en el extremo 3', antisentido del terminador, especialmente en el caso de virus que no poseen una cola poli(A) (Teodoro Junqueira *et al.*, 2014). En este marco, uno de los terminadores empleados en diversos sistemas de clonación viral es el terminador Nos, que ha mostrado ser eficiente en la estabilización del RNA y en la mejora de la expresión genética (Ma *et al.*, 2021).

Por ello, esta tesis tuvo como objetivo amplificar el genoma completo de ToBRFV y obtener la secuencia de ribozima de hepatitis delta (HDV) junto con el terminador de nopalina sintasa (NosT), para generar en el futuro un clon infectivo del virus. El genoma viral será integrado en un vector binario compatible con *Escherichia coli* y *Rhizobium radiobacter*, lo que facilitará la infección experimental de plantas.

De otro lado, para elegir el adecuado aislado del virus, se estudió la virulencia de cuatro aislados de ToBRFV mediante inoculación mecánica en *Nicotiana benthamiana* y en tomate comercial. La evaluación de la virulencia en estas plantas permitirá establecer correlaciones entre las características genéticas de los aislados y su capacidad para infectar y causar daño en los cultivos de interés, lo que contribuirá al desarrollo de estrategias de manejo y control.

1.1. Justificación

En esta tesis se pretendió amplificar el genoma total de aislados de ToBRFV y obtener la secuencia de ribozima (HDV). La obtención del genoma viral completo facilitara su clonación en un vector binario (plásmido con origen de replicación en *E. coli* y *R. radiobacter*) lo que permitirá la obtención de un clon infectivo del virus con

todos los elementos necesarios para su integración en la planta. Este clon se considera una herramienta necesaria para caracterizar el comportamiento biológico del virus in vivo y entender las relaciones planta-virus y virus-vector. La ribozima, es una secuencia que tiene propiedad autocatalítica, se usa para facilitar el procesamiento preciso del RNA en genomas virales, y ofrece varias ventajas en la biotecnología vegetal y la investigación agrícola, como no está disponible en nuestros laboratorios se trabajó a construirla en esta tesis.

1.2. Hipótesis

La amplificación del genoma completo de ToBRFV y la construcción de la ribozima con el terminador Nos (HDRz-NosT) permitirá el desarrollo de un clon infectivo funcional. Este clon podrá utilizarse para estudios de interacción virus-hospedador y en el diseño de estrategias de manejo y control del ToBRFV.

1.3. Objetivo general

Establecer los primeros pasos de la construcción de un clon infectivo del ToBRFV. Esto consiste en amplificar y construir dos principales elementos: el genoma completo del virus y la ribozima (hepatitis delta virus (HDV) ribozyme (HDRz)).

1.3.1. Objetivos específicos

- 1.3.1.1. Construir y amplificar la ribozima con el terminador Nos (HDRz-NosT).
- 1.3.1.2. Amplificar el genoma completo de ToBRFV de 6.4 kb en un solo paso de PCR.
- 1.3.1.3. Analizar la virulencia de aislados de ToBRFV en *Nicotiana benthamiana* y tomate comercial

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Virus de plantas

Las enfermedades virales en las plantas, también llamadas "cáncer de las plantas", ocupan el segundo lugar de importancia solamente después de las enfermedades fúngicas y han provocado pérdidas significativas en la agricultura (Zhao *et al.*, 2017). Los virus afectan cultivos de hortalizas y de campo en distintas regiones del mundo, disminuyendo su producción (Hammond, 2027). La palabra "virus" proviene del latín *virus*, que significa toxina o veneno, y se refiere a un agente infeccioso compuesto de material genético (DNA o RNA) que necesita una célula hospedera para multiplicarse. Su estructura puede incluir una cápside proteica, y en algunos casos, también una envoltura lipídica tomada de la membrana de la célula infectada. Para sobrevivir y propagarse, un virus debe replicarse dentro de la célula, transmitirse a nuevos hospederos por vectores y evadir sus defensas (Alarcón & Ojeda Flores, 2018).

2.2. El género *Tobamovirus*

Los tobamovirus pertenecen a un género de virus de RNA monocatenario de sentido positivo con viriones de forma tubular, pertenecientes a la familia *Virgaviridae* (Adams *et al.*, 2009). Los miembros de este género se transmiten de manera altamente eficiente a través del contacto mecánico, ya sea por manipulación de plantas infectadas, herramientas contaminadas o semillas infectadas. Esta alta estabilidad en el ambiente y su capacidad de persistencia en superficies inertes los convierten en un reto significativo para el control fitosanitario. A nivel genómico, los tobamovirus presentan una gran estabilidad evolutiva, aunque han surgido nuevas especies, como el ToBRFV, que han logrado superar resistencias genéticas. Actualmente, el género *Tobamovirus* incluye 37 especies de relevancia mundial, muchas de las cuales afectan cultivos de solanáceas, causando síntomas característicos y requiriendo métodos serológicos específicos para su identificación (Vásquez Gutiérrez *et al.*, 2025; Adams *et al.*, 2009).

Entre los tobamovirus más relevantes se encuentran el virus del mosaico del tabaco (TMV, especie *Tobamovirus tabaci*), el virus del mosaico del tomate (ToMV, especie *Tobamovirus tomatotessellati*), el virus del mosaico verde leve del tabaco (TMGMV, especie *Tobamovirus mititessellati*), el virus del moteado leve del pimiento (PMMoV,

especie *Tobamovirus capsici*), el virus del mosaico moteado del tomate (ToMMV, especie *Tobamovirus maculatusellati*) y el virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV, especie *Tobamovirus fructirugosum*) (Salem *et al.*, 2016; Dombrovsky & Smith, 2017). El virus del mosaico del tabaco (TMV), perteneciente a este género, fue el primer virus descubierto en 1886 (Shen *et al.*, 2013), marcando un hito en la virología y estableciendo las bases para el estudio de otros virus vegetales.

2.3. El virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV)

2.3.1. Descubrimiento y distribución

El ToBRFV es una especie recientemente descrita del género *Tobamovirus* que ha emergido como una amenaza significativa para los cultivos de tomate, afectando tanto a aquellos en campo abierto como en invernaderos en diversas partes del mundo. Este virus ha sido reportado en países como Jordania (Salem *et al.*, 2016), Estados Unidos (Chitambar, 2018), México (Cambrón Crisantos *et al.*, 2019), Alemania (Menzel *et al.*, 2019), Italia (Panno *et al.*, 2019), Palestina (Alkowni *et al.*, 2019), Turquía (Fidan *et al.*, 2019) y China (Yan *et al.*, 2019). Además, se han registrado casos probables en Chile, Etiopía, Sudán y los Países Bajos, aunque estos aún no han sido confirmados. El primer brote de ToBRFV fue documentado en 2015 en un cultivo de tomate de invernadero en Jordania (Salem *et al.*, 2016), lo que marcó el inicio del seguimiento y estudio más detallado de este virus emergente. Su rápida propagación y su impacto en la producción de tomate subrayan la necesidad urgente de medidas de control y monitoreo para mitigar sus efectos (Oladokun *et al.*, 2019).

2.3.2. Estructura y composición molecular

Se caracteriza por poseer partículas en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 nm de largo y 18 nm de diámetro. Su genoma está compuesto por RNA monocatenario de sentido positivo (ARNss+) de aproximadamente 6.4 kb y contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4) (Luria *et al.*, 2017). Estos codifican dos complejos proteicos involucrados en la replicación: una proteína de 126 kDa (ORF1a) y otra de 183 kDa (ORF1b), además de la proteína de movimiento (PM) de 30 kDa (ORF2) y la proteína de cubierta (PC) de 17.5 kDa (ORF3). La proteína de 126 kDa actúa como silenciador del RNA, mientras que la PM facilita la translocación del virus entre células. Por su parte, la PC juega un

papel clave en el ensamblaje de las partículas virales y en su propagación a larga distancia dentro de la planta hospedera, lo que la convierte en un objetivo principal para estrategias de control (Vásquez Gutiérrez *et al.*, 2025).

2.3.3. Transmisión

Es un patógeno altamente contagioso que se transmite eficientemente por inoculación mecánica, semillas contaminadas y contacto entre plantas. Su capacidad para persistir le permite sobrevivir durante años en restos vegetales en el suelo y permanecer activo por semanas o meses en estructuras de invernadero, macetas y herramientas hortícolas. Además, su persistencia en superficies como la ropa y, especialmente, en las manos de los trabajadores representa un riesgo significativo para la diseminación del virus (Nolasco García *et al.*, 2020).

2.3.4. Sintomatología

El desarrollo de los síntomas puede variar según el cultivo y las condiciones ambientales, los síntomas en sus hospedantes suelen ser, afectando hojas, tallos, flores y frutos. En las hojas, se observa un mosaico sintomático caracterizado por un patrón irregular de clorosis y moteado, acompañado de estrechamiento y deformaciones foliares. En los frutos, pueden aparecer manchas amarillas, irregularidades en la maduración y rugosidad en la piel. Además, puede generar necrosis en péndulos, cálices y pecíolos, lo que compromete la retención del fruto y facilita su abscisión prematura (Eichmeier *et al.*, 2023).

2.3.5. Métodos de detección

Los métodos serológicos utilizados para la detección incluyen DAS-ELISA, Western blot e inmunofluorescencia *in situ*. Sin embargo, los primeros ensayos con anticuerpos policlonales mostraron reactividad cruzada con otros tobamovirus debido a la similitud en la proteína de cubierta (PC). Estudios recientes han desarrollado anticuerpos monoclonales con alta especificidad para ToBRFV, evitando reacciones cruzadas. Además, técnicas avanzadas como la inmunofluorescencia con fluoróforos específicos han permitido la detección directa del virus en tejidos infectados, facilitando su diferenciación de otros tobamovirus (Vásquez Gutiérrez *et al.*, 2025).

Por otro lado, la RT-PCR se ha consolidado como una herramienta para la detección específica de ToBRFV mediante oligonucleótidos dirigidos a la región específica del genoma, lo que permite una identificación precisa del virus en muestras sintomáticas (Nolasco García *et al.*, 2020). Métodos complementarios, como la tinción de tejidos y la hibridación *in situ* por fluorescencia, han mejorado la caracterización del virus y su impacto en el hospedante (Velásquez Valle *et al.*, 2017).

2.4. Clon infectivo

Los clones infecciosos de virus RNA de plantas son herramientas esenciales en virología molecular, ya que permiten la manipulación y el estudio detallado de los genomas virales. La clonación permite la realización de estudios funcionales para determinar el papel de los genes virales en la patogénesis y su interacción con las células huésped y los vectores de transmisión. Hasta la fecha, se han descrito clones de DNA infeccioso o transcripciones infecciosas de diversos virus de plantas, consolidando su relevancia en el estudio de la biología de los virus y en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de enfermedades virales en plantas (Wieczorek *et al.*, 2015).

2.4.1. Elementos para la construcción de clones infecciosos

La construcción de clones infecciosos exige el clonaje del genoma completo de un virus en un vector de expresión que lleva todos los elementos necesarios para cumplir su actividad:

2.4.1.1. Vector binario

Rhizobium radiobacter es una bacteria del suelo con la capacidad de transferir parte de su DNA a células vegetales, lo que la convierte en un vector natural para la ingeniería genética en plantas. Esta capacidad está mediada por el plásmido Ti (*tumor-inducing*), que contiene dos regiones esenciales para la transferencia de DNA: las secuencias de borde del ADN-T y la región *Vir*. Sin embargo, el uso del plásmido Ti como vector presenta varias dificultades. En primer lugar, su baja cantidad de copias en *Rhizobium* complica la clonación de genes de interés. Además, el plásmido Ti carece de sitios de restricción únicos, lo que dificulta la inserción específica de secuencias foráneas. Otro problema es la presencia de

oncogenes (genes de biosíntesis de hormonas) en la región ADN-T, los cuales inducen un crecimiento celular desorganizado y reducen el potencial de regeneración de las células vegetales transformadas, afectando la estabilidad hereditaria del evento de transformación a lo largo de generaciones (Hoekema *et al.*, 1983; Primrose & Twyman, 2006; Lee & Gelvin, 2008).

Dado que la clonación de genes es mucho más eficiente en *E. coli*, se han desarrollado vectores específicos para facilitar la manipulación genética de plantas. Estos vectores se dividen en dos tipos principales: vectores cointegrados y vectores binarios. Los vectores binarios presentan varias ventajas sobre los cointegrados, ya que son más pequeños, lo que mejora su estabilidad en *E. coli*, y poseen una frecuencia de transferencia de *E. coli* a *R. radiobacter* hasta 10,000 veces mayor en comparación con los vectores cointegrados (Gruber & Crosby, 1993).

El término "vector binario" se debe a la separación funcional de los dos replicones esenciales dentro de la misma célula de *Rhizobium*: el ADN-T y la región *Vir*. En este sistema, las proteínas codificadas por los genes *Vir* pueden actuar en trans sobre el ADN-T, permitiendo su procesamiento y transferencia a la célula vegetal. Así, un vector binario está compuesto por dos plásmidos: uno que contiene secuencias desarmadas de ADN-T y otro que porta la región *Vir*.

Los vectores binarios están diseñados con características que los hacen herramientas eficientes para la transformación genética de plantas. Generalmente, incluyen secuencias de repetición del borde izquierdo y derecho necesarias para la transferencia, un gen marcador para la selección de transformantes, sitios de restricción para facilitar la clonación, un origen de replicación compatible con *E. coli* y *Rhizobium*, un promotor, un sitio de clonación múltiple (MCS) y un terminador. Estas características permiten una manipulación más sencilla y eficiente del DNA recombinante, facilitando su aplicación en la mejora genética de cultivos (Hoekema *et al.*, 1983; Primrose & Twyman, 2006; Lee & Gelvin, 2008).

2.4.1.2. El promotor 35S CaMV

El término promotor es la región del DNA que incluye el sitio de unión de la RNA polimerasa y los operadores (cajas TATA, elementos GC y secuencias que permiten

la interacción con factores de transcripción) que modulan la expresión génica. Estos promotores, con una longitud que varía entre 100 y 1000 pares de bases, se localizan en el extremo 5' de los genes diana y desempeñan un papel crucial en la regulación de la transcripción al controlar la unión de la RNA polimerasa y los factores de transcripción (Morgan, 2014). En biotecnología vegetal, el promotor 35S CaMV, derivado del virus del mosaico de la coliflor, se ha utilizado ampliamente para la transcripción en el núcleo de las células vegetales a través de la RNA polimerasa II celular (Renovell Ferrer, 2010). Los transcritos virales generados son posteriormente transportados al citoplasma, donde se traducen y se sintetiza la replicasa viral, la cual es la encargada de dirigir la replicación del genoma (Morgan, 2014).

2.4.1.3. Terminación de la transcripción

El término de transcripción es un proceso clave en la regulación de la expresión génica, ya que define el punto en el que la RNA polimerasa cesa la síntesis de RNA mensajero (mRNA). En virus y organismos genéticamente modificados, este mecanismo influye en la estabilidad y funcionalidad de los transcritos, afectando la eficiencia de la replicación y la expresión de genes de interés (Porrua & Libri, 2015). El terminador más utilizado en plantas es el NosT, por su eficiencia y compatibilidad en diversas especies. Otro terminador común es el 35S CaMV.

2.4.1.4. Ribozima

Las ribozimas son secuencias de RNA con actividad catalítica que tienen funciones en la biología de ciertos virus, particularmente aquellos con genomas de RNA. En la replicación viral estas moléculas facilitan la escisión autocatalítica de RNA, regulando la maduración de los intermediarios replicativos y la expresión génica (Ferré D'Amaré & Scott, 2010). Este mecanismo ha sido identificado en distintos virus de RNA, incluidos los viroides, algunos virus satélites y ciertos retrovirus, donde contribuye a la generación de fragmentos funcionales de RNA esenciales para la infección y la propagación viral (Canny *et al.*, 2004). Un ejemplo documentado es la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) (Perrotta & Been, 1991)..

2.4.1.5. Las regiones LB/RB

Las regiones LB (Left Border) y RB (Right Border), características de los sistemas basados en *Rhizobium radiobacter*, delimitan la región de DNA transferida al genoma huésped, siendo esenciales para la integración eficiente de genes foráneos (Gelvin, 2017).

2.4.1.6. Gen de resistencia a antibióticos

Un elemento común en estos sistemas es la inclusión de un gen de resistencia a antibióticos, el cual permite la selección de células transformadas mediante el uso de antibióticos como kanamicina o ampicilina, asegurando la permanencia del DNA insertado en el huésped (Davies & Davies, 2010).

2.5. Desafíos en la construcción de clones infecciosos

La construcción de clones de cDNA que contengan el genoma completo del virus para transformar e infectar células eucariotas es un proceso complejo y se encuentra influenciado por diversos factores técnicos. Aunque tradicionalmente se considera que la integridad del genoma viral es esencial para la infectividad, se ha documentado la posibilidad de generar transcripciones infecciosas a partir de clones incompletos (Boyer & Haenni, 1994). Sin embargo, la presencia de secuencias no virales, especialmente en el extremo 5', puede reducir significativamente la eficiencia de la transcripción in vitro. Además, los vectores comerciales disponibles incluyen secuencias adicionales derivadas del vector, lo que puede afectar la estabilidad y funcionalidad del genoma viral. Asimismo, los plásmidos resultantes, que pueden superar los 10 kb debido a la inserción de genomas virales de RNA de cadena sencilla de más de 6 kb, tienden a ser inestables en la bacteria huésped, lo que puede llevar a la eliminación de regiones esenciales del genoma. En consecuencia, la clonación de estos plásmidos a menudo requiere estrategias de subclonación y un manejo minucioso para garantizar la estabilidad y funcionalidad de los clones obtenidos (Teodoro Junqueira *et al.*, 2014).

Los clones infecciosos se utilizan como vectores en el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), una herramienta para el estudio de las interacciones virus-hospedador, sin embargo presenta diversos desafíos, como la variabilidad en la eficiencia del silenciamiento, la estabilidad de los vectores virales y la

especificidad en la regulación de genes, lo que requiere optimización continua para mejorar su aplicación.

2.6. Clones infecciosos estudiados

Los clones infecciosos han permitido obtener estudios sobre la investigación virológica, permitiendo saber sobre la replicación viral, la interacción con hospedadores y el desarrollo de estrategias de control. A continuación, se presentan trabajos que abordan diferentes aspectos relacionados con estos clones.

En el estudio “Molecular characterization and pathogenicity of an infectious cDNA clone of tomato brown rugose fruit virus” realizado por Ma *et al.* (2021), se caracterizó molecularmente el ToBRFV y se construyó un clon infeccioso de cDNA de longitud completa. El propósito del estudio fue analizar la secuencia genómica del ToBRFV y evaluar su infectividad en diferentes especies de plantas mediante agroinoculación. Se utilizó la técnica de RT-PCR para detectar la presencia del virus en plantas de tomate con síntomas virales en la provincia de Yunnan, China. Además, se construyó un clon infeccioso a partir de la secuenciación completa del genoma del virus y se evaluó su patogenicidad en tomate (*Solanum lycopersicum*), *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* cv. *Samsun nn*. Los resultados mostraron que el clon infeccioso fue capaz de inducir una infección sistémica con síntomas característicos del virus en estas plantas, además de generar partículas virales transmisibles por savia. Este estudio representa el primer informe sobre la construcción de un clon infeccioso biológicamente activo de ToBRFV y proporciona una herramienta valiosa para futuros estudios sobre la función de las proteínas virales y la interacción planta-virus mediante enfoques de genética inversa.

Por lo tanto en el artículo “Synthesis and Characterization of a Full-Length Infectious cDNA Clone of Tomato Mottle Mosaic Virus” realizado por Tu *et al.* (2021), se llevó a cabo la síntesis y caracterización de un clon infeccioso de cDNA de longitud completa del *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), un virus emergente del género *Tobamovirus* que afecta cultivos de tomate y pimiento. El objetivo del estudio fue construir un clon infeccioso de ToMMV y evaluar su infectividad y patogenicidad en distintos hospedadores. Para ello, se aisló y clonó el genoma completo de un aislado chino del virus (ToMMV-LN) a partir de plantas de tomate infectadas

naturalmente en la provincia de Liaoning, China. Mediante una estrategia de recombinación homóloga, se insertó el genoma viral en un vector binario *pCB301-2×35S* y se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* para agroinfiltrar *Nicotiana benthamiana*, tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annuum*). Los resultados indicaron que el clon infeccioso (pToMMV) fue altamente patogénico, causando síntomas graves en *N. benthamiana* y tomate, mientras que en pimiento presentó una tasa de infección del 40-47% a las 4-5 semanas post-infiltración. Además, mediante microscopía electrónica se confirmó la formación de partículas virales rígidas en hojas infectadas, evidenciando la replicación del virus.

En este artículo "Molecular identification and development of an infectious cDNA clone of *Trichosanthes kirilowii*-infecting *Cucurbit mild mosaic virus*", realizado por Chen *et al.* (2023), se identificó molecularmente el *Cucurbit mild mosaic virus* (CuMMV) en *Trichosanthes kirilowii* y se desarrolló un clon infeccioso de cDNA de longitud completa. El propósito del estudio fue caracterizar genéticamente CuMMV, evaluar su infectividad en diferentes especies de cucurbitáceas y analizar su modo de transmisión. Para ello, se recolectaron muestras de hojas de *T. kirilowii* con síntomas de mosaico en la provincia de Anhui, China. Se extrajo RNA total de las plantas y se amplificó el genoma completo del virus mediante RT-PCR. Posteriormente, se construyó un clon infeccioso ensamblando los segmentos de RNA1 y RNA2 en un vector binario *pCB301*, seguido de agroinfiltración en *T. kirilowii*, pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Cucumis melo*), sandía (*Citrullus lanatus*) y calabacín (*Cucurbita pepo*). Los resultados demostraron que el clon infeccioso causó síntomas característicos del virus en todas las especies hospedadoras, con tasas de infección variables (100% en *T. kirilowii* y *C. sativus*, y entre 44-75% en las demás). Además, se confirmó que el virus derivado del clon infeccioso es transmisible mecánicamente. Eso fue el primer informe sobre la construcción de un clon infeccioso de CuMMV.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislados virales e identificación por RT-PCR

Los aislados virales de ToBRFV se obtuvieron de cuatro localidades a partir de hojas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) que presentaban síntomas característicos de infección por tobamovirus. En 2018, se recolectaron muestras de cultivos en Puebla, aunque sin datos precisos sobre su origen exacto. En marzo de 2019, se obtuvieron muestras de invernaderos de la empresa NatureSweet Tomatoes en Guadalajara, Jalisco. En agosto de 2023, se aislaron muestras de invernaderos del Sr. Víctor Cruz en Alfajayucan, Hidalgo. Además, en 2024, se incluyó una muestra de fruto adquirida en un mercado mexicano, de origen desconocido.

Una vez en el laboratorio, se seleccionó tejido deseado para la extracción de RNA total (apartado 3.3). Y se identificó la presencia viral mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR). Por ello se usaron los oligonucleótidos AGB-123/124 (Tabla 2), los cuales hibridan en la región CP del genoma viral y permiten la amplificación de un fragmento de 457 pb, entre los nucleótidos 5874-6272.

La reacción de PCR se llevó a cabo con la enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un termociclador Labnet Multigene™ MINI (modelo TC-020-24).

El protocolo de amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 68 °C durante 1 minuto. Finalmente, se llevó a cabo una extensión final a 68 °C durante 5 minutos.

Se verificó el producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se efectuó con el sistema Bio-Rad PowerPac Basic 300 (USA) y la visualización fue realizada con el fotodocumentador Gel-Doc EZ de Bio-Rad (USA).

3.2. Material vegetal

En este trabajo se analizaron plantas de tomate comercial (*Solanum lycopersicum* variedad Río Grande) originarias de Estados Unidos, tomate silvestre (*Solanum lycopersicum*) y *N. benthamiana*.

Todas las plantas se obtuvieron a partir de semillas. Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del Centro de Investigación en Química Aplicada (DBA-CIQA).

3.2.1. Desinfección de semillas

Para desinfectar las semillas, estas fueron sumergidas en etanol al 70% durante 3 minutos para eliminar microorganismos superficiales. Luego, se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 13 minutos para erradicar bacterias y hongos. Posteriormente, se enjuagaron de 3 a 5 veces con agua estéril para eliminar los residuos de los desinfectantes. Finalmente, se mantuvieron en agua estéril durante 24 horas para hidratarlas y facilitar la germinación.

3.2.2. Germinación de semillas

Las semillas de tomate comercial y silvestre, previamente desinfectadas, se germinaron en cajas Petri esteril. En su interior, se colocó papel filtro humedecido con 10 ml de agua desionizada estéril, donde las semillas fueron distribuidas uniformemente con pinzas esterilizadas, asegurando suficiente espacio entre ellas. Luego, las cajas se sellaron con parafilm y se trasladaron al cuarto de germinación a 25 °C en oscuridad.

Para la germinación de *N. benthamiana*, se utilizó una charola pequeña con tapa y sustrato humedecido. Las semillas se distribuyeron en líneas horizontales. Finalmente, la charola se tapó y se trasladó al fitotrón modelo Friocell FC-82V-M/FC-404, manteniendo una temperatura constante de 25 °C

3.2.3. Mantenimiento de plántulas

Las semillas germinadas fueron trasplantadas en macetas con sustrato peat-moss bien humedecido. Las macetas se colocaron en el fitotrón a 25 °C, con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, donde permanecieron bajo condiciones

controladas para su desarrollo. Todas las plantas fueron regadas con solución nutritiva Hoagland (Martins *et al.*, 2024).

3.3. Extracción del material genético

La extracción de RNA total se realizó a partir de tejido vegetal (hojas y frutos de tomate y hojas de *N. benthamiana*) utilizando el protocolo TRI Reagent® (Zymo Research, USA). Cada muestra fue molida en presencia de nitrógeno líquido y homogeneizada con el reactivo TRI Reagent (una solución monofásica que contiene fenol y tiocianato de guanidina, proporcionada por la empresa Ambion). Posteriormente, se añadió cloroformo para inducir la separación de fases y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. La fase acuosa superior, que contenía el ARN, se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo libre de ARNasa. La precipitación del RNA se llevó a cabo con isopropanol, seguida de una centrifugación a 14,000 rpm durante 15 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con etanol al 75%, seguido de una centrifugación a 7,500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el RNA precipitado se resuspendió en agua libre de ARNasa y su integridad se evaluó mediante electroforesis (Bio-Rad, PowerPac Basic 300; cámara Labnet, USA) en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. La visualización de las bandas se realizó con el fotodocumentador Gel-Doc EZ (Bio-Rad, USA).

3.4. Amplificación de Ribozima

Los oligonucleótidos usados en esta tesis fueron diseñados de forma solapante basando en la secuencia publicada del plásmido pCB301-2μ-HDV (Sun *et al.*, 2017), mientras que la secuencia del terminadora de la nopalina sintasa (Nos) de *R. radiobacter* (NosT) fue obtenida a partir del vector pTDT-DC-RNAi, donado por la MIBB. Carmen Quinto (Pacheco Sanchez, 2019).

La construcción del fragmento [HDRz-NosT] se realizó de forma progresiva, usando siempre el mismo oligo antisentido (NosT), complementario al extremo 3' de la secuencia NosT, y varios oligos en sentido solapantes (Figura 1). Como primer paso se amplificó la secuencia NosT a partir de pTDT-DC-RNAi usando el oligo NosT como oligo reverse y el oligo FHDVz1 (3'HDRz y 5'NosT) como oligo sentido, a

partir de este producto la extensión de ribozima se realizó en cuatro PCR sucesivos, usando 4 oligos solapantes: FHDVz2, FHDVz3, FHDVz4 y FHDVz5 (Tabla 1).

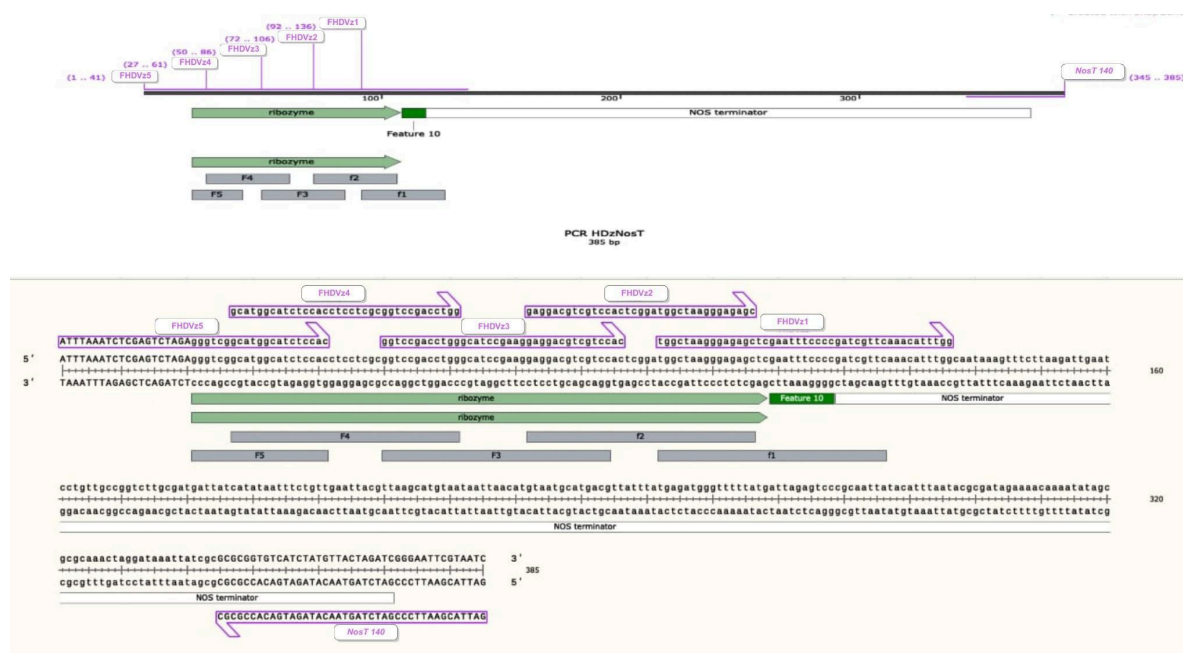


Figura 1. Diseño y ensamblaje del fragmento [HDRz-NosT]. Se muestra la secuencia de interés junto con las regiones clave y los oligonucleótidos utilizados en la construcción.

Los productos de PCR obtenidos para este motivo fueron sintetizados utilizando el kit GoTaq Green Master Mix de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un termociclador Labnet (modelo TC-020-24, Multigene™ MINI) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto. Se finalizó con una extensión a 72 °C por 5 minutos.

El resultado de las amplificaciones fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó con el sistema Bio-Rad PowerPac Basic 300 (USA) y la visualización se efectuó con el fotodocumentador Gel-Doc EZ de Bio-Rad (USA). Posteriormente, los productos obtenidos fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el sistema

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up de Promega, siguiendo el protocolo del fabricante.

3.5. Amplificación del genoma total de ToBRFV

Para amplificar el genoma total de ToBRFV, se diseñaron cebadores específicos utilizando como referencia el aislado de Jordania (número de acceso KT383474.1). Para obtener el cDNA de cadena sencilla a partir de extractos de RNA total se realizó la transcripción inversa (RT) con la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y un oligo complementario al extremo 3' del genoma (ABG-188). Posteriormente, se usó este cDNA como molde para la amplificación del genoma total mediante la PCR. Por ello, se usaron los oligonucleótidos AGB-255/256 (Tabla 2), los cuales permitieron obtener un fragmento de 6.4 Kb y se empleó la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase, High Fidelity (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. AGB-255/256 llevan en sus extremos 5' los sitios de restricción NotI, SphI y NotI, PstI, respectivamente.

Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Labnet Multigene™ MINI (modelo TC-020-24). El protocolo de amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 68 °C durante 10 minutos.

Se comprobó la amplificación del producto a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando bromuro de etidio para su tinción. La corrida electroforética fue realizada con el sistema Bio-Rad PowerPac Basic 300 (USA), y la observación de las bandas se llevó a cabo mediante el fotodocumentador Gel-Doc EZ de Bio-Rad (USA).

3.6. Preparación del inóculo viral e Inoculación

Para el ensayo de evaluación de síntomas se prepararon inóculos de 3 aislados de ToBRFV procedentes de Jalisco (ToBRFV-Ja), Hidalgo (ToBRFV-Hgo) y del mercado local (ToBRFV-Mrc), por ellos, se maceraron hojas infectadas con el virus en tampón fosfato de potasio 0.01 M (pH 7.0) utilizando un mortero frío, en una proporción de 500 mg de tejido por 2 mL de tampón, hasta obtener un extracto homogéneo.

Posteriormente, el inóculo se mantuvo en hielo hasta su aplicación para evitar su degradación y preservar la viabilidad del virus.

La inoculación del ToBRFV se llevó a cabo mediante el método mecánico, empleando carburo de silicio (SiC o carborundo) como abrasivo para facilitar la entrada del virus en las células epidérmicas. En la tercera o cuarta rama con hojas verdaderas de cada planta, se espolvoreó carborundo sobre la superficie foliar y, posteriormente, se aplicaron 10 µL del extracto viral con una micropipeta. La solución se distribuyó uniformemente sobre la hoja y se frotó suavemente con los dedos, utilizando guantes de nitrilo, para favorecer la infección sin causar daños excesivos al tejido.

Después de la inoculación, las hojas tratadas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de abrasivo y prevenir lesiones adicionales. Como control negativo, se incluyó un grupo de plantas que recibió únicamente tampón fosfato de potasio, sin extracto viral, siguiendo exactamente el mismo procedimiento.

3.7. Evaluación de síntomas

Las plantas inoculadas se mantuvieron en el fitotrón, bajo condiciones controladas. La evaluación de síntomas se realizó cada tres días durante el tiempo establecido para cada especie: en *N. benthamiana* de 16 días post-inoculación (dpi), en tomate comercial de 16 dpi, y en tomate silvestre de 28 dpi. Para confirmar la presencia del virus en las plantas inoculadas, se tomaron muestras foliares de hojas inoculadas y sistémicas y se analizaron mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos AGB-121/122 específicos a ToBRFV los cuales hibridan en la región CP del genoma viral y permiten la amplificación de un fragmento de 1030 pb, entre los nucleótidos 3688-4718 (Tabla 2).

En el experimento realizado en tomate comercial, se establecieron cuatro tratamientos. El primero (T0) consistió en seis plantas sin inoculación viral en el cual se empleó el tampón fosfato de potasio, utilizado como control. En el segundo tratamiento (T1), seis plantas fueron inoculadas con el aislado ToBRFV-Ja, mientras que el tercero (T2) se inocularon seis plantas con el aislado ToBRFV-Hgo.

Finalmente el cuarto tratamiento (T3), seis plantas fueron inoculadas con el aislado ToBRFV-Mrc.

Por otro lado, en *N. benthamiana*, el experimento incluyó tres tratamientos. El primero (T0) corresponde a seis plantas sin inoculación viral utilizando el tampón de fosfato de potasio como control, el segundo (T1) a seis plantas inoculadas con el aislado de ToBRFV-Ja, y el tercero (T2) a seis plantas inoculadas con el aislado ToBRFV-Hgo.

Para evaluar el comportamiento de los aislados virales en tomate silvestre, se germinaron 15 semillas; sin embargo, el porcentaje de germinación fue muy bajo y solo se obtuvieron tres plantas. De estas, una se utilizó como control, otra se inoculó con ToBRFV-Ja y la tercera con ToBRFV-Mrc. Debido al número limitado de plantas, los resultados obtenidos en este experimento fueron presentados, en la tesis, como preliminares.

4. RESULTADOS

4.1. Extracción de ARN total e identificación del virus

La extracción de ARN total se realizó a partir de muestras de tomate provenientes de Puebla, Jalisco, Hidalgo y otras adquiridas en el mercado.

La integridad de los extractos obtenidos se muestra en la Figura 2, donde se distinguen claramente las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal. La nitidez de estas bandas y la ausencia de degradación confirman la adecuada calidad del material extraído.

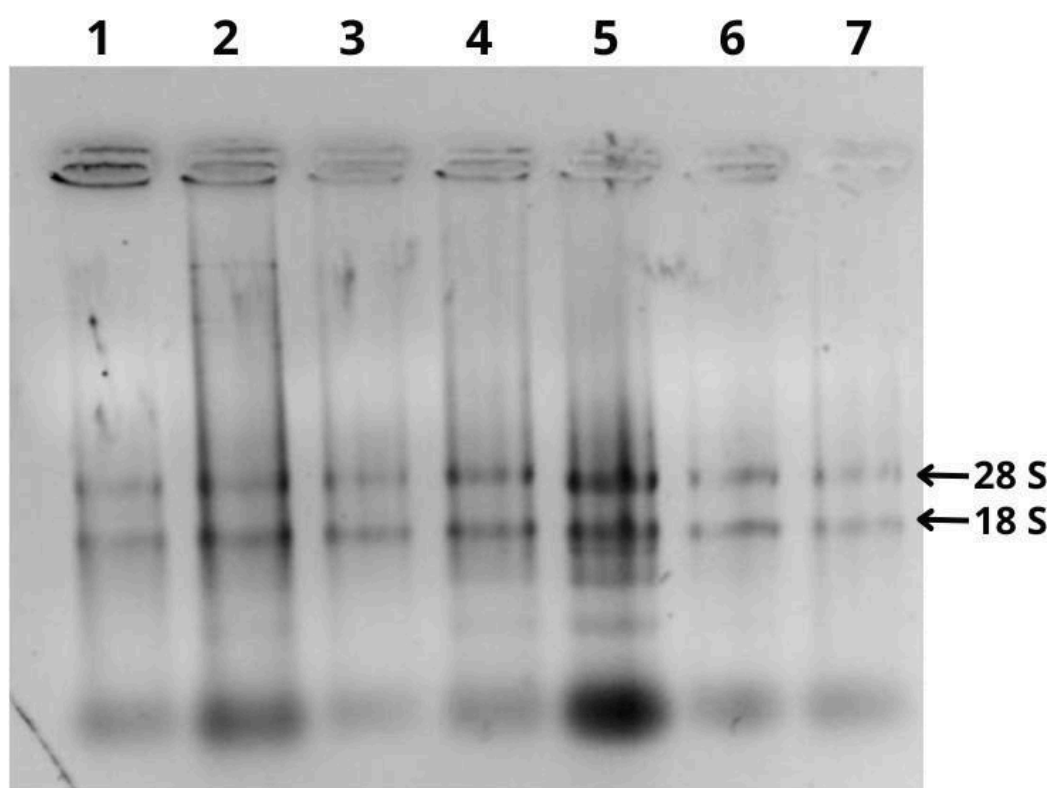


Figura 2. Extractos de ARN total en gel de agarosa al 1%. Los carriles 1 y 2 corresponden a muestras de tomate procedentes del estado de Puebla, los carriles 3 y 4 a muestras de tomate procedentes del estado de Jalisco, el carril 5 a una muestra de tomate procedentes del estado de Hidalgo, y los carriles 6 y 7 a muestras de tomate adquiridas en un mercado mexicano.

Todos los extractos obtenidos fueron analizados para la identificación del virus ToBRFV mediante RT-PCR. En todas las muestras evaluadas se amplificó un fragmento de cADN de 457 pb, correspondiente al tamaño esperado para la región específica del genoma viral. La presencia del producto fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observaron bandas bien definidas en los carriles correspondientes a las muestras analizadas (Figura 3).

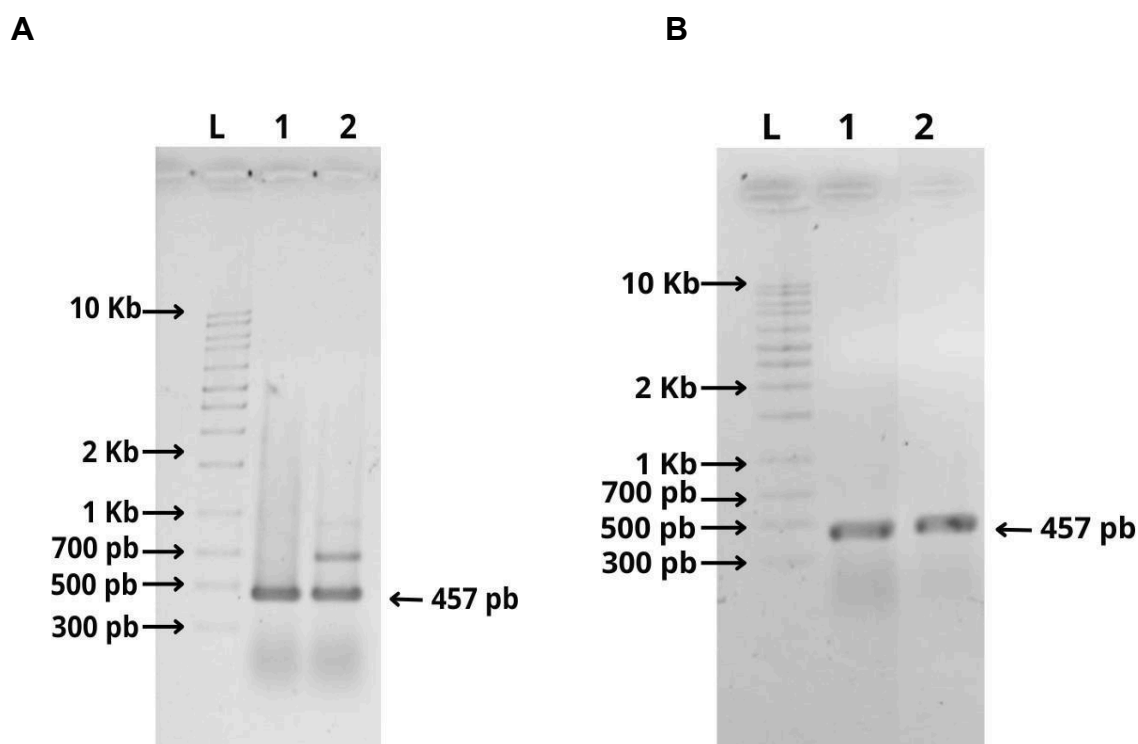


Figura 3. Identificación del ToBRFV mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación de un fragmento de 457 pb correspondiente a la región específica del genoma viral. A. Amplificación de muestras de Puebla y del mercado. El carril L correspondió al marcador de tamaño molecular de ADN (ADN Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen). En los carriles 1 y 2 se observaron productos de amplificación de 457 pb, correspondientes a las muestras de Puebla y del mercado, respectivamente. B. Amplificación de muestras de Jalisco e Hidalgo. El carril L mostró el marcador de tamaño molecular. Los carriles 1 y 2 presentaron productos específicos de 457 pb, correspondientes a las muestras de Jalisco e Hidalgo, respectivamente.

4.2. Construcción del fragmento ribozima-NosT

Como se mencionó antes la construcción del fragmento [ribozima-NosT] se realizó de forma progresiva, el gel de agarosa de la figura 4, demuestra las bandas obtenidas de cada etapa, evidenciando la extensión progresiva del tamaño del cADN. Se observaron: el Fragmento 1 (F1) de 291 pb, el Fragmento 2 (F2) de 311 pb, el Fragmento 3 (F3) de 336 pb, el Fragmento 4 (F4) de 359 pb y el Fragmento 5 (F5) de 385 pb, lo que confirmó la correcta incorporación secuencial de cada fragmento solapado. Por último el producto final (Fragmento 5) fue purificado para su posterior clonación.

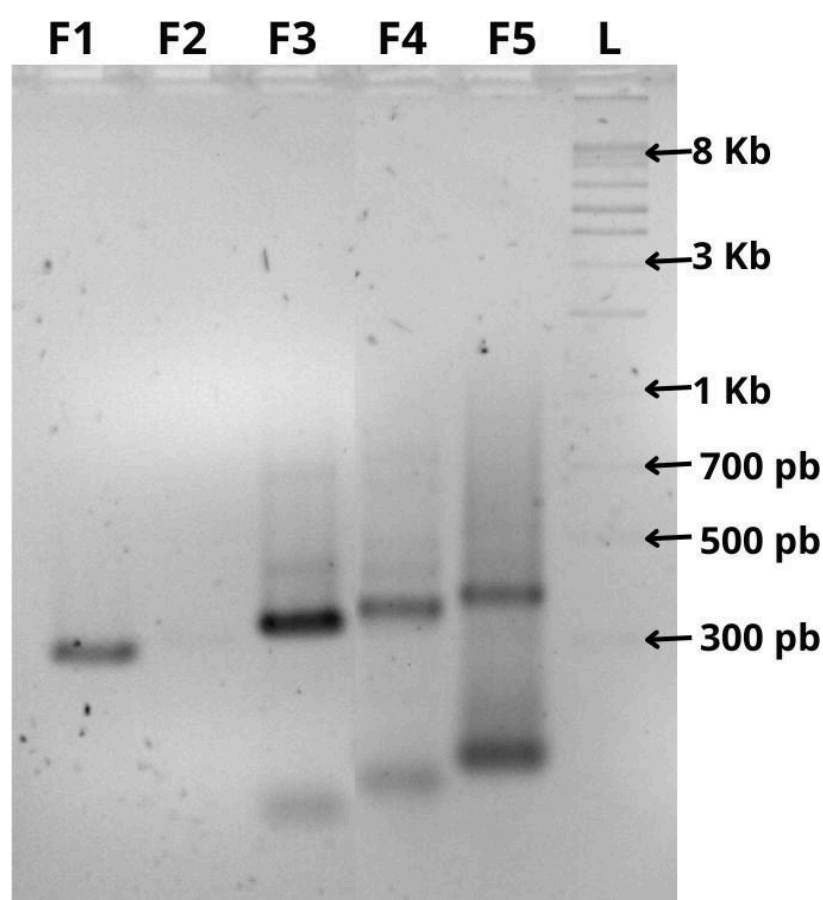


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados en la construcción de la ribozima con el gen ribozima-NosT. Se observa la amplificación progresiva de los fragmentos ensamblados. El carril L corresponde al marcador de peso molecular de ADN (ADN Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen), con sus respectivos tamaños indicados a la derecha.

4.3. Amplificación del genoma completo de ToBRFV

Se amplificó el genoma completo del ToBRFV a partir del ARN total extraído previamente (apartado 3.3 de Materiales y Métodos). Se obtuvo un fragmento de 6.4 kb, correspondiente al genoma completo del virus de los 3 aislados: ToBRFV-Ja, -Hgo y -Mrc. Adicionalmente, se amplificó un aislado procedente de Puebla (ToBRFV-Pue) (Figura 5).

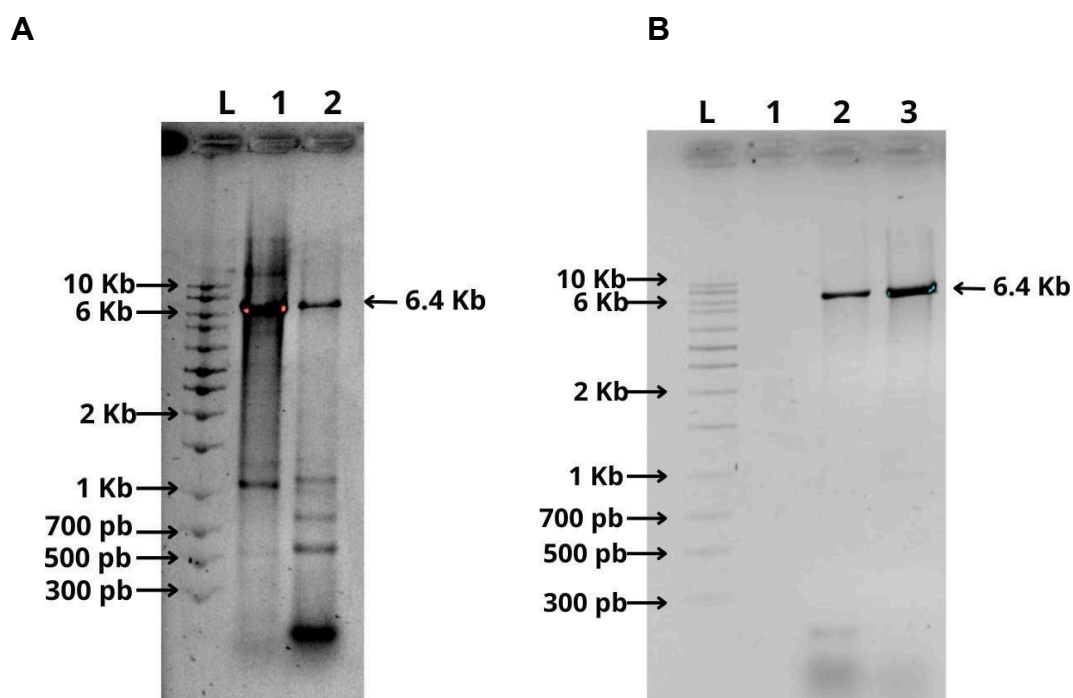


Figura 5. Amplificación del genoma completo de ToBRFV mediante RT-PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra bandas de 6.4 kb, correspondientes al genoma completo del virus. A. Gel de agarosa con la amplificación de muestras de Puebla y del mercado. El carril L contiene el marcador de tamaño molecular de DNA (DNA Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen). En el carril 1 se observó el producto de amplificación de ToBRFV de la muestra de Puebla, mientras que en el carril 2 se detectó el producto de amplificación de la muestra adquirida en el mercado. B. Gel de agarosa con la amplificación de muestras de Jalisco e Hidalgo. El carril L contiene el marcador de tamaño molecular. En el carril 1 no se observó amplificación. El carril 2 mostró el producto de amplificación de la muestra de Jalisco, mientras que el carril 3 correspondió a la amplificación de la muestra de Hidalgo.

4.4. Comparación de virulencia de aislados de ToBRFV y análisis moleculares

4.4.1. Ensayo de inoculación de *N. benthamiana*

Se evaluó la virulencia de los aislados ToBRFV-Ja y ToBRFV-Hgo de ToBRFV en plantas de *N. benthamiana*. La duración total del experimento fue de 16 dpi.

En el caso del aislado ToBRFV-Ja, se observó que casi el 100% de las plantas inoculadas desarrollaron síntomas virales. Los primeros signos de infección aparecieron a los 5 días posteriores a la inoculación (dpi), manifestándose inicialmente en la hoja inoculada. Para el día 10, los síntomas se intensificaron, provocando la necrosis total de la hoja afectada. Conforme la infección avanzó, las plantas experimentaron marchitamiento progresivo, clorosis y necrosis en hojas más jóvenes, así como una severa afectación en la estructura general de la planta hasta la muerte total (Figura 6).

De las seis plantas inoculadas con ToBRFV-Hgo, los síntomas se limitaron a necrosis en la hoja inoculada, sin afectar significativamente el resto de la planta y tuvieron aspecto similar al de las plantas sanas.

Por otro lado, las plantas de *N. benthamiana* utilizadas como control permanecieron sanas durante todo el experimento. No presentaron síntomas asociados al virus, manteniendo su desarrollo normal (Figura 6).

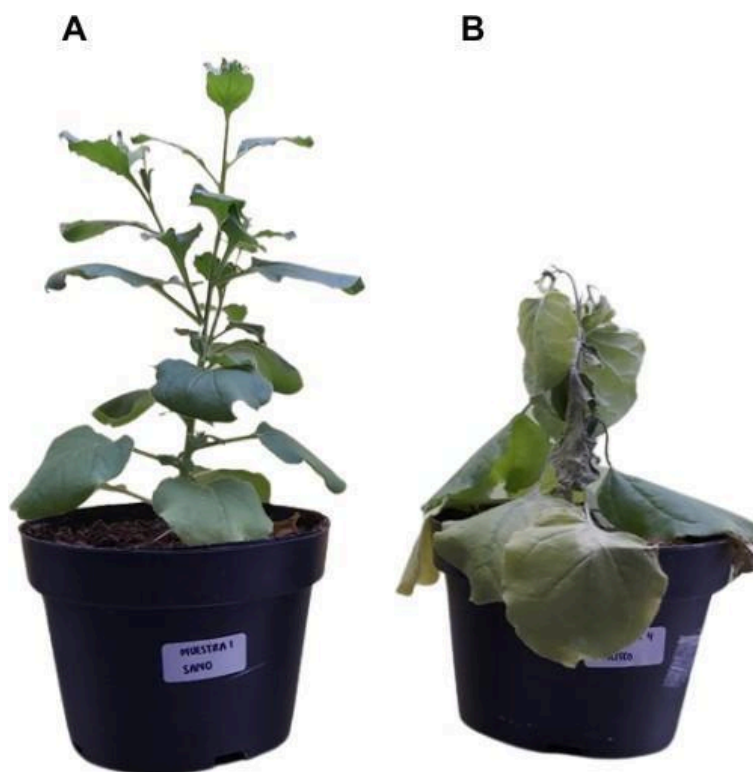


Figura 6. Comparación de la infección sistémica en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con los diferentes aislados. En (A) se muestra la planta utilizada como control y en (B) la planta inoculada con el aislado ToBRFV-Ja.

La presencia de ToBRFV en *N. benthamiana* se confirmó mediante RT-PCR con los mismos oligonucleótidos, obteniendo un fragmento de 1030 pb en las muestras infectadas. En T1 y T2, se analizaron hojas encima de las inoculadas para verificar la infección sistémica con ToBRFV-Ja y ToBRFV-Hgo, respectivamente. En T2, adicionalmente se analizaron las hojas inoculadas. Los resultados se presentan en el gel de agarosa al 1%. Se detectó leve presencia del aislado ToBRFV-Hgo en la hoja inoculada y ausencia en las hojas sistémicas. En cambio, una fuerte infección sistémica se detectó en el caso de plantas inoculadas con ToBRFV-Ja. La muestra correspondiente a la planta sana no presentó ninguna banda, confirmando su estado libre de infección (Figura 7).

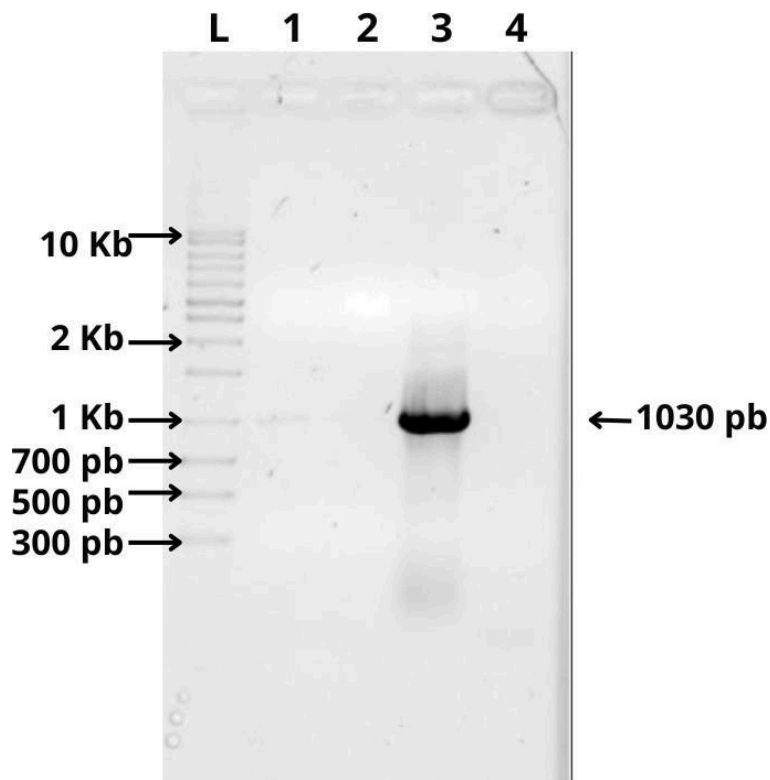


Figura 7. RT-PCR de muestras de *N. benthamiana* inoculadas con ToBRFV. El carril L correspondió al marcador de tamaño molecular de ADN (ADN Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen). Los carriles 1 y 2 representaron las muestras de Hidalgo, provenientes de hojas inoculadas y sistémicas, respectivamente. El carril 3 correspondió a la muestra de Jalisco, mientras que el carril 4 mostró la muestra de la planta sana, en la cual no se observó amplificación.

4.4.2. Ensayo de inoculación de tomate comercial

Se analizó la virulencia de tres aislados de ToBRFV en plantas de tomate comercial procedentes de Jalisco (ToBRFV-Ja), Hidalgo (ToBRFV-Hgo) y del mercado local (ToBRFV-Mrc).

Casi el 100% de las plantas inoculadas con ToBRFV-Ja, mostraron síntomas viral. Los primeros signos aparecieron a los 3 días posteriores a la inoculación (dpi) en la hoja inoculada, seguidos de un ligero amarillamiento y enchinamiento entre los 6 y 9 dpi. A los 12 dpi, los síntomas se intensificaron notablemente y, para el día 16, la infección sistémica era evidente en toda la planta. Se registraron deformaciones

severas, fuerte enchinamiento, mosaico en las hojas, reducción y elongación foliar, así como el oscurecimiento del tallo a un tono café oscuro. Todas las repeticiones presentaron síntomas similares, confirmando la severidad de la infección (Figura 8 y 9).



Figura 8. Síntomas observados en plantas de tomate infectadas con el aislado de ToBRFV-Ja. Diferentes síntomas en días posteriores a la inoculación, mostrando deformaciones foliares, mosaico, alteraciones en la coloración de las hojas, hojas de menor tamaño y alargadas, enchinamiento y oscurecimiento del tallo.

Las plantas inoculadas con ToBRFV-Hgo presentaron síntomas leves o nulos. En la mayoría de los casos, los síntomas no fueron notorios, excepto en aproximadamente dos de las seis plantas, donde se observó un ligero enchinamiento en las hojas apicales y necrosis en las hojas inoculadas (Figura 9).

Las seis plantas inoculadas con ToBRFV-Mrc presentaron síntomas similares a los causados por ToBRFV-Ja, pero con menor severidad. Estos síntomas se manifestaron como enchinamiento, mosaico, moteado en las hojas, deformaciones y oscurecimiento del tallo, hojas finas (Figura 9).

Por otro lado, las plantas sanas utilizadas como control no presentaron ningún síntoma asociado al virus, manteniendo hojas sin mosaico, deformaciones ni amarillamiento (Figura 9).

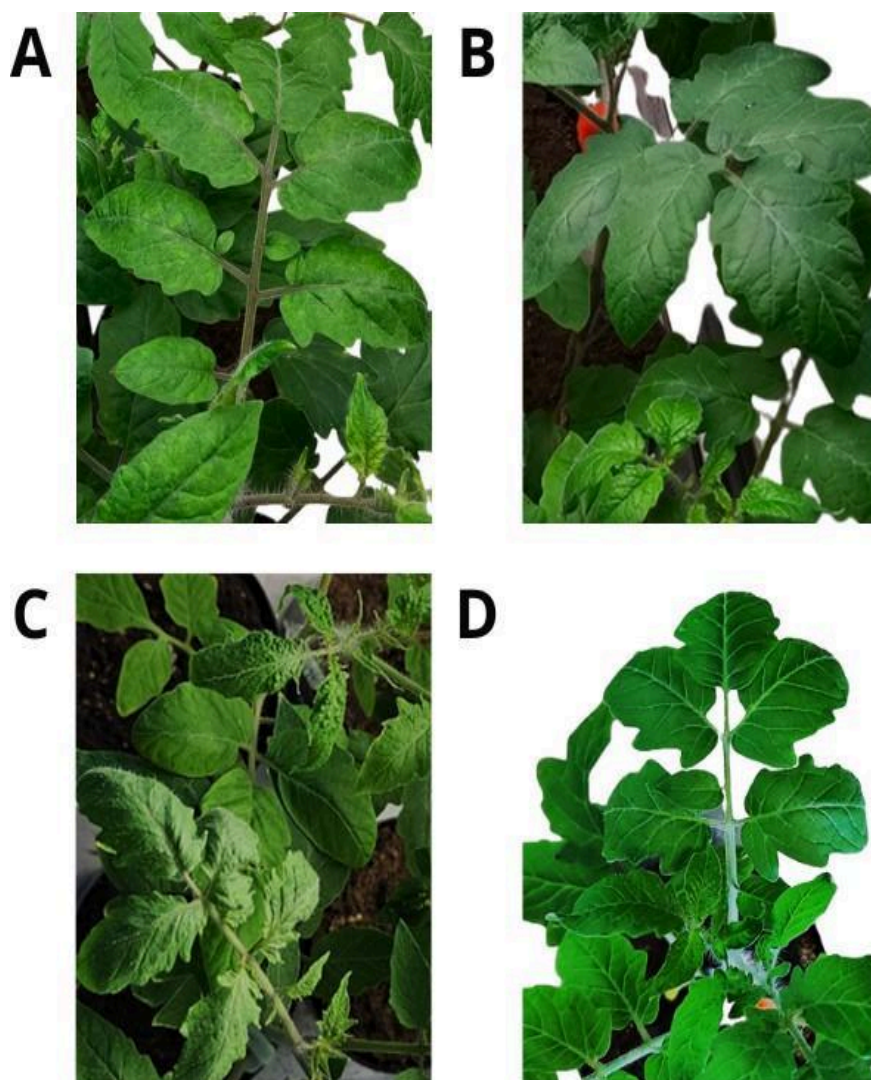


Figura 9. Comparación de la infección sistémica en plantas de tomate comercial inoculadas con los diferentes aislados. A. Planta inoculada con el aislado ToBRFV-Ja. B. Planta inoculada con el aislado ToBRFV-Hgo. C. Planta inoculada con el aislado ToBRFV-Mrc. D. Planta utilizada como control.

Como continuación a este experimento, se realizó la detección de ToBRFV mediante RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos AGB-121/122.

Por cada tratamiento, se tomaron muestras de las hojas post-inoculadas. Cada tres muestras se juntaron en una sola extracción. La amplificación por RT-PCR, usando oligonucleótidos específicos, permitió la obtención de un amplicón de aprox. 1030 pb en las muestras infectadas, mientras que las plantas sanas no mostraron ningún producto amplificado. El gel de agarosa de la figura 10, muestra los resultados obtenidos, fuerte acumulación viral se detectó en T1 (ToBRFV-Ja) y T3 (ToBRFV-Mrc), mientras que en el T2, la acumulación viral fue muy baja.

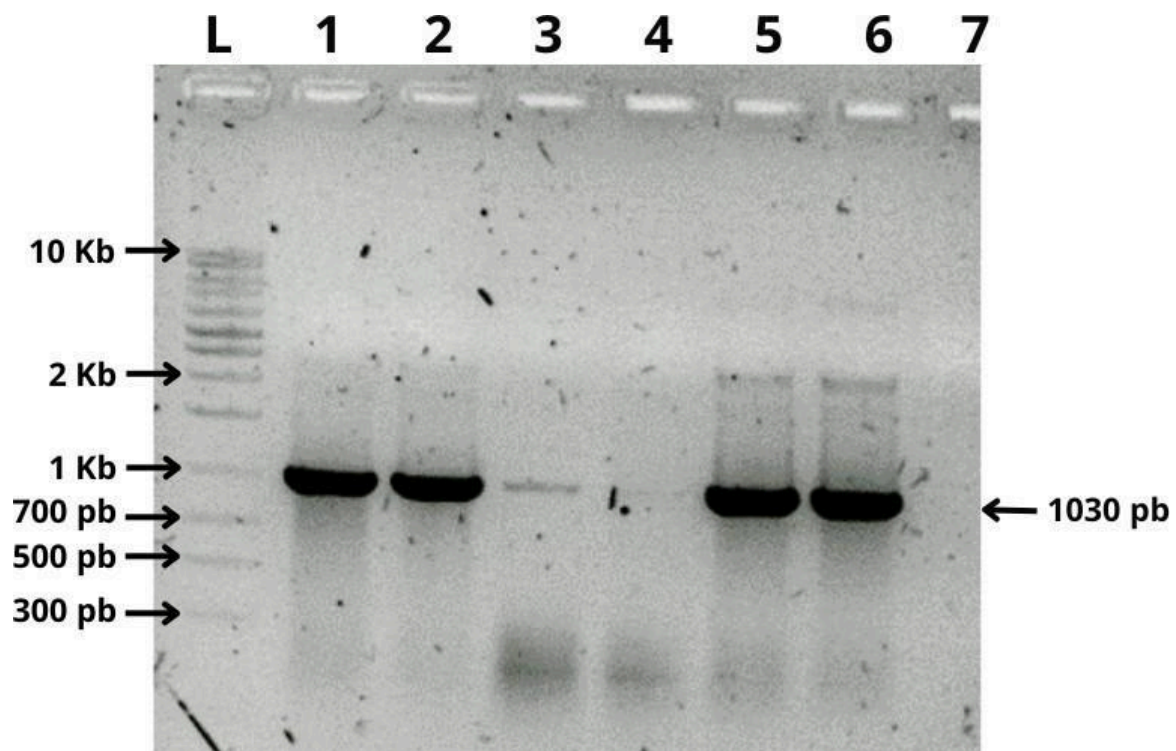


Figura 10. RT-PCR de muestras de tomate comercial inoculadas con ToBRFV. El carril L corresponde al marcador de tamaño molecular de DNA (DNA Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen). Los carriles 1 y 2 muestran las muestras infectadas con los aislados de ToBRFV-Ja, los carriles 3 y 4 corresponden a las muestras infectadas con los aislados de ToBRFV-Hgo, los carriles 5 y 6 representan las muestras infectadas con los aislados de ToBRFV-Mrc, y el carril 7 representan la muestra de planta sana.

4.4.3. Ensayo de inoculación de tomate silvestre

Como resultado preliminar, en tomate silvestre, la severidad del aislado ToBRFV-Ja fue mayor que la del aislado ToBRFV-Mrc, se observó enchinamiento en las hojas, acompañado de mosaico y una reducción en el tamaño foliar, con hojas más alargadas. Sin embargo la severidad del virus en general en los dos casos fue menor a la observada en tomate comercial.

Los primeros síntomas se notaron a los 15 dpi (Figura 11), aunque en una proporción muy baja de las plantas. A los 28 días, los síntomas suaves fueron más evidentes (Figura 12). Mientras que en las plantas sanas, no se visualizaron síntomas característicos de este virus.

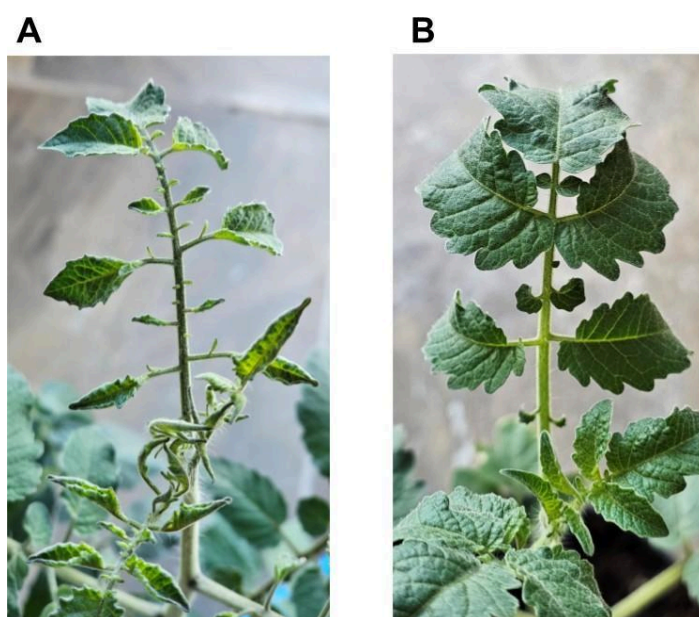


Figura 11. Primeros síntomas del ToBRFV en tomate silvestre a los 15 dpi. Se observó un ligero mosaico y un leve enchinamiento en las hojas. A. Aislado de ToBRFV-Ja. B. Aislado de ToBRFV-Mrc.

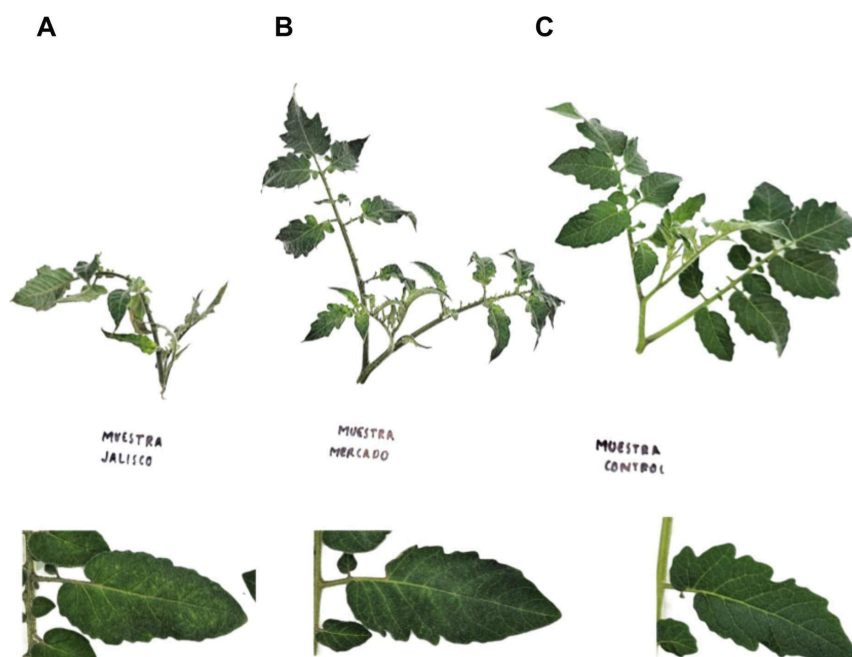


Figura 12. Síntomas más evidentes del ToBRFV en tomate silvestre a los 28 dpi. Se apreció un mayor grado de mosaico, reducción en el tamaño foliar y hojas alargadas en comparación con las plantas sanas. A. Aislado de ToBRFV-Ja. B. Aislado de ToBRFV-Mrc. C. Control negativo sin síntomas.

Se detectó el ToBRFV en las plantas de tomate silvestre mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia del virus en las plantas inoculadas, con la amplificación de un fragmento de 1030 pb, mientras que, en la muestra sana no se observó amplificaciones (Figura 13).

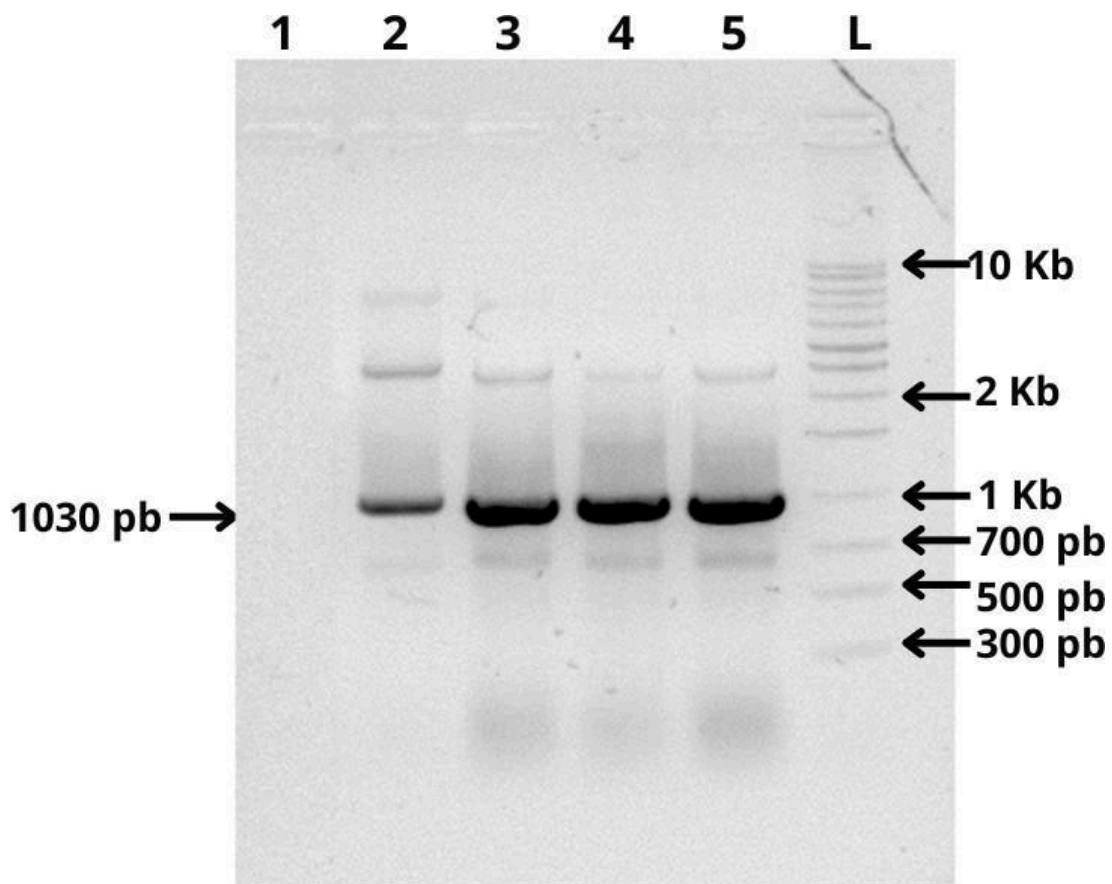


Figura 13. RT-PCR de muestras de tomate silvestre inoculadas con ToBRFV. El carril 1 muestra la planta sana, los carriles 3 y 4 representan las muestras infectadas con los aislados de ToBRFV-Mrc, y los carriles 5 y 6 corresponden a las muestras infectadas con los aislados de ToBRFV-Ja. El carril L corresponde al marcador de tamaño molecular de DNA (DNA Ladder 300 pb - 8000 pb, Axygen).

5. DISCUSIÓN

La ribozima de HDV juega un papel crucial en la construcción de clones recombinantes infecciosos de virus, eliminando los nucleótidos no virales en el extremo 5' de las transcripciones in vivo que pueden reducir significativamente la infectividad, según lo señalado por Boyer & Haenni (1994). Este efecto depende, en general, de la longitud de la extensión no viral, siendo que las extensiones cortas tienen poco impacto sobre la infectividad (Satyanarayana *et al.*, 2003; Navas Hermosilla *et al.*, 2021). Para mitigar estas alteraciones, se debe insertar la secuencia de la ribozima de HDV justo después de la secuencia viral en los clones infecciosos. Esta estrategia permite la autoescisión de los nucleótidos adicionales, generando extremos virales (cuasi) adecuados, lo que en algunos casos resultó en una mejora notable de la infectividad (Turpen *et al.*, 1993). Además, estudios han demostrado que la actividad catalítica de la ribozima de HDV es indispensable para la replicación viral y el ensamblaje de partículas en la célula huésped. Esto ha sido corroborado por investigaciones como la de Scholthof (1999), en la que se reportó un incremento en la infectividad al emplear la ribozima HDV junto con la señal terminadora Nos, por lo tanto existen varios trabajos que han utilizado clones infectivos con esta estrategia por ejemplo Sun *et al.* (2017), Tavares Esashika *et al.* (2020), Ma *et al.* (2021) y Chen *et al.* (2023).

En el año 2021, Ma y sus colaboradores obtuvieron un clon infeccioso de ToBRFV, el ensamblaje final lo lograron con dos secuencias solapante del genoma completo (6.4 kb) en este trabajo, se alcanzó amplificar el genoma completo en un solo amplicón de PCR, con la idea de clonarlo y realizar el ensamblaje directo con el vector de expresión. La obtención del genoma en un solo paso ofrece una garantía de clonar un aislado tal como se presenta en la naturaleza. En total, se obtuvieron amplicones completos de cuatro aislados representativos de diferentes regiones de México; de estos, dos fueron molecularmente caracterizados en la tesis de Linares Estrada (2024-CIQA): ToBRFV-Ja y ToBRFV-Hgo.

Para determinar, el mejor aislado candidato para el clon infeccioso se analizó la virulencia de los aislados de ToBRFV; dos de ellos en *N. benthamiana* y tres en tomate comercial. La evaluación de los síntomas reveló que el aislado ToBRFV-Ja presentó la virulencia más marcada en todas las especies analizadas, seguido por el aislado ToBRFV-Mrc que mostró manifestaciones de menor intensidad, mientras que, el aislado ToBRFV-Hgo no presentó síntomas. Unos análisis moleculares se realizaron para confirmar la presencia del virus, reveló su presencia en los tres casos. Eso significa que una variabilidad de virulencia existe entre estos aislados, aunque en el caso de ToBRFV-Hgo la concentración viral era muy tenue en comparación con los dos otros aislados. y eso puede explicar la ausencia de síntomas en la planta.

Lo reportado por Vargas Mejía *et al.* (2023) sobre la transmisión y estabilidad del virus pueden verse afectadas por factores como la contaminación en semillas, agua de riego y sustratos, además de la efectividad de ciertos métodos de desinfección. En particular, la identificación de partículas virales con baja infectividad en pozos de agua sugiere que ciertas condiciones ambientales pueden reducir la carga viral y, por lo tanto, la expresión de síntomas en plantas infectadas. Las condiciones fueron controladas e idénticas para los tres aislados, es poco probable que factores externos variables expliquen la diferencia observada. Sin embargo, es posible que el aislado ToBRFV-Hgo, aun bajo estas mismas condiciones, tenga una menor capacidad de replicación debido a factores intrínsecos (mutaciones, carga viral inicial baja, menor eficiencia de proteínas virales), lo que podría resultar en una infección tenue y sin síntomas visibles en la planta.

6. CONCLUSIÓN

En esta tesis se logró obtener por RT-PCR el genoma completo de cuatro aislados mexicanos de ToBRFV y amplificar la ribozima junto con el terminador NosT. El trabajo proporciona una base para seguir la construcción de un clon infeccioso y realizar estudios de infección in vivo. De otro lado, el estudio de virulencia de 3 aislados, confirman que existe heterogeneidad en la población, que se refleja en el comportamiento del virus en la planta.

Esta investigación proporciona una base para futuras estrategias de manejo y control del ToBRFV, contribuyendo al estudio de los virus de ARN en plantas.

7. BIBLIOGRAFÍAS

- Adams, M. J., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane, S. A., Wong, S.-M., Melcher, U., Ratti, C., & Ryu, K. H. (2017, August). ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae. *J Gen Virol*, 98(8), 1999-2000. doi: 10.1099/jgv.0.000884
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Kreuze, J. (2009). Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol.*, 154(12), 1967-72. doi: 10.1007/s00705-009-0506-6.
- Alarcón, D. S., & Ojeda Flores, R. (2018, Abril-Junio). Virus: pequeños gigantes que dominan el planeta. *Ciencia*.
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/69_2/PDF/Virus.pdf
- Alkowni, R., Alabdallah, O., & Fadda, Z. (2019, January). Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101, 719-723. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00240-7>
- Boyer, J. C., & Haenni, A. L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 198, 415-426. doi: 10.1006/viro.1994.1053
- Cambrón Crisantos, J. M., Rodríguez Mendoza, J., Valencia Luna, J. B., Alcasio Rangel, S., García Ávila, C. d. J., López Buenfil, J. A., & Ochoa Martínez, D. L. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(1), 185-192. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-5>
- Canny, M. D., Jucker, F. M., Kellogg, E., Khvorova, A., Jayasena, S. D., & Pardi, A. (2004, August 14). Fast cleavage kinetics of a natural hammerhead ribozyme. *Journal of the American Chemical Society*, 126(36), 10848–10849. <https://doi.org/10.1021/ja046848v>
- Chen, C., Du, M., Wang, Y., Zhou, X., & Yang, X. (2023, November). Molecular identification and development of an infectious cDNA clone of Trichosanthes kirilowii-infecting cucurbit mild mosaic virus. *Virology*, 588, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109891>
- Chitambar, J. (2018). California Pest Rating for Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Sacramento, CA, USA: California Department of Food and Agriculture*.
<https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=5843>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>

- Dombrovsky, A., & Smith, E. (2017, December 06). Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. *InTech*. DOI: 10.5772/intechopen.70244
- Duffy, S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biology*, 16(8), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Eichmeier, A., Hejlova, M., Orsagova, H., Frejlichova, L., Hakalova, E., Tomankova, K., Linhartova, S., Kulich, P., Cermak, V., & Cechova, J. (2023, January 23). Characterization of Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) Detected in Czech Republic. *Diversity*, 15(2), 301. <https://doi.org/10.3390/d15020301>
- Ferré D'Amaré, A. R., & Scott, W. G. (2010, March 6). Small Self-cleaving Ribozymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), 1-12. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/2/10/a003574.short>
- Fidan, H., Sarikaya, P., & Calis, O. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey. *New Disease Reports*, 39, 18. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.018>
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *The Annual Review of Genetics*, 51, 195-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Gruber, M. Y., & Crosby, W. L. (1993). Vectors for plant transformation. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*, 89-119. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=u0paDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA89&dq=Vectors+for+plant+transformation.+Methods+in+Plant+Molecular+Biology+and+Biotechnology,&ots=H9BRe__hjU&sig=fVLpbqA1QHM88oZgBBmapVi-RS0#v=onepage&q=Vectors%20for%20plant%20transformat
- Hammond, R. W. (2027). Chapter 1 - Economic Significance of Viroids in Vegetable and Field Crops. In *Viroids and Satellites* (pp. 5-13). Ahmed Hadidi, Ricardo Flores, John W. Randles, Peter Palukaitis. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00001-2>.
- Hoekema, A., Hooykaas, P. R., Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1983, May 12). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008, February 06). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325-332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>

- Linares Estrada, E. (2024, Agosto). *Detección por hibridación molecular y caracterización molecular de aislados mexicanos del virus rugoso de tomate ToBRFV*. (1st ed.) [Tesis de maestría]. Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu Ras, A., Esdras, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., & Dombrovsky, A. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLoS ONE*, 12(1). DOI10.1371/journal.pone.0170429
- Ma, Z., Zhang, H., Ding, M., Zhang, Z., Yang, X., & Zhou, X. (2021). Molecular characterization and pathogenicity of an infectious cDNA clone of tomato brown rugose fruit virus. *Phytopathology Research*, 3(14), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00091-0>
- Martins, J., Costa, T., Machado, L., Ferreira, R., Nascimento, V., Braga, D., Brito, A., Nogueira, G., Souza, L., Medeiros, J., Silva, T., Jesus, K., Freitas, J., Okumura, R., & Neto, C.F. (2024, 05 27). Osmotic regulators in cowpea beans plants under water deficiency. *Brazilian Journal of Biology*, 84(281457), 2. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.281457>
- Menzel, W., Knierim, D., Winter, S., Hamacher, J., & Heupel, M. (2019). First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports*, 39(1), 1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- Morgan, K. (2014, April 3). *Plasmids 101: The Promoter Region – Let's Go!* Addgene Blog. Retrieved March 6, 2025, from <https://blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region>
- Navas Hermosilla, E., Fiallo Olive, E., & Navas Castillo, J. (2021, July 25). Infectious Clones of Tomato Chlorosis Virus: Toward Increasing Efficiency by Introducing the Hepatitis Delta Virus Ribozyme. *Front. Microbiol.*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693457>
- Nolasco García, L. I., Marín León, J. L., Ruiz Nieto, J. E., & Hernández Ruíz, J. (2020, Septiembre-Diciembre). Métodos de identificación del virus de la fruta rugosa marrón del tomate (ToBRFV) en México. *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 835-844. doi:10.15517/am.v31i3.40655
- Oladokun, J. O., Halabi, M. H., Barua, P., & Nath, P. D. (2019, September 18). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology*, 68(9), 1579-1586. <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.13096>

- Pacheco Sanchez, R. (2019, Mayo). *Caracterización funcional del gen PvFlap-IIa, que codifica una fosfolipasa A tipo patatina de frijol (Phaseolus vulgaris L.), en la simbiosis con la rizobacteria Rhizobium tropici* (1st ed.) [Tesis de maestría]. Cd. México, Mexico.
- Panno, S., Caruso, A. G., & Davino, S. (2019). First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease*, 103(6), 1143. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Perrotta, A. T., & Been, M. D. (1991). A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature*, 350(6317), 434–436. <https://doi.org/10.1038/350434a0>
- Porrua, O., & Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 190-202. <https://doi.org/10.1038/nrm3943>
- Primrose, S. B., & Twyman, R. (2006). *Principles of gene manipulation and genomics* (7th ed.). Wiley. https://books.google.es/books?id=OMObEAAAQBAJ&dq=Principles+of+Gene+Manipulation+and+Genomics&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Renovell Ferrer, A. (2010, Enero 25). *El virus del Manchado Foliar de los Cítricos: caracterización del promotor del RNA subgenómico del gen de la proteína de la cápsida y del supresor del silenciamiento de RNA* [Memoria de Tesis doctoral]. Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/7324/tesisUPV3224.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016, February). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch Virol*, 161(2), 503-6. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Sanjuán, R., & Domingo Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci.*, 73(23), 4433-4448. doi: 10.1007/s00018-016-2299-6
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M. A., & Dawson, W. O. (2003, September 1). Frameshift mutations in infectious cDNA clones of Citrus tristeza virus: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to Escherichia coli. *Virology*, 313(2), 481-491. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00387-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00387-8)
- Scholthof, H. B. (1999, September 1). Rapid Delivery of Foreign Genes into Plants by Direct Rub-Inoculation with Intact Plasmid DNA of a Tomato Bushy Stunt Virus

- Gene Vector. *Journal of Virology*, 73(9), 7823–7829. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.9.7823-7829.1999>
- Shen, L., Wang, F., Liu, Y., Qian, Y., Yang, J., & Sun, H. (2013). Suppression of Tobacco mosaic virus by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ba33. *Journal of Phytopathology*, 161(4), 293-294. <https://doi.org/10.1111/jph.12058>
- Sompayrac, L. (2002). *How pathogenic viruses work*, Sudbury. Jones and Bartlett Publishers.
- Sun, K., Zhao, D., Liu, Y., Huang, C., Zhang, W., & Li, Z. (2017, November). Rapid Construction of Complex Plant RNA Virus Infectious cDNA Clones for Agroinfection Using a Yeast-E. coli-Agrobacterium Shuttle Vector. *Viruses*, 9(11), 332. <https://doi.org/10.3390/v9110332>
- Tavares Esashika, M. L., Souza Campos, R. N., Blawid, R., Lopes da Luz, L., Inoue Nagata, A. K., & Nagata, T. (2020). Characterization of an infectious clone of pepper ringspot virus and its use as a viral vector. *Arch Virol*, 165, 367-375. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04505-5>
- Teodoro Junqueira, B. R., Nicolini, C., Lucinda, N., Franco Orílio, A., & Nagata, T. (2014, March 15). A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector. *Journal of Virological Methods*, 198, 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.12.024>
- Tu, L., Wu, S., Gao, D., Liu, Y., Zhu, Y., & Ji, Y. (2021). Synthesis and Characterization of a Full-Length Infectious cDNA Clone of Tomato Mottle Mosaic Virus. *Viruses*, 13(6), 1050. <https://doi.org/10.3390/v13061050>
- Turpen, T. H., Turpen, A. M., Weinzettl, N., Kumagai, M. H., & Dawson, W. O. (1993, May). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 42(2-3), 227-239. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90035-P](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90035-P)
- Vargas Mejía, P., Rodríguez Gómez, G., Salas Aranda, D. A., García López, I. J., Pérez Alfaro, R. S., Ávila de Dios, E., Santoyo Villa, J. N., Alcalá Briseño, R. I., & Silva Rosales, L. (2023, April 12). Identification and management of tomato brown rugose fruit virus in greenhouses in Mexico. *Archives of Virology*, 168(5), 135. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05757-y>
- Vásquez Gutiérrez, U., Delgado Ortiz, J. C., Frías Treviño, G. A., Aguirre Uribe, L. A., & Flores Oliva, A. (2025). Tobamovirus fructirugosum una enfermedad emergente: revisión y situación actual en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 43(1), 1-28. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2401-7>

- Velásquez Valle, R., Reveles Torres, L. R., & Reveles Hernández, M. (2017). *Identificación de enfermedades causadas por virus en cultivos de Aguascalientes, Durango y Zacatecas* (Issue 1). Folleto Técnico Núm 91. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP. <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/Folleto%20Tecnico%2091.pdf>
- Wieczorek, P., Budziszewska, M., & Obrepalska Steplowska, A. (2015, February). Construction of infectious clones of tomato torrado virus and their delivery by agroinfiltration. *Archives of Virology*, 160, 517-521. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2266-1>
- Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Han, S. L., Geng, C., Tian, Y. P., & Li, X. D. (2019). First Report of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN>
- Zhao, L., Feng, C., Wu, K., Chen, W., Chen, Y., Hao, X., & Wu, Y. (2017, January). Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. *esticide Biochemistry and Physiology*, 135, 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.07.003>

8. ANEXOS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para la construcción [HDRz-NosT].

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido(+)/ Antisentido(-)	Tamaño
FHDVz1	tgg cta agg gag agc tcg aat ttc ccc gat cgt tca aac att tgg	+	45
FHDVz2	gag gac gtc gtc cac tcg gat ggc taa ggg aga gc	+	35
FHDVz3	ggt ccg acc tgg gca tcc gaa gga gga cgt cgt cca c	+	37
FHDVz4	gca tgg cat ctc cac ctc ctc gcg gtc cga cct gg	+	35
FHDVz5	ATT TAA ATC TCG AGT CTA GAg ggt cgg cat ggc atc tcc ac	+	41
NosT 140	CGC GCC ACA GTA GAT ACA ATG ATC TAG CCC TTA AGC ATT AG	-	41

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido(+)/ Antisentido(-)	Tamaño
AGB-121	TTA GCA CCA CAA TCG CAA CTC C	-	22
AGB-122	GCA GCA GAG GAC CAT TGT A	+	19
AGB-123	CAC AAT CGC AAC TCC ATC GC	-	20
AGB-124	CAG AGG ACC ATT GTA AAC CGG	+	21
AGB-188	GGG CCC CTA CCG GGG GTT CC	-	20
AGB-255	GGC <u>GCG GCC</u> <u>GCA TGC</u> GTA TTT TTT ACA ACA TAT ACC NotI SphI	-	36
AGB-256	ATA <u>GCG GCC</u> <u>GCT GCA G</u> TG GGC CCC TAC CGG GGG TTC NotI PstI	+	36