



**Evaluación teórica del efecto de nanopartículas de Zinc obtenidas mediante síntesis verde, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana***

Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

PhD. Flores Flor, Francisco Javier

04 de marzo del 2021

# URKUND

## Document Information

---

**Analyzed document** ParaUrkundJCLuzuriaga.txt (D97102677)  
**Submitted** 3/3/2021 3:18:00 PM  
**Submitted by**  
**Submitter email** fjflores2@espe.edu.ec  
**Similarity** 0%  
**Analysis address** fjflores2.espe@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

---



Firmado electrónicamente por:  
**FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Evaluación teórica del efecto de nanopartículas de Zinc obtenidas mediante síntesis verde, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana*”**, fue realizado por el señor **Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de marzo de 2021

Firma:



**Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D.**

C.C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos**, con cédula de ciudadanía n° 1724942279, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación teórica del efecto de nanopartículas de Zinc obtenidas mediante síntesis verde, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 05 de marzo de 2021

Firma

**Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos**

C.C.: 1724942279



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos**, con cédula de ciudadanía n° 1724942279, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Evaluación teórica del efecto de nanopartículas de Zinc obtenidas mediante síntesis verde, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana***" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo de 2021

Firma

**Luzuriaga Yáñez, Juan Carlos**

C.C.: 1724942279

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mi madre y a mi padre, quienes me han formado con mucho cariño y siempre me han dado un gran apoyo.

## **Agradecimientos**

A mi padre, que en paz descanse, por las lecciones que me ha dejado para convertirme en una gran persona y haberme dado su apoyo incansable hasta sus últimos días. Me gustaría hacerlo sentir orgulloso y espero poder retribuir todo el esfuerzo que invirtió en mí. Siempre lo recordaré con gran amor.

A mi madre que siempre ha estado a mi lado en toda circunstancia y me ha dado un apoyo incondicional. El amor, la dedicación y ejemplo de vida que he recibido, son aspectos invaluable por los que siento eterna gratitud. Gracias por cuidar siempre de mí y guiarme sabiamente en cada paso de mi vida.

A mi director de tesis, Francisco Flores PhD., quien ha sido un excelente mentor y un gran ejemplo a seguir. Gracias por dedicar su tiempo y esfuerzo en la supervisión de este trabajo, y contribuir con información valiosa para su culminación.

A Valeria Ochoa PhD., quién guío los primeros pasos de esta investigación y ha brindado su apoyo para el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros de la universidad que siempre estuvieron junto a mí a lo largo de la carrera, y con los cuales he construido recuerdos invaluable.

Agradezco mucho a todas las personas que me han apoyado y que han influido en mi formación académica y personal

## Índice de contenido

Caratula.....	1
Informe de Urkund .....	2
Certificación del Docente del Docente .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	14
Resumen.....	16
Abstract .....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Planteamiento del Problema.....	18
Justificación del Problema .....	20
Objetivos.....	22
<i>Objetivo General</i> .....	22
<i>Objetivos Específicos</i> .....	23
Capítulo II: Marco Teórico .....	24
Virus Fitopatógenos .....	24
<i>Generalidades</i> .....	24
<i>Afectación agrícola en Ecuador causada por enfermedades virales</i> .....	25
Cucumber mosaic virus.....	27
<i>Características Moleculares</i> .....	27
<i>Afectación a cultivos</i> .....	29
<i>Impacto en el sector agrícola del Ecuador</i> .....	30
Síntesis de Nanopartículas .....	31
<i>Estrategias de Síntesis</i> .....	31
<i>Síntesis biológica mediante el uso de bacterias y otros microorganismos</i> .....	32
<i>Síntesis verde en base a agentes reductores de plantas</i> .....	33
<i>Estabilidad y toxicidad de las nanopartículas</i> .....	33
Aplicación de nanopartículas de Zinc como tratamiento antiviral en plantas .....	34
<i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo en biología .....	36

<i>Caracterización de Arabidopsis thaliana</i> .....	36
<i>Importancia de los transportadores de Zinc en A. thaliana</i> .....	37
Capítulo III: Revisión Metodológica .....	38
Protocolo para síntesis verde de nanopartículas de Zinc .....	38
<i>Extracción vegetal</i> .....	39
<i>Síntesis por co-precipitación</i> .....	40
<i>Ensayo de estandarización de concentración</i> .....	41
Caracterización de nanopartículas de Zinc .....	41
<i>UV-Vis</i> .....	42
<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	43
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	44
<i>Difracción de Rayos X (XRD)</i> .....	45
<i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	46
Establecimiento de cultivos de <i>A. thaliana</i> .....	47
Análisis de citotoxicidad de las nanopartículas en <i>A. thaliana</i> .....	48
<i>Viabilidad celular</i> .....	50
<i>Ensayo cometa</i> .....	52
<i>Efectos fisiológicos</i> .....	54
Elongación de raíces. ....	54
Número de hojas.....	54
Porcentaje de supervivencia. ....	54
Construcción de CMV recombinante para la expresión de GFP .....	54
<i>Obtención de segmentos para los constructos</i> .....	56
<i>Ensamblaje Gibson</i> .....	59
<i>Ensamblaje NEBuilder HiFi DNA</i> .....	71
<i>Electroporación</i> .....	72
<i>Colony PCR</i> .....	73
Infección de CMV recombinante en plantas de <i>A. thaliana</i> col-0 .....	76
Visualización del movimiento de CMV recombinante dentro de <i>A. thaliana</i> por fluorescencia .....	76
<i>Aplicación de nanopartículas en A. thaliana</i> .....	76
<i>Visualización de CMV</i> .....	77
Determinación de carga viral mediante qRT-PCR .....	78
<i>Extracción de ARN</i> .....	78
<i>Síntesis de cDNA</i> .....	79

<i>qRT-PCR</i> .....	80
Capítulo IV: Resultados Esperados .....	84
Resultados de la síntesis .....	84
<i>UV-Vis</i> .....	85
<i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	86
<i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	88
<i>Difracción de Rayos X</i> .....	89
<i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier</i> .....	90
Establecimiento de los cultivos de <i>A. thaliana</i> .....	91
Análisis de citotoxicidad .....	92
<i>Viabilidad Celular y Ensayo Cometa</i> .....	92
<i>Efectos fisiológicos</i> .....	93
Construcción de CMV recombinante para la expresión de GFP .....	94
<i>Obtención de segmentos</i> .....	94
<i>Ensamblaje Gibson</i> .....	96
<i>Electroporación en A. tumefaciens</i> .....	98
<i>Colony PCR</i> .....	98
Agroinfiltración de CMV en <i>A. thaliana</i> .....	98
Visualización del movimiento de CMV recombinante dentro de <i>A. thaliana</i> por fluorescencia .....	99
Capítulo V: Discusión .....	101
Caracterización de las nanopartículas sintetizada .....	101
<i>Análisis de UV-Vis</i> .....	102
<i>Observaciones de TEM y SEM</i> .....	103
<i>Análisis de XRD</i> .....	103
<i>Análisis de FTIR</i> .....	104
Establecimiento de los cultivos de <i>A. thaliana</i> .....	104
Citotoxicidad de las nanopartículas en <i>A. thaliana</i> .....	105
CMV recombinante para la expresión de GFP.....	108
<i>Consideraciones para el diseño de CMV con expresión de GFP</i> .....	108
<i>Ensamblaje Gibson y Nebuilder HiFi</i> .....	109
<i>Transformación en A. tumefaciens</i> .....	111
<i>Agroinfiltración</i> .....	111
Efecto de las nanopartículas en el movimiento de CMV en <i>A. thaliana</i> .....	112
Capítulo VI: Conclusiones .....	114

Capítulo VII: Recomendaciones .....	115
Capítulo VIII: Bibliografía .....	116
Anexos .....	154

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Técnicas experimentales para caracterización de ZnONP .....	42
<b>Tabla 2</b> Diseño experimental para la evaluación de citotoxicidad en <i>A. thaliana</i> .....	49
<b>Tabla 3</b> Constructos para la inserción de GFP .....	55
<b>Tabla 4</b> Primers para ensamblaje del segmento ARN1 .....	60
<b>Tabla 5</b> Primers para ensamblaje del segmento ARN3 .....	61
<b>Tabla 6</b> Primers para ensamblaje del constructo C1 de ARN2-eGFP .....	62
<b>Tabla 7</b> Primers para ensamblaje del constructo C2 de ARN2-eGFP .....	62
<b>Tabla 8</b> Primers para ensamblaje del constructo C3 de ARN2-eGFP .....	63
<b>Tabla 9</b> Primers para ensamblaje del constructo C4 de ARN2-eGFP .....	64
<b>Tabla 10</b> Primers para ensamblaje del constructo C5 de ARN2-eGFP .....	64
<b>Tabla 11</b> Primers para ensamblaje del segmento ARN2 WT .....	67
<b>Tabla 12</b> Composición de reacción con la ADN polimerasa Phusion® High Fidelity .....	68
<b>Tabla 13</b> Condiciones de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos ...	69
<b>Tabla 14</b> Componentes para la reacción de ensamblaje Gibson .....	70
<b>Tabla 15</b> Condiciones de termociclador para ensamblaje Gibson .....	70
<b>Tabla 16</b> Mezcla de reacción NEBuilder HiFi DNA Assembly .....	72
<b>Tabla 17</b> Primers diseñados para confirmar la inserción de los plásmidos .....	74
<b>Tabla 18</b> Composición de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos ..	75
<b>Tabla 19</b> Condiciones de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos ...	75
<b>Tabla 20</b> Diseño experimental para la evaluación del efecto de ZnONP en el movimiento de CMV .....	77

<b>Tabla 21</b> Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.....	80
<b>Tabla 22</b> Condiciones de reacción para síntesis de cDNA .....	80
<b>Tabla 23</b> Primers para qPCR.....	80
<b>Tabla 24</b> Mezcla de reacción para la prueba de primers .....	81
<b>Tabla 25</b> Condiciones de reacción para la prueba de primers.....	82
<b>Tabla 26</b> Mezcla de reacción para la qPCR .....	82
<b>Tabla 27</b> Condiciones de reacción para la qPCR.....	83
<b>Tabla 28</b> Picos de absorción correspondientes a los grupos funcionales .....	91
<b>Tabla 29</b> Tamaño de amplicones utilizados como segmentos para el ensamblaje Gibson .....	95
<b>Tabla 30</b> Tamaño de los amplicones obtenidos tras ensamblaje .....	97

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Esquema de síntesis verde de NP .....	39
<b>Figura 2</b> Estimación de viabilidad celular .....	51
<b>Figura 3</b> Protocolo de ensayo cometa.....	53
<b>Figura 4</b> Esquemmatización de los constructos de ARN2 con eGFP .....	55
<b>Figura 5</b> Plásmido pGreen.....	56
<b>Figura 6</b> Ensamblaje del segmento ARN1 en pGreen .....	60
<b>Figura 7</b> Ensamblaje del segmento ARN1 en pGreen .....	61
<b>Figura 8</b> Ensamblaje del constructo C1ARN2 con pGreen.....	65
<b>Figura 9</b> Ensamblaje del constructo C2ARN2 con pGreen.....	65
<b>Figura 10</b> Ensamblaje del constructo C3ARN2 con pGreen.....	66
<b>Figura 11</b> Ensamblaje del constructo C4ARN2 con pGreen.....	66
<b>Figura 12</b> Ensamblaje del constructo C5ARN2 con pGreen.....	67
<b>Figura 13</b> Ensamblaje del segmento ARN2 con pGreen .....	68
<b>Figura 14</b> Polvo de ZnONP resultante del proceso de síntesis .....	84
<b>Figura 15</b> Mecanismos de formación de ZnONP .....	85
<b>Figura 16</b> Espectro UV-Vis de ZnONP .....	86
<b>Figura 17</b> Observaciones de ZnONP por TEM .....	87
<b>Figura 18</b> Observaciones de ZnONP por SEM .....	88
<b>Figura 19</b> Patrón de XRD para ZnONP.....	89
<b>Figura 20</b> Estructura cristalina de ZnONP.....	90
<b>Figura 21</b> Cultivos de <i>A. thaliana</i> .....	92

<b>Figura 22</b> Electroforesis de fragmentos para ensamblaje .....	95
<b>Figura 23</b> Electroforesis de plásmidos .....	96
<b>Figura 24</b> Efectos de CMV en <i>A. thaliana</i> .....	99
<b>Figura 25</b> Visualización de virus fluorescente en <i>A. thaliana</i> .....	100

## Resumen

El sector agrícola es un pilar fundamental en la economía del Ecuador y otros países del mundo, y muchas veces se ve afectado por la presencia de fitopatógenos. Por esto es importante el desarrollo de investigación enfocada a encontrar soluciones que permitan erradicar enfermedades en cultivos de interés económico. Este trabajo de investigación teórica se ha desarrollado con el objetivo de establecer una base que permita la evaluación del uso de nanopartículas de Zinc (ZnONP), como una estrategia de tratamiento antiviral en plantas. Para ello se ha tomado como organismos modelo a *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Arabidopsis thaliana*, por su amplio uso en experimentación científica. Se ha construido la base teórica requerida para la posterior ejecución de este proyecto, iniciando con la metodología de síntesis de ZnONP, mediante extractos vegetales, seguida de su caracterización y evaluación como potenciales agentes citotóxicos en *Arabidopsis thaliana*. Se ha modelado un clon infeccioso de CMV, capaz de expresar la proteína fluorescente verde (GFP), de modo que se pueda seguir su infección en *Arabidopsis thaliana*. Para cada fase se ha definido los protocolos a utilizar en un posterior trabajo experimental, y se han descrito los resultados que se podría tener según revisión bibliográfica. Con base en la información analizada, se prevé una disminución de los efectos producidos por la infección viral, tras la aplicación de las ZnONP, como estrategia preventiva o curativa.

### Palabras Clave

- EFECTO ANTIVIRAL
- VIRUS FITOPATÓGENO
- ENSAMBLAJE GIBSON
- FLUORESCENCIA

### **Abstract**

The agricultural sector is a fundamental pillar in the economy of Ecuador and other countries in the world, and is often affected by the presence of phytopathogens. Therefore, it is important to develop research projects, focused on finding solutions to eradicate diseases in crops of economic interest. This theoretical research work has been developed to establish a basis for the evaluation of Zinc nanoparticles (ZnONP), as an antiviral treatment strategy in plants. For this, *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Arabidopsis thaliana* have been taken as model organisms, due to their wide use in scientific experimentation. The theoretical basis required for the subsequent execution of this project has been developed, starting with the ZnONP synthesis methodology, using plant extracts, followed by their characterization and evaluation as potential cytotoxic agents in *Arabidopsis thaliana*. An infectious clone of CMV, capable of expressing green fluorescent protein (GFP), has been modeled so that its infection in *Arabidopsis thaliana* can be followed. For each phase, the protocols to be used in a subsequent experimental work have been defined, and the results that could be obtained according to a bibliographic review have been described. Based on the information analyzed, a decrease in the effects produced by the viral infection is expected, after the application of the ZnONP, as a preventive or curative strategy.

#### **Keywords:**

- **ANTIVIRAL EFFECT**
- **PHYTOPATOGENIC VIRUS**
- **GIBSON ASSEMBLY**
- **FLUORESCENCE**

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento del Problema

Los virus son patógenos infecciosos conformados por información genética, provista por una clase específica de ácido nucleico, rodeada por una capa de proteína (Lodish et al., 2000). Todos los virus son parásitos obligados, que dependen de la maquinaria celular de sus huéspedes para su replicación; dentro del huésped son capaces de inducir procesos de transcripción, traducción y encapsidación, que permiten el movimiento del virus e infección a larga distancia (Gergerich & Dolja, 2006). Los virus son agentes causantes de una gran variedad de enfermedades en plantas, y son mayoritariamente responsables de las pérdidas en el rendimiento y calidad de los cultivos, en todas partes del mundo (Hipper et al., 2013).

Las infecciones virales en plantas conllevan severas alteraciones a la fisiología del hospedero, debido a la modificación de procesos endógenos, lo cual provoca una profunda afectación en el rendimiento de los cultivos, en relación a calidad y cantidad de producto (Elmer et al., 2018). El problema de las afectaciones virales y su manejo, es un área de investigación con gran importancia, puesto que sus consecuencias afectan a un amplio grupo de la sociedad, que incluye a agricultores, granjeros, mediadores, exportadores y consumidores (Gergerich & Dolja, 2006). Para prevenir la proliferación de infecciones virales en cultivos, existen metodologías profilácticas basadas en termoterapia y quimioterapia, que son utilizadas en cultivo de tejidos, para la producción de variedades resistentes. También se ha ido impulsando el mejoramiento genético y la creación de transgénicos para obtener plantas madre, libres o resistentes a virus (Y. Zhao et al., 2020). Ante la presencia de infecciones virales en un cultivo, el control de la propagación viral mediante el uso de químicos es difícil lograr. Las medidas que muchas veces los agricultores aplican en el campo, consisten en la destrucción total del

cultivo o la excesiva aplicación de pesticidas para limitar la presencia de vectores (Bonilla, 2009). Se evidencia que existen alternativas para la prevención de enfermedades virales, pero estas no permiten mejorar el estado de las plantas después de que el virus se ha establecido en un cultivo. Un problema que se presenta en Ecuador para la implementación de estas estrategias, es que la introducción de plantas modificadas genéticamente tiene un conflicto con las regulaciones del país y el criterio de ciertos agricultores (Quito, 2018).

Como una alternativa para el control viral en plantas, se ha incrementado el uso de nanotecnología para aplicaciones antifitopatógenas. Los productos nanotecnológicos que han tenido mayor acogida como herramienta de gestión de enfermedades de las plantas, son las nanopartículas (NP), debido a su comprobada eficiencia para la protección de plantas y salud vegetal (Shang et al., 2019). La acción antiviral de las NP se basa en una interacción con las glicoproteínas de la envoltura viral, que afectan su integridad estructural, o en la inhibición de rutas que son esenciales para la replicación del virus; además, las NP ejercen un efecto adicional, al estimular respuestas de defensa, como la acumulación de enzimas oxidativas, que evitan la diseminación de partículas virales en el sistema vascular (Kwon et al., 2010). Para la síntesis de NP, convencionalmente se han utilizado métodos físicos y químicos, los cuales a pesar de tener un alto rendimiento, presentan una serie de inconvenientes; principalmente se ha reportado que dichas estrategias requieren de mucho tiempo para lograr estabilidad térmica, presentan un alto consumo de energía, y el uso de agentes reductores genera problemas de contaminación ambiental (Kawasaki & Nishimura, 2006; Pal et al., 2007). La síntesis verde de nanopartículas es una alternativa que muestra ser más eficiente, simple, económica, y puede ser fácilmente escalable para realizar operaciones más grandes, en comparación con las alternativas mencionadas previamente (Pal et al.,

2019). Este método se basa en el uso de materiales benignos para el medio ambiente, como extracto de hojas de plantas, extracto de frutas, bacterias, hongos, levaduras y enzimas, para la síntesis de las nanopartículas (Jain, Dalm, Kachhwaha, & Kothari, 2009).

Es por ello que en el presente proyecto se propone hacer una evaluación teórica del posible efecto inhibitor que tendrían las nanopartículas de zinc (ZnONP), obtenidas por síntesis verde, sobre la replicación y el movimiento intra e intercelular de *Cucumber mosaic virus* (CMV), en *Arabidopsis thaliana*. CMV es conocido como uno de los virus de plantas más generalizados, con la capacidad de infectar a más de 1200 especies de plantas en todo el mundo, y tiene una eficiente capacidad de transmisión dada por más de 80 especies de pulgones (Dubey et al., 2010).

### **Justificación del Problema**

La agricultura es considerada como uno de los pilares fundamentales para la economía del Ecuador, puesto que esta actividad da empleo a casi un tercio de la población económicamente activa y representa entre un 8% a 9% del producto interno bruto nacional (Fiallo & Beltran, 2017; Ortiz & Carrión, 2018). Desafortunadamente, la producción agrícola en ocasiones se ve afectada por diversos patógenos que causan graves repercusiones en la cantidad y calidad de producto que se genera (Hidalgo, 2017). En Ecuador se ha tenido reportes de diversos virus, principalmente: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV) y *Potato virus Y* (PVY) (Ochoa & Insuasti, 2000; Rivera & Echeverría, 2017). En el caso de CMV, los reportes de infecciones virales se han dado mayoritariamente en cultivos de banano, representando una grave amenaza para su cultivo (Buitrón-Bustamante & Morillo-Velastegui, 2017). La importancia del banano en el Ecuador, radica en que el país es uno de los líderes exportadores de esta fruta a nivel

mundial; además representa el 2% del PIB del país, el 26 % del PIB agrícola, el 8 % de las exportaciones generales y el 27% de las exportaciones agropecuarias (Armendáriz et al., 2016; Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2013). El impacto económico del CMV puede agravarse debido a su amplio espectro de hospederos, ya que se reporta su presencia en más de 1000 especies vegetales (Mochizuki & Ohki, 2012). Es por ello la importancia de encontrar tratamientos eficaces que limiten la propagación del virus y reduzcan su incidencia.

Los virus son patógenos difíciles de controlar, principalmente porque su presencia se puede evidenciar solo a través de los síntomas que causan y en general su control mediante la aplicación de pesticidas u otros químicos, tiene una muy baja eficacia (Takahashi et al., 2019). Las estrategias más utilizadas para el control de virus incluyen la erradicación y aislamiento de plantas infectadas, e incorporar resistencia viral por mejoramiento genético del cultivo (Mowry, 2005). En cuanto al control mediante el uso de compuestos químicos, se ha demostrado que su ineficacia se debe principalmente a la dificultad en mantenimiento de concentraciones inhibitorias en el sistema (Hansen & Stace-Smith, 1989). En años recientes, se han hecho numerosas investigaciones en torno al potencial que tienen ciertas NP metálicas para combatir enfermedades virales en diversos huéspedes y se ha comprobado que las nanopartículas de plata y óxido de zinc interfieren en la entrada de virus a las células, a través de varios receptores de la membrana celular (Arruda et al., 2015; Zeedan et al., 2020). Muchas NP han mostrado excelentes propiedades antimicrobianas, considerándose una solución exitosa en el control de bacterias, hongos y virus fitopatógenos (Pal et al., 2019). Las NP pueden ser elaboradas usando diferentes precursores metálicos como Plata (Ag), Oro (Au), Silicio (Si), Hierro (Fe) y Zinc (Zn), utilizando estrategias químicas, físicas y biológicas (Dhand et al., 2015). Sin embargo,

también se ha reportado efectos tóxicos ejercidos por NP en algunas especies vegetales, e incluso en pequeños vertebrados, invertebrados, organismos acuáticos y plantas (Hou et al., 2018). Se ha comprobado que las NP obtenidas mediante síntesis biológicas ejercen un menor grado de toxicidad y generan una menor carga de contaminación en comparación con las estrategias de síntesis química y biológica (Jadoun et al., 2021). Las ZnONP son un gran alternativa para su uso como tratamiento antiviral, cuya eficacia se ha descrito en trabajos previos (Abdelkhalek & Al-Askar, 2020; Cai et al., 2019; Farouk & Ibrahim, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que las ZnONP tienen un efecto ambivalente, de toxicidad y estimulación en especies vegetales, lo cual depende de la concentración que se utiliza y la interacción propia del hospedero vegetal (Szöllösi et al., 2020). Se propone realizar la investigación tomando como hospedero a *A. thaliana*, un organismo modelo popular en biología y genética de plantas debido a su corto tiempo de generación en el laboratorio, su producción de grandes cantidades de semillas y su reproducción principalmente por autofecundación (Van Norman & Benfey, 2009). El trabajo de investigación empezó a ejecutarse experimentalmente a inicios del 2020, pero debido a la emergencia sanitaria ocurrida en el país, provocada por la enfermedad Covid-19, y el consecuente cierre de laboratorios, se optó por hacer una revisión teórica. La culminación de este trabajo sirve como una base de apoyo para que futuros investigadores evalúen de forma experimental la eficacia de las ZnONP en infecciones virales.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Realizar una evaluación teórica del efecto de nanopartículas de zinc, obtenidas mediante síntesis verde, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana*.

**Objetivos Específicos**

- Recopilar información a partir de trabajos de investigación científica, relacionados a la síntesis y aplicación de nanopartículas de Zinc, con fines antivirales en plantas, tomando especial enfoque a trabajos realizados en *Cucumber mosaic virus* y *Arabidopsis thaliana*.
- Definir protocolos para la evaluación del efecto de nanopartículas de zinc en el movimiento de *Cucumber mosaic virus* en *Arabidopsis thaliana*.
- Modelar un clon infeccioso de *Cucumber mosaic virus* que exprese de la proteína verde fluorescente (GFP) en su cápside.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Virus Fitopatógenos

#### *Generalidades*

Los virus de plantas son parásitos obligados, con al menos tres genes que codifican para las proteínas de la cápside, de movimiento y de replicación. Se han categorizado más de 400 especies, que se encuentran descritas en el Noveno Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus; en el nivel más alto de clasificación de virus, se reconoce seis taxones principales en función de la naturaleza del genoma (Lefkowitz et al., 2018). La mayoría de los virus que afectan a hospederos vegetales tienen un ARN monocatenario de sentido positivo, que funciona directamente como ARN mensajero después de entrar en la célula huésped. Solo muy pocos virus vegetales tienen ARN monocatenario de sentido negativo, ADN monocatenario o ARN bicatenario (Buttner et al., 2015). Los virus fitopatógenos poseen característicos mecanismos de transmisión, que difieren de virus que infectan a otras especies, puesto que las células vegetales tienen pared celular y las plantas están cubiertas de una epidermis protegida con cera. La principal estrategia que los virus utilizan para entrar al hospedero consiste en una transmisión a través de heridas, o daño mecánico provocado por un vector (Takahashi et al., 2019). Cuando se encuentran dentro del hospedero, los virus se mueven a través de los plasmodesmos y aprovechan las conexiones citoplasmáticas existentes entre las células y el tejido vascular en la mayor parte de la planta (Navarro et al., 2019).

Pocos virus dependen de la transmisión mecánica pasiva de una planta a otra y pueden transmitirse fácilmente también a través del agua y el suelo; también existen virus que se transmiten a través de polen y semillas (Buttner et al., 2015). La mayoría de virus se transmiten por organismos vectores, como insectos que se alimentan de

plantas, nematodos y hongos parásitos de las plantas (Singh et al., 2020). La naturaleza de los síntomas provocados por enfermedades virales se da en dependencia del virus y el huésped; el efecto puede variar desde severo, que es fácilmente percibido, hasta muy agudo, según la constitución genética de las plantas y su sistema inmune (Roossinck, 2015). Los síntomas más evidentes son causados por una infección sistémica, en la que se da el apareamiento de deformaciones y cambios en la coloración de frutos, hojas, tallos, raíces u otras partes de la planta. Esto conduce directamente a reducciones en el rendimiento de los cultivos o pérdidas de calidad o cantidad (Rybicki, 2015). Un síntoma que comúnmente aparece es la hiperplasia, que consiste en la proliferación anormal de células provocando la aparición de tumores vegetales; por otro lado existen virus inducen hipoplasia o disminución del crecimiento celular en las hojas de las plantas, provocando áreas delgadas y amarillas. Los efectos que se dan a consecuencia de la infección viral pueden traer graves pérdidas productivas, en el caso de cultivos comerciales (Buttner et al., 2015).

### ***Afectación agrícola en Ecuador causada por enfermedades virales***

Dentro de Ecuador, la actividad agrícola es de suma importancia para el sector productivo del país, pues agrupa a un gran sector de la población económicamente activa, y tiene una gran importancia en el PIB (Fiallo & Beltran, 2017; Ortiz & Carrión, 2018). La riqueza agrícola del Ecuador ayuda al aseguramiento de su soberanía alimentaria (Yupa & Rocha, 2014). Es difícil tener un conocimiento preciso sobre la realidad de la incidencia de enfermedades virales en los cultivos del país, puesto que, al haber un porcentaje predominante de productores pequeños, estos no reportan las posibles enfermedades y optan por eliminar los cultivos que son afectados; también existen ciertas clases de virus que no provocan una afección tan grave a los cultivos, por lo que no se toman acciones en este caso (Quito, 2018; Rivera & Echeverría, 2017)

En frejol (*Phaseolus vulgaris* L.), los primeros reportes en datan de 1977 y 1978; en 1981 se reportan casos de infecciones virales a lo largo de todo el callejón interandino, habiendo una incidencia de hasta 100% en las provincias de Azuay, Cañar y Loja. Para 1994 se determinó la presencia de *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) en Imbabura, *Bean common mosaic virus* (BCMV) en Azuay, Chimborazo, Imbabura y Cañar; y *Southern bean mosaic virus* (SBMV) en Loja (Rivera & Echeverría, 2017). En caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se ha reportado la presencia de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), cuya afección puede agravarse debido al tipo de propagación vegetativa y el monocultivo en extensas áreas (Garcés & Carbo, 2013). En cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se ha reportado la presencia de *Potato virus Y*, *Peruvian tomato mosaic virus*, *Potato virus V* y *Potato leaf roll virus* (Quinto et al., 2015).

En papaya (*Carica papaya*) y babaco (*Vasconcellea x heilbornii*), *Papaya ringspot virus* (PRV), es la principal causa de pérdidas económicas, y su manejo se basa en la eliminación de plantas infectadas para reducir su propagación. Existe un gran riesgo para el babaco, puesto que se propaga de forma asexual a través de esquejes, que, bajo condiciones de temperatura ambiente en zonas templadas, no expresan síntomas visibles, pero cuando son trasplantados a condiciones de invernadero, las plantas exhiben síntomas y su producción declina considerablemente (Quito, 2019). En naranjila (*Solanum quitoense*) se ha reportado la presencia de *Tobacco virus 2* (TV2), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Tomato torrado virus* (ToTV), en muestras obtenidas de cultivos en Tumbaco, provincia de Pichincha (Ramos et al., 2020). En el mismo estudio se identificó infecciones de *Citrus tristeza virus* (CTV) en Limón Meyer (*Citrus x meyeri*). En papa (*Solanum tuberosum*), los principales virus que se encuentran en Ecuador son *Potato virus S* (PVS) y *Potato virus X* (PVX), cuyos

síntomas en ocasiones son difíciles de detectar; se ha reportado que usualmente los virus causan problemas en cultivos establecidos en zonas por debajo de 3000 m sobre el nivel del mar, especialmente en variedades susceptibles, como la Diacol Capiro y cuando se tienen altas poblaciones de insectos vectores (Pumisacho & Velásquez, 2009).

Los principales factores que contribuyen a la propagación de enfermedades virales son el transporte de virus por actividades comerciales, y el cambio en la dinámica de los vectores. En actividades comerciales, se da un mayor riesgo cuando existe mayor grado de manipulación. Se incrementa el riesgo de infección por la dinámica de los vectores, cuando existe una menor diversidad de especies de hábitat y diversidad genética de hospedadores; y también con una mayor densidad de plantas hospedadoras (Rodelo-Urrego et al., 2013). La calidad del agua y del suelo son factores que se deben evaluar constantemente para asegurar una producción libre de virus. Se deben esterilizar por filtración todas las soluciones de nutrientes potencialmente contaminadas, debe evaluarse la calidad de agua circundante y soluciones que se propagan por sistemas de recirculación (Moorman et al., 2017). Se ha definido que las estrategias más valiosas en el manejo integrado de prevención viral, son: el uso de material de siembra esterilizada, la erradicación de vectores transmisores y de poblaciones de malezas que actúan como huéspedes secundarios, y la evaluación de posibles fuentes de contaminación, como el agua de riego (Sarwar et al., 2020).

## **Cucumber mosaic virus**

### ***Características Moleculares***

*Cucumber mosaic virus* es un virus de ARN positivo, perteneciente al género *Cucumovirus*, que se transmite horizontalmente por numerosas especies de pulgones, y a través de semilla, con grados de intensidad que dependen de los genotipos del CMV y

las especies de plantas hospederas (Adams et al., 2009; García-Arenal & Palukaitis, 2008). En *A. thaliana*, se ha reportado tasas de transmisión de semillas que varían entre 2 y 8% (Hily et al., 2014). Se encuentra una gran diversidad de aislados de CMV, que han sido clasificado en tres subgrupos: IA, IB y II. La clasificación se realiza en función de la similitud de sus ARN genómicos (Palukaitis & García-Arenal, 2003).

El genoma de CMV se compone de tres ARN monocatenarios de sentido positivo, denominados 1, 2 y 3, que se encuentran empacados formando partículas icosaédricas, con un tamaño promedio de 29 nm en diámetro. Las cápsides están compuestas por 180 subunidades de la proteína de la cápside (CP) y en su interior contienen el ARN (Jacquemond, 2012). El ARN1 es monocistrónico y codifica la proteína 1a, que posee un dominio de metiltransferasa y un motif helicasa en la parte C-terminal (Canto et al., 2001). El ARN2 codifica la proteína 2a, que posee el motif GDD, involucrado en la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN; también se encuentra la proteína pequeña 2b, con un marco de lectura abierto (ORF) que se superpone con los 30 nucleótidos terminales del ORF 2a. La proteína 2b actúa interfiriendo las vías de silenciamiento del huésped (Ahn et al., 2010). El RNA3 es bicistrónico, codifica a dos proteínas, la 3a o de movimiento del virus, y la proteína CP (Thompson & Tepfer, 2009).

Tras el contacto del virus con la planta, el virus inicia su replicación en las células inicialmente infectadas. Posteriormente se da la migración del virus a las células adyacentes, a través de los plasmodesmos. La proteína 3a es la principal involucrada en el movimiento, porque es capaz de modificar a los plasmodesmos con el fin aumentar el límite tamaño del paso de moléculas y de este modo puede promover el tráfico del ARN viral; también se encuentra involucrada en la unión la polimerasa a ARN

monocatenarios, sin especificidad de secuencia (Jacquemond, 2012; Mochizuki & Ohki, 2012).

### ***Afectación a cultivos***

CMV cuenta con un amplio rango de hospedadores, siendo capaz de infectar a más de 1,300 especies en más de 100 familias de plantas. Es capaz de provocar una infección sistémica en la mayoría de las plantas hospederas, que en muchos casos puede permanecer asintomática (Mauck et al., 2010). Los síntomas provocados por el virus dependen de la dinámica de interacción entre el cultivo infectado, las condiciones ambientales a las que se encuentra expuesto y la edad de la planta (Zitter & Murphy, 2009). Su mecánica de infección se ha descrito principalmente en hojas de melón (*Cucumis melo*) y pepino (*Cucumis sativus*), en las que se presentan síntomas típicos de mosaico, caracterizados por la aparición de pequeñas manchas en las hojas y tallos; además se produce un retraso en el crecimiento de las plantas y una acentuada reducción en el número y calidad de frutos.

En algunos cultivares de pepino, se observa un marchitamiento rápido y completo en plantas adultas, pocos días después de la infección por CMV (Kaplan et al., 1997; Mauck et al., 2010). El calabacín (*Cucurbita pepo*), es una de las especies más afectadas, puesto que los síntomas son muy severos e incluyen mosaicos, manchas amarillas y distorsiones de las hojas (Yardimci et al., 2015). En especies como la sandía (*Citrullus lanatus*), se presentan efectos adversos considerables, como lesiones necróticas oscuras, que provocan el daño del fruto (Li et al., 2017).

En ciertas especies, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), al ser infectadas en una etapa temprana, se presentan lesiones locales cloróticas entre la vena secundaria de la hoja; además se presenta una necrosis que avanza hacia la parte inferior de la planta, primero en forma de áreas de hojas marrones y luego como líneas

marrones a lo largo de los pecíolos y tallos. Las plantas infectadas en una etapa madura normalmente muestran reducción del crecimiento, apariencia tupida y deformación de las hojas (Lecoq & Desbiez, 2012; Caciagli, 2008; Mahjabeen et al., 2012). Las infecciones por CMV se han podido controlar hasta cierto punto, mediante la implementación de variedades transgénicas, que toman información genética de plantas naturalmente resistentes; sin embargo debido a la creciente diversidad del virus, es posible que este supere al fenotipo de resistencia (García-Arenal & Palukaitis, 2008), por cual aún no se define una estrategia de control eficaz para CMV.

### ***Impacto en el sector agrícola del Ecuador***

Dentro de Ecuador, los efectos de CMV han tenido principal afectación a cultivos de banano, melón, sandía, tomate, pepino (Bonilla, 2009; Buitrón-Bustamante & Morillo-Velastegui, 2017; Macías, 2018; Paredes, 2011; Silva, 2015; Soler et al., 2005).

El impacto del CMV en el sector agrícola consiste también en la potencial amenaza a ciertos monocultivos de importancia en el Ecuador, puesto que su incidencia limita la multiplicación e intercambio de germoplasma, lo que conlleva finalmente al deterioro de la calidad del cultivo en las zonas productoras (James, 2011; Onofre et al., 2018).

Dentro del sector bananero a nivel nacional, se ha reportado una amplia diseminación del virus, principalmente en las provincias de Guayas, Los Ríos, El Oro y Manabí, representando en ocasiones una amenaza grave para el cultivo (Velastegui et al., 2008). El efecto que tiene CMV sobre las plantas de Banano, dependen de la cepa patogénica y condiciones ambientales; van en un rango variable, desde una clorosis aguda a rayas cloróticas severas en la lámina de la hoja (Lepcha et al., 2017). En las plantas infectadas ocasionalmente se observan deformaciones y rizos de las hojas; se ha reportado que generalmente, los síntomas son más severos cuando las

temperaturas caen por debajo de los 24 ° C, presentándose necrosis de las hojas emergentes y los tejidos internos del pseudotallo (Tripathi et al., 2016). Las frutas pueden mostrar síntomas de mosaico y los racimos pueden dar frutos malformados o no dar frutos. La muerte de la planta puede ocurrir en casos muy severos, especialmente cuando las plantas se infectan con una cepa severa poco después de la siembra (Vishnoi et al., 2013).

Una estrategia de gran eficiencia para el control de virus, es el uso de variedades vegetales resistentes a virus. Los genotipos resistentes contienen genes que suprimen la multiplicación y propagación de un específico virus, incluso en condiciones ambientales que favorecen la infección (Kavanagh & Spillane, 1995). Se ha logrado transformar una amplia gama de especies vegetales con los genes de las proteínas de la cubierta de muchos virus, como una estrategia de vacuna, para obtener protección contra los patógenos (Ming & Moore, 2014). La desventaja de estas estrategias, es que se requiere de un amplio conocimiento de la dinámica viral, su ecología e interacción con vectores, para desarrollar e implementar modelos de predicción que sean confiables y permitan garantizar una intervención libre de efectos adversos. La intervención se puede realizar utilizando métodos químicos o biológicos, particularmente en la producción de invernadero (Buttner et al., 2015).

## **Síntesis de Nanopartículas**

### ***Estrategias de Síntesis***

Las nanopartículas son materiales de dimensiones nanoscópicas, dentro de un rango de 1 a 100 nm. Debido a su tamaño, adoptan propiedades fisicoquímicas excepcionales que incluyen una gran superficie específica en relación a su volumen, alta energía de excitación e internamiento cuántico (Monica & Cremonini, 2009). Las NP pueden ser metálicas o compuestas de óxido metálico, silicatos, polímeros, compuestos

orgánicos o carbono; además presentan diferentes morfologías como esferas, cilindros, láminas o tubos, que depende del tipo de medio a partir del cual se crean (Aromal & Philip, 2012). Las nanopartículas metálicas se pueden generar a través de varias rutas compuestas por estrategias físicas, químicas y biológicas, que comparten dos rutas de síntesis, top-down y bottom-up (Iravani et al., 2014).

El enfoque de top-down, implica procesos en los que las nanopartículas se generan mediante la reducción de tamaño, a través de técnicas como trituración, pulverización catódica y molienda (Meyers et al., 2006). En el enfoque bottom-up, las nanopartículas se generan a partir de átomos o moléculas, que se ensamblan formando un corpúsculo, que luego se transforma en una partícula de dimensiones nanométricas (Thakkar et al., 2010). Entre las estrategias físicas, químicas y biológicas, se ha preferido la última por la evidencia de un menor grado de toxicidad que produce en el medio ambiente (Fakhari et al., 2019).

### ***Síntesis biológica mediante el uso de bacterias y otros microorganismos***

Las rutas de síntesis biológica han adquirido una mayor importancia frente a los métodos de síntesis física y química, para la generación de NP. El método de síntesis biológica implica el uso de bacterias, hongos, algas y plantas (Pal et al., 2019). Para llevar a cabo un protocolo de síntesis verde, se requiere de una solución de iones metálicos y un agente biológico reductor. Los agentes reductores, grupos funcionales, proteínas, y otros constituyentes y metabolitos de las células, actúan como agentes estabilizantes y de protección. Dichos agentes permiten simplificar la síntesis en comparación con los métodos físicos o químicos (Anil Kumar et al., 2007). Se han sintetizado NP de Ag, Au, Zn, Si, utilizando diferentes organismos pertenecientes a cuatro de los cinco reinos de organismos vivos; monera, protista, hongos y plantas (Mohanpuria et al., 2008). Sin embargo, la síntesis basada en microorganismos

presenta varias desventajas, entre ellas: un proceso lento, problemas de patogenicidad y mantenimiento de cultivos a gran escala, por lo que se ha preferido el uso de precursores vegetales (Korbekandi et al., 2009).

### ***Síntesis verde en base a agentes reductores de plantas***

Los nanomateriales sintetizados a partir de agentes reductores de plantas son considerados como más amigables con el medio ambiente. Se sintetizan en proceso de un solo paso, con mayor estabilidad, propiedades y dimensiones notables; el aprovechamiento de estas estrategias elimina la necesidad de alta temperatura, presión, pH y otras condiciones generadoras de contaminación (Ingale & Chaudhari, 2013).

Se han sintetizado NP de Ag, Au, Zn, Pd y Fe usando agentes reductores de plantas (Pal et al., 2019). Los fitocompuestos presentes en los extractos de plantas, especialmente polifenoles, terpenoides y polioles, han servido como agentes reductores de iones metálicos, y su uso ha potenciado las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y catalíticas derivadas de los fitocompuestos (Savithamma et al., 2011). Estas propiedades, dadas por la adsorción de grupos funcionales y otras moléculas a la superficie de las NP, han potenciado su aplicación para la administración de fármacos, la industria de las enzimas, los cosméticos, la industria alimentaria y productos fitosanitarios (Singh et al., 2018). También se ha demostrado un menor grado de toxicidad para ciertas especies vegetales y animales, y su grado de estabilidad se considera aceptable (Hamed & Elsharkawy, 2019).

### ***Estabilidad y toxicidad de las nanopartículas***

La estabilidad de las NP en el medio ambiente puede evaluarse estimando su propensión a agregarse o interactuar con los medios circundantes. La agregación es un fenómeno dependiente de la carga electrostática de cada NP y la tasa de colisión entre

NP (Fatehah et al., 2014). Se ha determinado que la estabilidad de la suspensión está determinada en gran medida por el tamaño de las partículas y la afinidad hacia otros constituyentes ambientales (Pal et al., 2019). El uso de agentes estabilizadores biocompatibles, como polímeros y copolímeros biodegradables, pueden impartir una estabilidad notable, como se ha demostrado en la síntesis de NP de oro cubiertas con raíz de ginseng rojo coreano (Aromal & Philip, 2012).

La transformación de NP es una propiedad esencial para evaluar su impacto ambiental o toxicidad. Como ejemplo, en NP de Ag, la sulfuración es capaz de reducir la toxicidad debido a la menor solubilidad del sulfuro de plata (Yang et al., 2015). Las principales características estructurales que determinan la toxicidad de los nanomateriales son el tamaño, la forma y la composición de los nanomateriales (Yu et al., 2014). Se especula que el grado de toxicidad puede influir en la activación de mecanismos inmunitarios en la planta. Al inducir un ligero estrés, la planta activa su sistema inmunitario y puede incrementar su eficiencia en la lucha contra un patógeno (Cai et al., 2019),

### **Aplicación de nanopartículas de Zinc como tratamiento antiviral en plantas**

El uso NP para tratar enfermedades de las plantas y prevenir la infección con una amplia gama de patógenos se ha ido incrementado debido las múltiples evidencias que demuestran su efectividad (Bandeira et al., 2020). Sin embargo, la liberación inadecuada de las NP ha aumentado la probabilidad de generar contaminación al medio ambiente, produciendo efectos tóxicos potenciales. A pesar de los numerosos beneficios de las NP, muchos estudios toxicológicos han demostrado que las NP tienen efectos tóxicos para la salud de las plantas, animales y microorganismos y también presentan riesgos ambientales (Ma et al., 2015).

Las NP pueden interactuar directamente con proteínas, enzimas, ADN y otras macromoléculas en la célula. Se sabe que la exposición a NP conduce a una producción excesiva de ROS, función mitocondrial alterada, alteración de la homeostasis redox, peroxidación lipídica y daño a la membrana en diversas especies vegetales y animales (Sharma et al., 2012; Von Moos & Slaveykova, 2014). Tanto la disminución, como el aumento de las actividades de enzimas antioxidantes, han sido reportadas en plantas estresadas por NP, lo que sugiere que el grado y el tipo de respuesta varía según la especie de planta, tejidos, y el tipo, intensidad y duración del tratamiento con NP (Kim et al., 2012; Mukherjee et al., 2014).

A la dosis apropiada, las NP tienen un potencial extremadamente pronunciado para inhibir la infección por patógenos y promover el crecimiento de las plantas. Sin embargo, sus mecanismos de acción son en gran medida ambiguos, especialmente los relacionados con el control de virus de plantas (Elmer & White, 2018; Hao et al., 2018; Kumaraswamy et al., 2018). Las NP, particularmente las NP metálicas, tienen un fuerte potencial antiviral debido a sus interacciones con las glicoproteínas de la envoltura viral y los receptores de glicoproteína; y se están adoptando cada vez más para tratar virus humanos, como la estomatitis vesicular, el herpes simple y el virus sincitial respiratorio (Farouk & Ibrahim, 2018; Zeedan et al., 2020). La efectividad de las NP puede estar directamente relacionada con su acción antiviral y su capacidad para activar mecanismos de defensa en las plantas. La aplicación foliar de NP es la forma más efectiva de colocarlas en contacto directo y rápido con el virus de la planta e inducir resistencia contra el patógeno (Elsharkawy et al., 2013; Yang et al., 2016).

Entre la gran cantidad de tipos de NP, las nanopartículas de zinc, que al ser obtenidas por síntesis verdes se componen de óxido de zinc (ZnONP) y las nanopartículas de sílice (SiO<sub>2</sub>NP), han recibido considerable atención debido a sus

ventajas de no ser tóxicas, tener una buena biocompatibilidad con células humanas y ser fáciles de obtener (Sirelkhatim et al., 2015). Estudios de tratamientos con ZnONPs a una concentración de 100 µg/mL, en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con TMV, muestran que al aplicar las NP se da un aumento en los niveles de expresión de los genes PR1 y PR2, relacionados con la ruta de ácido salicílico (Cai et al., 2019). Estos genes se pueden expresar como proteínas para bloquear los plasmodesmos y prevenir aún más la replicación y distribución viral dentro de la planta. La eficacia de acción se debe a un efecto sinérgico en la interferencia de virus y la activación de los mecanismos de resistencia de la planta (Hily et al., 2014).

### ***Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en biología**

#### ***Caracterización de Arabidopsis thaliana.***

*A. thaliana* es una especie semiperenne anual con dos períodos de desarrollo distintos: el período de crecimiento vegetativo, que produce una roseta de hojas, y el período reproductivo en el que crece la inflorescencia, se producen nuevas flores continuamente y las flores más viejas se convierten en silicuas (Ausín et al., 2005). Es un organismo modelo popular en biología y genética de plantas, por ser la primera especie vegetal en tener su genoma secuenciado y presentar un ciclo de vida relativamente corto, de hasta 60 días (Boyes et al., 2001). Posee un genoma relativamente pequeño de aproximadamente 135 mega pares de bases (Mbp), y es una herramienta popular para comprender la biología molecular de muchos rasgos de la planta, incluido el desarrollo de flores y la detección de luz (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). La importancia de *A. thaliana* también se evidencia en el nicho, que como especie ocupa en su entorno natural. Debido a su rápida floración, autofecundación y amplia producción de semillas, es una especie colonizadora que

naturalmente se encuentra como maleza en diversas regiones con todo tipo de clima (Pigliucci, 2002).

### ***Importancia de los transportadores de Zinc en A. thaliana***

Ante la ocurrencia de infecciones virales, existe una respuesta por parte de la planta en la modulación de las señales de Zn y en la regulación de su transporte. Los efectos que puede causar la desregulación del Zn incluyen eventos celulares como migración, proliferación y apoptosis (Hara et al., 2017). La deficiencia de Zn provoca un desequilibrio de la respuesta inmunitaria de la planta y la hace más susceptible a los efectos adversos del patógeno (Sapkota & Knoell, 2018). Las plantas pueden detectar la escasez de suministro de Zn y ajustar su homeostasis en consecuencia, con la activación de genes pertenecientes a las familias Zip y ZnT. Cada gen transportador de Zn se expresa en una o más capas específicas de células de la raíz, cuya ubicación difiere en función de la parte de la raíz. En *A. thaliana* se ha identificado los marcadores genéticos no convencionales, subyacentes a la respuesta de deficiencia de Zn. Se ha identificado un grupo de cinco genes dispuestos en tándem, que codifican proteínas vegetales isopreniladas asociadas con metales pesados, que funcionan como reguladores negativos del crecimiento de las plantas inducidos por la deficiencia de Zn y Fe (Ochoa-Tufiño, 2018).

### Capítulo III: Revisión Metodológica

#### Protocolo para síntesis verde de nanopartículas de Zinc

La síntesis verde de nanopartículas parte de la obtención del extracto vegetal de una sección específica de la planta, generalmente la hoja. La sección seleccionada se somete a un proceso de decocción, a una temperatura de 100°C, por un tiempo superior a una hora. El extracto obtenido contiene los agentes reductores y protectores, que se encargan de la reducción de los iones metálicos, y que permiten la síntesis de las NP. Se recomienda utilizar extractos obtenidos de las plantas listadas en el Anexo 1, puesto que se ha tenido éxito en la síntesis de ZnONP y se ha comprobado su presencia en el país, tras hacer una revisión en el Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador (Jørgensen & León-Yáñez, 1999) y en el Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador (León-Yáñez et al., 2011).

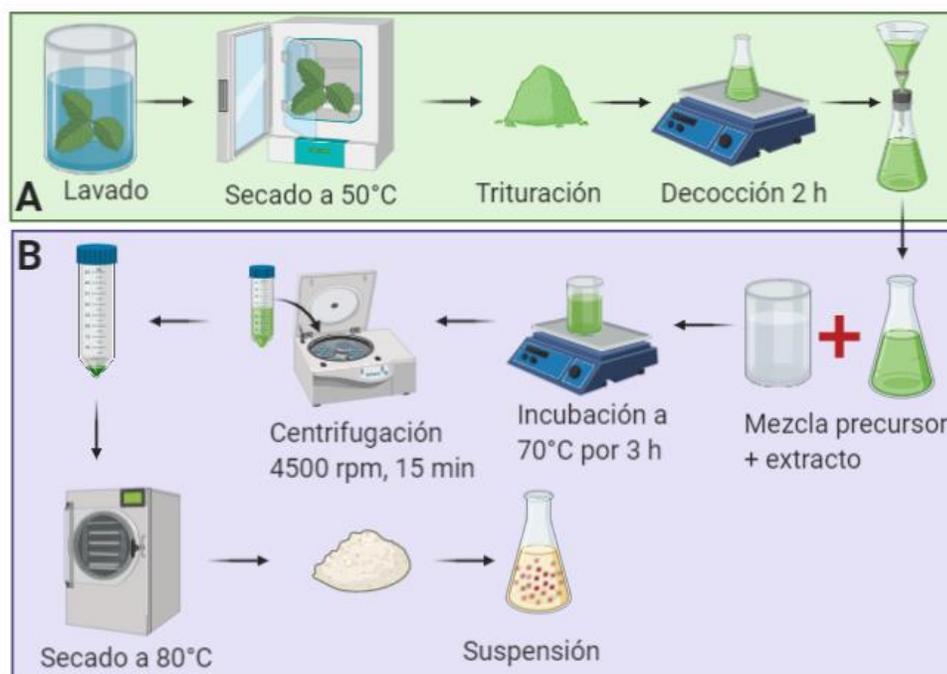
Con base en a la revisión de los protocolos descritos en los estudios listados dentro del Anexo 1, se ha notado que para la síntesis de ZnONP se usan dos principales estrategias, basadas en el método de coprecipitación. La primera consiste en la incubación del extracto vegetal con una sal de Zinc, como precursor, durante 3 horas en promedio, a 70°C. La segunda estrategia sigue el mismo procedimiento pero adicionalmente se agrega NaOH, gota a gota, con el objetivo de ajustar el pH para maximizar el rendimiento de la síntesis en caso de que no se tengan óptimos resultados con la primera estrategia. El protocolo que se recomienda utilizar se elaboró en base a los estudios listados en el Anexo 1. El procedimiento se divide en las fases de extracción vegetal y síntesis por coprecipitación. El esquema general de este protocolo se presenta en la figura 1.

### Extracción vegetal

1. Las hojas son sumergidas en agua corriente hasta quedar libres de polvo y partículas contaminantes visibles; luego son sumergidas en agua desionizada para eliminar impurezas restantes.
2. Se continúa con una fase de secado, en la que las hojas se colocan en un horno a 50 °C durante dos días.
3. Se pesa 50 gramos de hojas y se trituran con el uso de un mortero o molino hasta que se tenga un fino polvo.
4. Las hojas trituradas se colocan en 100 mL de agua desionizada, que se calienta hasta 100°C y se deja en cocción durante 2 horas. Posteriormente se filtra el contenido con papel filtro de retención media, como el Whatman® Número 1, que tiene un tamaño de poro de 11µm.

**Figura 1**

*Esquema de síntesis verde de NP*



*Nota.* A: fase de extracción vegetal. B: fase de síntesis por co-precipitación.

### ***Síntesis por co-precipitación***

1. Se preparan soluciones precursoras con Nitrato o Acetato de Zinc, de grado analítico, en concentraciones de 1 M.
2. La solución precursora se mezcla con el extracto, en función de la concentración óptima, añadiéndola gota a gota y en constante agitación.
3. La mezcla es incubada a 60°C por 3 horas
4. Tras la incubación se forma un producto sólido, que se recupera por centrifugación a 4500 rpm, durante 15 minutos.
5. El pellet se lava tres veces con agua destilada.
6. El pellet se calcina a más de 700°C por 1 horas y el polvo resultante corresponde a las ZnONP, que pueden ser suspendidas en agua destilada para su caracterización y uso.

Siguiendo la segunda estrategia de síntesis, se propone un protocolo alternativo para síntesis por coprecipitación, con el uso de NaOH.

1. Se prepara una solución precursora con Nitrato o Acetato de Zinc, de grado analítico, en concentraciones de 1 M.
2. Se prepara una solución de NaOH 1 M.
3. La solución precursora se mezcla con el extracto, en función de la concentración óptima, añadiéndola gota a gota y en constante agitación.
4. A la mezcla se le añade la solución de NaOH, gota a gota, para llegar a una concentración 0.1M en relación al volumen de la mezcla. El pH debe encontrarse entre 10 y 12.
5. La mezcla es incubada a 60°C por 2 horas
6. Tras la incubación se forma un producto sólido, que se recupera por centrifugación a 4500 rpm, durante 15 minutos.

7. El pellet se calcina a más de 700°C por 1 hora y el polvo resultante corresponde a las ZnONP, que pueden ser suspendidas en agua destilada para su caracterización y uso.

La concentración de la sal de zinc en relación al extracto vegetal, depende del precursor vegetal que se utilice. Para las especies vegetales listadas en el Anexo 1, ya se ha definido una concentración óptima para la síntesis. Sin embargo se recomienda hacer un ensayo de estandarización de la concentración, con el objetivo de obtener el mayor rendimiento de ZnONP, considerando también que presenten un diámetro promedio superior a 50 nm.

### ***Ensayo de estandarización de concentración***

Para el ensayo de estandarización se prueban 3 concentraciones para síntesis, a 0.5 M, 0.3 M y 0.1 M, considerando como soluto al Acetato o Nitrato de Zinc y disolvente al extracto vegetal. Para cada concentración se sintetizan tres réplicas. Los resultados se evalúan en función de los análisis de caracterización descritos posteriormente. También se evalúa el porcentaje de rendimiento de ZnONP, que se calcula con la fórmula 1 (Bala et al., 2014).

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Masa real de ZnNP}}{\text{Masa teórica de ZnNP}} \cdot 100 \quad (1)$$

La masa real de las ZnONP se obtiene pesando el polvo resultante de la síntesis, en una balanza analítica. La masa teórica se obtiene calculando la masa de ZnO que se tiene en la solución según su molaridad.

### **Caracterización de nanopartículas de Zinc**

Las características físico-químicas de las nanopartículas se evalúan mediante espectroscopía de UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD). Esta serie de análisis se llevan a

cabo con el objetivo de predecir el comportamiento de las nanopartículas y garantizar su seguridad y eficacia (Zhang et al., 2016). Un resumen de las técnicas experimentales requeridas para la caracterización de ZnONP se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Técnicas experimentales para caracterización de ZnONP*

<b>Técnica</b>	<b>Información Obtenida</b>
UV-Vis	Pico de absorbancia, Estabilidad
TEM	Tamaño, Estructura
SEM	Morfología de la Superficie
FTIR	Composición, Grupos Funcionales
XRD	Estructura Cristalina

### ***UV-Vis***

El primer ensayo que se realiza es la caracterización primaria por UV-Vis, puesto que permite evidenciar la formación de las ZnONP, según el pico de resonancia de plasmones superficiales (SPR). El SPR es un indicador dependiente del tamaño, forma, cristalinidad y naturaleza química de las NP. El SPR viene dado por la interacción entre los átomos de la superficie de las NP con los átomos del interior, que produce ondas electromagnéticas características para cada tipo de NP y que se evidencia por el máximo de absorción en el espectro, que para el caso de las ZnONP se encuentra entre 289 a 385 nm. Además se utiliza para evaluar la estabilidad de las NP sintetizadas, haciendo una medición periódicamente y comprobando que el SPR se mantiene inalterado (Akintelu & Folorunso, 2020).

El protocolo a seguir es el siguiente, diseñado en base a los estudios de (Ahmed et al., 2017; Amaguaña, 2018; Jamdagni et al., 2018; Rahaiee et al., 2020):

1. El nanopolvo resultante de la síntesis se resuspende en un volumen equivalente de agua desionizada estéril. Se requiere formar una suspensión homogénea, para lo cual se sugiere someter a sonicación la mezcla durante 5 minutos.
2. La solución resultante se coloca en cubetas de cuarzo y se realiza el escaneo en un Espectrofotómetro UV-Vis, usando agua desionizada estéril como blanco.
3. El ensayo de UV-Vis se realiza haciendo un barrido en el rango de 200 a 500 nm, con resolución de 1 nm.
4. La absorción se calcula con la fórmula (2), en base a la transmitancia T, y se expresa en unidades de absorbancia.

$$A = 2 - \log(\%T) \quad au \quad (2)$$

5. Los valores de absorción son graficados con el uso de softwares como OriginPro8.
6. Para determinar la estabilidad de las ZnONP, se mide el SPR en los períodos de 1, 24, 48, 72, 144 y 336 horas después de la síntesis.

### ***Microscopía electrónica de transmisión (TEM)***

La aplicación de TEM se basa en la formación de una imagen por la interacción de la muestra de NP con un haz de electrones que pueden ser transmitidos o dispersados. La imagen es magnificada y su resolución es mejorada por la serie de filtros con los que cuenta el microscopio (Goodhew et al., 2001). El uso de TEM permite determinar las propiedades morfológicas de las NP, especialmente la forma y la distribución de tamaños de las NP (Hondow et al., 2012).

El protocolo a seguir para el análisis de TEM es el siguiente, sugerido en base a los estudios de (Ifeanyichukwu et al., 2020; Tailor et al., 2019a; Woehrlé et al., 2006).

1. Para el análisis, se prepara la muestra haciendo una solución de NP con metanol en una proporción 1:2 m/v. La mezcla se homogeneiza mediante sonicación.

2. Se deposita una gota de solución coloide (50-100  $\mu\text{L}$ ) en una malla número 400 recubierta con carbón amorfo y se evapora el solvente a temperatura ambiente.
3. El ensayo se realiza con un voltaje de aceleración de 20-200 kV, con lentes de 70  $\mu\text{m}$  y una resolución de punto a punto de 2.0  $\text{\AA}$ .
4. Se toman imágenes de la muestra a tres ampliaciones: 100, 430 y 580 K.
5. Las imágenes obtenidas con TEM se analizan con el software NIH-ImageJ®, para la determinación estadística del tamaño de partícula.

### ***Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

La evaluación por SEM permite estudiar la morfología microestructural de las NP. Esta técnica de microscopía utiliza un haz de electrones de alta energía que al interactuar con la superficie de las NP, genera una variedad de señales que son captadas por los sensores y permite obtener información sobre la morfología externa, composición química, estructura cristalina y orientación de los materiales (Zhou & Wang, 2007). El protocolo a seguir para la observación por SEM es el siguiente basado en los estudios de (Hodoroaba & Rades, S, 2016; Mahamuni et al., 2019; Naseer et al., 2020; Tailor et al., 2019b; Vishwakarma, 2013).

1. Las ZnONP son suspendidas en metanol a una concentración de 1mg/20mL.
2. Una gota (50  $\mu\text{L}$ ) de la solución acuosa se coloca en una malla recubierta con carbón y se seca con una lámpara de mercurio durante un tiempo aproximado de 5 minutos. La malla con la solución se recubre con materiales conductores como platino, oro, o aleación oro-paladio, que facilitan la toma de imágenes mediante SEM.
3. Se ubica la muestra en el microscopio electrónico de barrido y se realizan las mediciones morfológicas en un rango de 0.1 nm a 10000 nm, con un haz de energía de 30 keV a 50 eV y una resolución de 1-1.4 nm a 1kV.

4. Para la obtención de las imágenes se enfoca en un punto donde se observa una aglomeración de puntos blancos brillantes, correspondientes a las ZnONP. La muestra es analizada a diferentes niveles de resolución y magnificación que permitan determinar la forma y tamaño de las ZnONP.
5. Los datos son analizados con el software Origin o similares.

### ***Difracción de Rayos X (XRD)***

El ensayo de XRD se realiza con el objetivo de conocer la naturaleza cristalina de las NP, la morfología de su superficie y la pureza de la muestra. La información obtenida por XRD complementa a las imágenes de SEM y TEM, permitiendo hacer una correlación con los datos de microscopía para determinar si las observaciones realizadas en un número limitado de partículas, son representativas de toda la muestra (Holder & Schaak, 2019). El protocolo para el ensayo de XRD se establece en base a los estudios de (Kiran Kumar et al., 2019; Mahamuni et al., 2019; Naseer et al., 2020; Ogunyemi et al., 2019; Talam et al., 2012).

1. Se deposita las ZnONP en polvo sobre un portaobjetos de acrílico o vidrio. Se aplica una pequeña cantidad de propanol (100 $\mu$ L) sobre el portaobjetos y se deja secar, con el objetivo de fijar la muestra.
2. El portaobjetos se coloca en el difractómetro de rayos X.
3. El ensayo se realiza con un detector a un voltaje de 40 kV, una densidad de corriente de 30 a 40 mA, con radiación  $\text{CuK}\alpha$ .
4. El escaneo se hace dentro de un rango de valor  $2\theta$  de  $10^\circ$  a  $90^\circ$  con una velocidad de escaneo de  $6^\circ/\text{min}$  a  $8^\circ/\text{min}$ .
5. El tamaño de las partículas se obtiene con la fórmula (3) de Debye-Scherrer, que representa cuantitativamente la ampliación de un pico en un ángulo de difracción particular.

$$Dp = \frac{\kappa \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (3)$$

Donde:

$Dp$ : tamaño del dominio cristalino

$\kappa$ : Constante de Scherrer, con un valor típico de 0.9.

$\lambda$ : Longitud de onda de los rayos X, que para  $Cu\alpha$  es 1.5406 Å.

$\beta$ : Ancho del pico a la mitad de su altura

$\theta$ : Ángulo de difracción en radianes

### ***Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)***

El análisis de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se realiza para la detección de los grupos funcionales encontrados en la superficie de las NP, lo cual permite identificar los diversos constituyentes fitoquímicos involucrados en la reducción y estabilización de las NP (Abraham et al., 2020). El siguiente protocolo se formuló en base a los estudios de (Barzinjy & Azeez, 2020; Campos Tapia, 2013; Northern Illinois University, 2007).

1. Se inicia con la preparación de la muestra, para lo cual las ZnONP son dispersadas en Bromuro de Potasio (KBr), en una proporción de 1 a 2%  $m(\text{ZnONP})/m(\text{KBr})$ .
2. La mezcla se somete a liofilización durante 12 horas, para posteriormente moler el liofilizado y el polvo resultante es comprimido hasta formar un disco traslúcido.
3. El disco se coloca en un espectrofotómetro de FTIR, con KBr como blanco. Se obtiene la transmitancia con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ , en un rango de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .
4. Las imágenes son analizadas con el software OMNIC® o similares.

### **Establecimiento de cultivos de *A. thaliana***

Se comienza por preparar el sustrato, para lo cual se hace una mezcla de turba comercial con arena de río en una proporción 5:12, respectivamente. Es recomendable que la arena de río contenga pequeñas piedras que le otorguen porosidad al suelo. El proceso de preparación del sustrato sigue los siguientes pasos:

1. La arena de río se lava 5 veces con agua corriente. Para el lavado se requiere de una bandeja y un cernidero. En el primer lavado se coloca la arena en el cernidero y se hace pasar agua para que la arena fina caiga en la bandeja. Al mismo tiempo se friega la arena en el cernidero, tratando de separar piedras u objetos de gran tamaño y las piedras de menor tamaño se colocan en la bandeja. Después de realizar este proceso se deja reposar la arena que se encuentra en la bandeja durante 30 minutos, y se desecha el agua sobrenadante. Para los siguientes lavados, se vierte agua en la bandeja con arena hasta llenarla unos  $\frac{3}{4}$  de su capacidad; se revuelve la mezcla durante 10 minutos y se deja reposar durante 30 minutos para posteriormente eliminar el agua sobrenadante.
2. Se hacen dos lavados adicionales con agua destilada, como se describe previamente.
3. La arena lavada se deja secar por un día a temperatura ambiente.
4. Cuando la arena se encuentra libre de humedad, se la mezcla con turba en la proporción mencionada previamente.
5. La mezcla se coloca en una funda plástica resistente a autoclave; se recubre con una funda adicional por seguridad y se lleva a autoclave durante 15 min a 121°C y 1 atm.

6. La mezcla se deja enfriar y se encuentra lista para ser utilizada en el proceso de siembra.

Previo a la siembra, primero se deben preparar vasos de 2 onzas con el sustrato. Se inicia por hacer 6 huecos en la base de los vasos y luego se llenan con la mezcla de tierra. Se etiquetan los vasos en la parte lateral y se colocan en una bandeja. Se vierte agua destilada hasta cubrir la base de los vasos. Para el proceso de siembra, se sigue el siguiente protocolo.

1. Las semillas de *A. thaliana* se dispersan en una caja Petri desinfectada con alcohol.
2. Se toma cada semilla con un palillo de dientes o aguja de siembra y se colocan en el sustrato, disponiéndolas de forma circular desde la parte externa hacia la interna. Es recomendable colocar 6 semillas por vaso.
3. Los vasos se recubren con film plástico, tomando en cuenta que el film no esté en contacto con el sustrato, puesto que las semillas se pueden pegar al film.
4. Se recubre la bandeja con papel aluminio y se la deja en refrigeración a 4°C durante 4 días.
5. La bandeja se saca de refrigeración, se vuelve a llenar con agua destilada y se la lleva a la cámara de crecimiento, que tiene una temperatura de 21-23°C y un fotoperíodo de 8 horas luz, 16 horas oscuridad.
6. Después de 3 días, cuando se empieza a evidenciar que hay germinación, se retira el film plástico que recubre los vasos. Se riega las plantas en crecimiento cada dos días, alternando entre agua destilada y solución Hoagland.

### **Análisis de citotoxicidad de las nanopartículas en *A. thaliana***

Antes de evaluar el efecto antiviral de las ZnONP en *A. thaliana*, es pertinente considerar que las ZnONP pueden ejercer citotoxicidad en las plantas, llegando incluso

a provocar su muerte. Se ha determinado que la toxicidad ejercida por las NP sobre las plantas, se da principalmente por la concentración y tamaño de las NP. Es por ello que, como primer ensayo, se debe evaluar el grado de toxicidad que puedan ejercer las ZnONP en *A. thaliana*, por lo que se propone realizar un análisis de viabilidad celular, un ensayo cometa y la evaluación de los efectos fisiológicos producidos en la planta. Para este ensayo las plantas se someten a concentraciones de ZnONP de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ , como se ha sugerido en estudios previos (Demir et al., 2013; Wang et al., 2016). En base a las conclusiones establecidas por (Hou et al., 2018; Wang et al., 2016), las ZnONP a utilizarse en este ensayo deben tener un tamaño promedio superior a 50 nm. Para este ensayo se considera como unidad experimental a cada planta de *A. thaliana*. Cada tratamiento se aplica en triplicado. El diseño experimental propuesto para este ensayo se esquematiza en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Diseño experimental para la evaluación de citotoxicidad en A. thaliana*

Unidad Experimental	Concentración				
	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	Control (+)	Control (-)
Plantas de <i>A. thaliana</i>	3 plantas	3 plantas	3 plantas	3 plantas	3 plantas

Se utiliza agua destilada como control negativo y Metanosulfonato de etilo (EMS) como control positivo. Las plantas se hacen crecer hasta una edad de 4 semanas, es ahí cuando se empieza a hacer los tratamientos, aplicando 50 mL de las suspensiones y controles cada 2 días, por 18 días (Lee et al., 2010).

La evaluación estadística para los resultados de cada parámetro de toxicidad, se realiza mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

### **Viabilidad celular**

El análisis de viabilidad celular se realiza mediante una prueba basada en tinción fluorescente. Se utiliza el kit para ensayo de viabilidad celular en planta, disponible de la marca Sigma™. Este kit emplea una metodología de tinción diferencial utilizando Diacetato de Fluoresceína (DAF) y Yoduro de propidio (PI). Se puede distinguir a las células viables y no viables según su coloración verde o naranja respectivamente, mediante observación en microscopio de fluorescencia. El procedimiento se sigue como se establece en el manual del kit.

1. Se prepara la solución de tinción 10X mezclando 1  $\mu\text{L}$  de DAF y 1  $\mu\text{L}$  de PI con 98  $\mu\text{L}$  de agua o PBS de pH 7.4
2. Se recolecta las hojas de las plantas y se sumergen completamente en la solución de tinción diluida a 1X.
3. Las muestras son incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Los tejidos teñidos se colocan en un portaobjetos y son observados en un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro FITC para DAF y un filtro TRITC para PI (Jones & Senft, 1985). La longitud de onda que se utiliza para la excitación de DAF es 488nm y para PI 543 nm, mientras que la emisión es 505-530 nm y 585 nm, respectivamente (Demir et al., 2013; Koyama et al., 2001).
5. La viabilidad celular se estima mediante la comparación del número de células viables, con fluorescencia verde, y no viables, con fluorescencia roja.

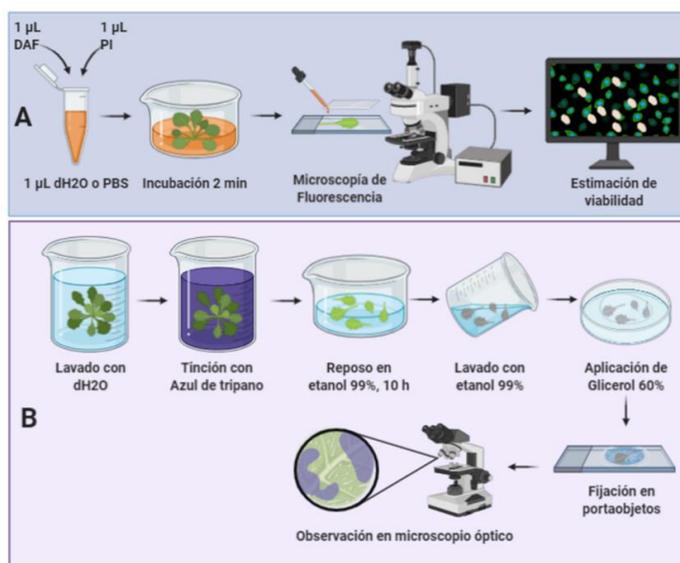
La estimación de viabilidad celular se puede hacer también con un método basado en Azul de tripano. A continuación se describe el protocolo establecido por (Fernández-Bautista et al., 2016), para la tinción de muestras provenientes de *A. thaliana*.

1. Se prepara el Azul de tripano, iniciando con una solución 1:1:1:1 de Ácido láctico (85% w/w), Fenol, Glicerol (99%) y Agua destilada. A esta mezcla se le añade Azul de Tripano a una concentración final de 10 mg/mL.

2. Se recolectan las hojas de la planta y se hace tres lavados con agua destilada.
3. Las hojas se sumergen en un volumen de Azul de tripano que las cubra completamente.
4. Se incuban a temperatura ambiente por una hora.
5. Las hojas se retiran de la solución y se sumergen en etanol al 99%. El recipiente que las contiene se cubre con parafilm y se deja reposar por 10 horas.
6. Tras haber dejado en reposo, las hojas se lavan con etanol hasta que se encuentren completamente libres de coloración verde.
7. Las hojas se cubren con glicerol al 60% y se transfieren a un portaobjetos para su visualización en microscopio óptico.
8. Para estimar la viabilidad celular se hace una comparación con el software Image J, del área teñida y no teñida, correspondiente a la porción no viable y viable, respectivamente.

## Figura 2

### *Estimación de viabilidad celular*



*Nota.* A: Técnica basada en tinción fluorescente. B: Tinción con azul de tripano. Gráfico creado en biorender.com.

### ***Ensayo cometa***

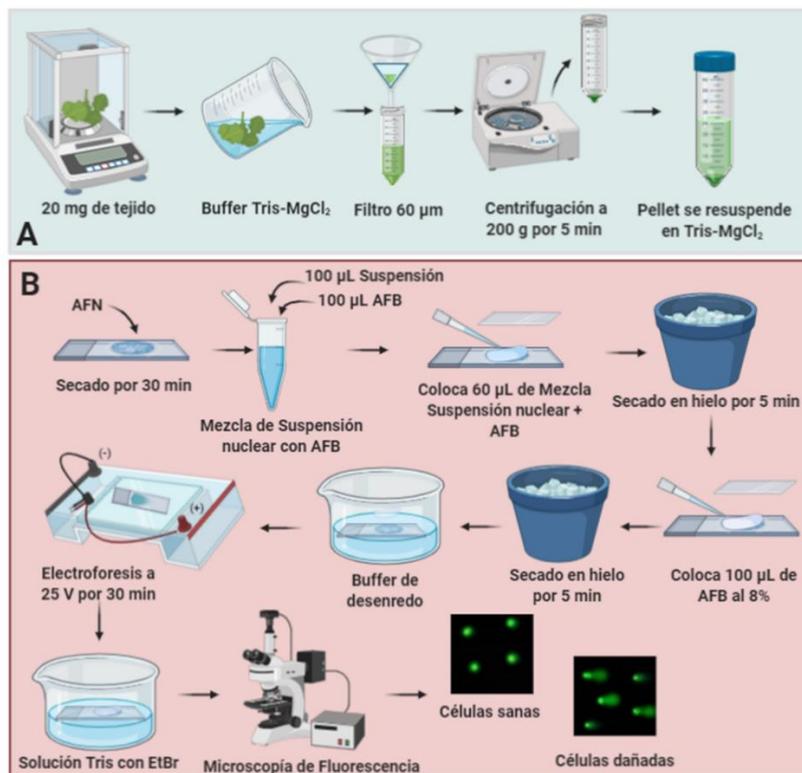
El ensayo cometa o electroforesis en gel de única célula, permite determinar el grado de afectación que presenta el ADN de una planta, al ser expuesta a materiales citotóxicos. Para el ensayo cometa se requiere aislar el núcleo de las células de los meristemas apicales de las raíces o de las hojas y se corre una electroforesis de cada núcleo. El grado de afectación se mide en base a la longitud de migración del ADN (Hou et al., 2018; Lee et al., 2010; Olive & Banáth, 2006). El protocolo a seguir se basa en los estudios de (Bilichak et al., 2014; Demir et al., 2013; Menke et al., 2001).

1. En 20 mg de tejido cortado finamente se coloca 1 mL de buffer Tris-MgCl<sub>2</sub>, compuesto por Tris 0.2 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 4 mM y Triton X-100 0.5% w/v.
2. Se mantiene el tejido sumergido en el buffer durante 30 minutos.
3. El buffer Tris-MgCl<sub>2</sub> se hace pasar a través de un filtro de 60 µm y posteriormente se centrifuga a 200 g por 5 minutos, en frío.
4. El pellet se resuspende en 200 µL de buffer Tris-MgCl<sub>2</sub>, obteniendo así la suspensión nuclear que se almacena a 4°C.
5. En un portaobjetos se coloca agarosa de fusión normal (AFN) al 1% y se deja secar a 60°C, hasta por 1 hora.
6. Se mezcla 100 µL de la suspensión nuclear con un volumen igual de agarosa de fusión baja (AFB) 1% a 42°C, disuelta en buffer fosfato salino (PBS).
7. Sobre la capa de AFN se coloca 60 µL de la suspensión nuclear con AFB y se coloca un cubreobjetos; se deja secar en hielo hasta que se solidifique la mezcla.
8. Se quita el cubreobjetos y se coloca 100 µL de AFB al 8% en PBS; se coloca nuevamente el cubreobjetos y se deja solidificar en hielo.
9. Nuevamente se quita el cubreobjetos y las placas se colocan en buffer de desenredo, compuesto por EDTA 5mM y NaOH 0.3 M, durante 10 minutos.

10. Las placas se llevan a una cámara de electroforesis con buffer Tris-Borato EDTA (TBE) 1X y se corre la electroforesis a 25 V, 300 mA, por 30 minutos. Como precaución el ensayo se realiza en frío y a luz baja para evitar el daño del ADN.
11. Al finalizar la electroforesis las placas se sumergen en una solución de Tris buffer, 400 mM, pH 7.5, con EtBr a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por 10 minutos. Este proceso se repite 3 veces con intervalos de 5 minutos.
12. El análisis de daño celular se realiza mediante procesamiento de imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia. Se determina la distancia de desplazamiento de ADN y se compara con el control para calcular el porcentaje de daño.

### Figura 3

#### Protocolo de ensayo cometa



*Nota.* A: Extracción de núcleos celulares. B: Preparación de láminas y electroforesis para observación de resultados. Gráfico creado en biorender.com.

### **Efectos fisiológicos**

Después de haber aplicado las NP por el tiempo establecido, para evaluar los efectos fisiológicos que se pudieron presentar en la planta, se evalúan tres indicadores de toxicidad: elongación de las raíces, número de hojas y porcentaje de supervivencia.

#### **Elongación de raíces.**

La medición de elongación de raíces se determina extrayendo las plantas del sustrato donde se desarrollaron. Se mide la longitud de la raíz primaria, desde el cuello hasta el final de la raíz, utilizando un pie de rey. El porcentaje de inhibición (3) se calcula como la diferencia entre la longitud promedio de las raíces del control negativo menos la longitud promedio de las la raíces de estudio, dividido para la longitud promedio de las raíces de control negativo (Lee et al., 2010).

$$\%Inhibición = \frac{L_{Raíz\ control} - L_{Raíz\ test}}{L_{Raíz\ control}} \quad (5)$$

#### **Número de hojas.**

Para cada planta se cuenta el número de hojas y se compara con las de los grupos control, positivo y negativo. Del conteo se realiza una prueba de t para establecer diferencias significativas entre los grupos control y test.

#### **Porcentaje de supervivencia.**

Se establece un porcentaje de supervivencia, indicando el número de hojas que evidencian marchitez y haciendo una comparación con el número de hojas sanas, de cada tratamiento.

### **Construcción de CMV recombinante para la expresión de GFP**

Se describe el proceso para la construcción de clones infecciosos de CMV que expresen GFP en su cápside, de modo que se pueda seguir la infección en *A. thaliana* mediante visualización por microscopia fluorescente. La construcción se realiza tomando en consideración a las tecnologías de Gibson Assembly y HiFi Assembly para

el ensamblaje. Para el diseño de los plásmidos se utilizan el software SnapGene®. Se considera el uso de las secuencias de CMV raza Fny (Fny-CMV), cuyos segmentos tienen los números de acceso de GenBank: NC\_002034, NC\_002035, NC\_001440, para ARN1, ARN2 y ARN3, respectivamente. En base a los estudios realizados por (Krenz et al., 2015), se propone hacer cinco constructos, en los que también se interviene el gen 2a de la ARN polimerasa dependiente de ARN, descritos en la tabla 3. La representación de cada constructo se muestra en la figura 4.

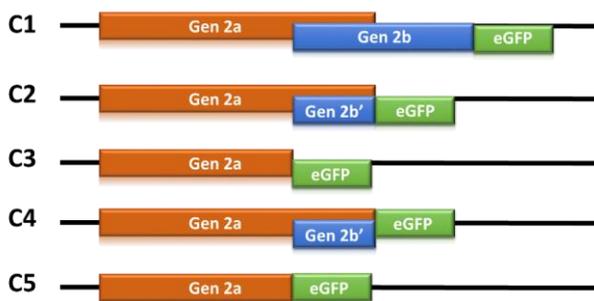
**Tabla 3**

*Constructos para la inserción de GFP*

Constructo	Descripción
C1	Sección 2b completa fusionada in-frame con GFP.
C2	GFP se coloca en la posición donde termina 2a, en fusión in-frame con la sección 2b truncada.
C3	GFP sustituye a la sección 2b, dejando a la sección 2a truncada. GFP se coloca en el ORF correspondiente a 2b.
C4	Sección 2a en su parte terminal fusionada in-frame con GFP. La sección 2b queda truncada manteniendo un tercio de su longitud.
C5	El ORF de GFP se coloca en la posición de C3, en fusión in-frame con la sección 2a.

**Figura 4**

*Esquemmatización de los constructos de ARN2 con eGFP*





Debido a que los segmentos de ARN, eGFP y el vector pGreen se encuentran dentro de *E. coli*, se requiere llevar a cabo un proceso de extracción de los plásmidos, para la obtención de cada una de las partes que servirán de base para el ensamblaje. Para la extracción de plásmidos se utiliza el kit de purificación de ADN plasmídico HQ Mini PureLink® de Invitrogen™. El proceso de extracción se realiza en base al siguiente protocolo.

1. Se inicia preparando el lisado bacteriano, para lo cual, en un tubo de microcentrifuga se coloca 3 mL de cultivo con OD 1.0, y se centrifuga a 1500 g por 15 minutos.
2. El pellet se resuspende en 240 µL de solución de resuspensión que contiene RNAsas.
3. Se añade 240 µL de buffer de lisis, se mezcla cuidadosamente por inversión y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añade 340 µL de buffer de neutralización y unión. El contenido se mezcla cuidadosamente por inversión, se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad y se recupera el sobrenadante.
5. Tras obtener el lisado celular, el sobrenadante se transfiere a una columna de purificación PureLink® provista por el kit. La columna se coloca en un tubo para recolección, de 2 mL y se somete a centrifugación durante 1 minuto a 14000 g.
6. Sobre la columna se añade 650 µL del buffer de lavado y se centrifuga durante 1 minuto a 14000 g.
7. Se descarta el contenido del tubo recolector y se hace una nueva centrifugación a 14000 g por 3 minutos.
8. La columna de purificación se coloca en un tubo de 1.7 mL para la elución del ADN plasmídico.

9. Se añade entre 50 a 100  $\mu\text{L}$  de buffer de elución, en dependencia de la concentración de ADN esperada, como se indica en el kit.
10. La columna se incuba a temperatura ambiente y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones y se tiene el ADN plasmídico purificado disuelto en buffer de elución.

Tras tener los plásmidos extraídos, se procede con una etapa de linealización utilizando las enzimas de restricción apropiadas según el plásmido en el que se encuentre insertado cada cDNA del virus. Los cDNA linealizados servirán como base para construir los segmentos requeridos en los ensamblajes Gibson y HiFi. Para cada cDNA se hace una amplificación por PCR con primers que tienen un solapamiento cuya secuencia depende de las condiciones correspondientes a cada ensamblaje.

Los amplicones de cDNA obtenidos por PCR se purifican a partir del gel donde se corrió la electroforesis. Para todos los procesos que involucren la purificación de productos de PCR se recomienda el uso del kit combinado de purificación de PCR y extracción de gel PureLink® de la marca Invitrogen™. El protocolo se detalla a continuación, de acuerdo a las especificaciones del kit.

1. Se inicia cortando la sección del gel donde se encuentra el producto de PCR y se pesa hasta 400 mg de gel.
2. La sección se coloca en un tubo para microcentrífuga de 1.7 mL y se añade 3 volúmenes de buffer de solubilización de gel, por cada volumen de gel.
3. La mezcla se incuba a 50°C por 10 minutos y al finalizar se añade un volumen de isopropanol.
4. El gel disuelto se transfiere a una columna PureLink, provista en el kit, y se centrifuga a más de 10000 g por 1 minuto.

5. La columna se coloca sobre un tubo de lavado y se añade 600  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (W1).
6. Se centrifuga a más de 10000 g por 1 minuto y se desecha el contenido del tubo de lavado. Nuevamente se centrifuga, a máxima velocidad, durante 3 minutos.
7. La columna se transfiere a un tubo de elución y se añade 50  $\mu\text{L}$  de buffer de elución.
8. Tras dejar incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifuga a 10 000 g por 1 minuto. Se descarta la columna PureLink y el tubo de elución que contiene el producto purificado se almacena a 4°C.

### ***Ensamblaje Gibson***

El ensamblaje de Gibson permite la unión por recombinación de grandes segmentos obtenidos por PCR, tras el uso de una T5 exonucleasa, ADN polimerasa y ADN ligasa. El éxito del ensamblaje se da también por el aprovechamiento de la homología entre los solapamientos de los segmentos amplificados (Gibson et al., 2009). Los segmentos utilizados para el ensamblaje de Gibson se obtienen como productos de PCR, en los que se utiliza primers con solapamiento, que en este estudio son diseñados con el software Snapgene®. La esquematización del proceso de construcción de cada plásmido se adjunta en el Anexo 3. Se inicia con la construcción del plásmido para ARN1, para lo cual se ensambla el cDNA de ARN1 con el plásmido pGreen. El ARN1 se inserta dentro de la región MCS del plásmido, entre la posición 781 y 877. Los primers requeridos para la amplificación del segmento ARN1 y el vector se muestran en la tabla 4. En la figura 6, se muestra el plásmido construido.



781 y 877. Los primers requeridos para la amplificación del segmento ARN3 y el vector se muestran en la tabla 5. En la figura 7, se muestra el plásmido construido.

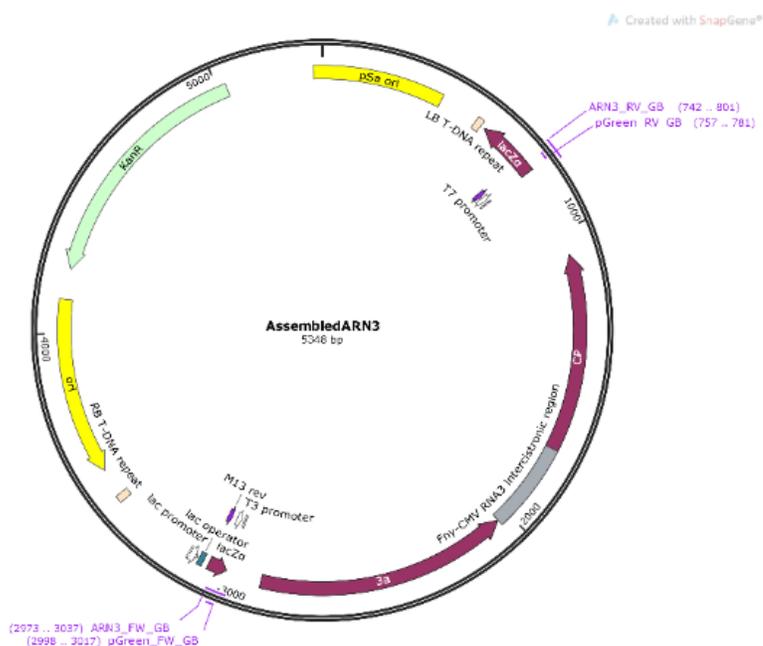
**Tabla 5**

*Primers para ensamblaje del segmento ARN3*

Primer	Secuencia	Tm [°C]	%GC
ARN3_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACA AAAGCTGGAGCTCCGTAATCTTACCA CTGTGTGTGTGCG	73	48
ARN3_RV_GB	GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG GCGAATTGGGTACTGGTCTCCTTTTG GAGGCC	72	48
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	GTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46

**Figura 7**

*Ensamblaje del segmento ARN1 en pGreen*



Finalmente se hace el ensamblaje de ARN2 con eGFP dentro del plásmido pGreen. Como se mencionó previamente, se ha propuesto hacer cinco constructos, cuyas diferencias en posición se muestran en la figura 4. En las tablas 6, 7, 8, 9, 10 se enlistan los primers utilizados para el ensamblaje de cada constructo y en las figuras 8, 9, 10, 11, 12, se muestran los plásmidos construidos.

**Tabla 6**

*Primers para ensamblaje del constructo C1 de ARN2-eGFP*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>%GC</b>
C1ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC AAAAGCTGGAGCTCCGTTTATTTACA AGAGCGTACGGTTCAACC	72	45
C1ARN2_RV_GB	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTCAGA AAGCACCTTCCGCC	74	59
C1eGFP_FW_GB	GGGCGGAAGGTGCTTTCTGAATGGT GAGCAAGGGCGAG	74	61
C1eGFP_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATA GGGCGAATTGGGTATTACTTGTACA GCTCGTCCATGCC	71	44
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46

**Tabla 7**

*Primers para ensamblaje del constructo C2 de ARN2-eGFP*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>%GC</b>
C2ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG CTGGAGCTCCGTTTATTTACAAGAGCGTAC GGTTCAACC	72	45
C2ARN2_RV_GB	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTCAGACTCGG GTA ACTCCGC	74	60

C2eGFP_FW_GB	GCGGAGTTACCCGAGTCTGAATGGTGAGC AAGGGCGAG	72	61
C2eGFP_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC GAATTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCA TGCC	71	44
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46

**Tabla 8**

*Primers para ensamblaje del constructo C3 de ARN2-eGFP*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>%GC</b>
C3ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG CTGGAGCTCCGTTTATTTACAAGAGCGTAC GGTTCAACC	72	45
C3ARN2_RV_GB	TCCTCGCCCTTGCTCACCATAATTCTTTTCGC TGTTTGTGGAA	70	47
C3eGFP_FW_GB	CAACAAACAGCGAAAGAATTATGGTGAGCA AGGGCGAG	67	47
C3eGFP_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC GAATTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCA TGCC	71	44
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46

**Tabla 9***Primers para ensamblaje del constructo C4 de ARN2-eGFP*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>%GC</b>
C4ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG CTGGAGCTCCGTTTATTTACAAGAGCGTAC GGTTCAACC	72	45
C4ARN2_RV_GB	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATAATTCTTTC GCTGTTTGTGGAAATTTACAC	69	42
C4eGFP_FW_GB	ACAAACAGCGAAAGAATTATATGGTGAGCA AGGGCGAG	67	45
C4eGFP_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC GAATTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCA TGCC	71	44
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46

**Tabla 10***Primers para ensamblaje del constructo C5 de ARN2-eGFP*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>%GC</b>
C5ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG CTGGAGCTCCGTTTATTTACAAGAGCGTAC GGTTCAACC	72	45
C5ARN2_RV_GB	TCCTCGCCCTTGCTCACCATATAATTCTTTC GCTGTTTGTGGAAATTTACAC	69	42
C5eGFP_FW_GB	ACAAACAGCGAAAGAATTATATGGTGAGCA AGGGCGAG	67	45
C5eGFP_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC GAATTGGGTATTACTTGTACAGCTCGTCCA TGCC	71	44
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55

pGreen\_RV\_G  
B

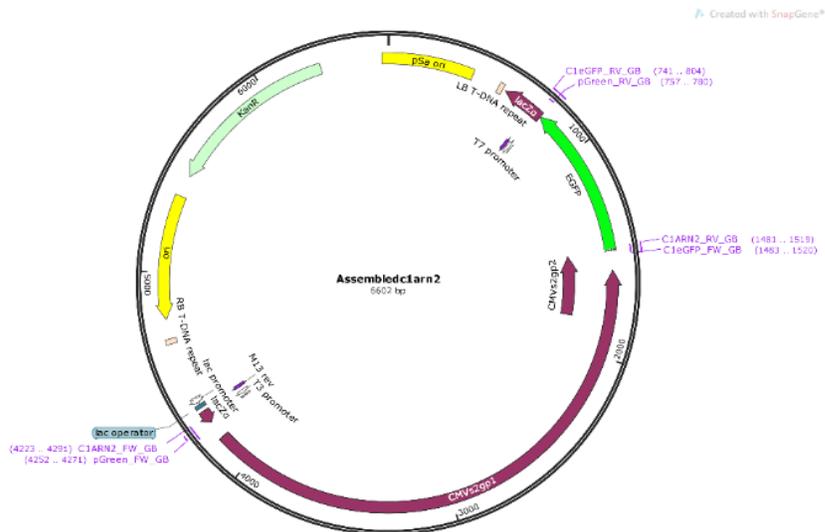
TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT

60

46

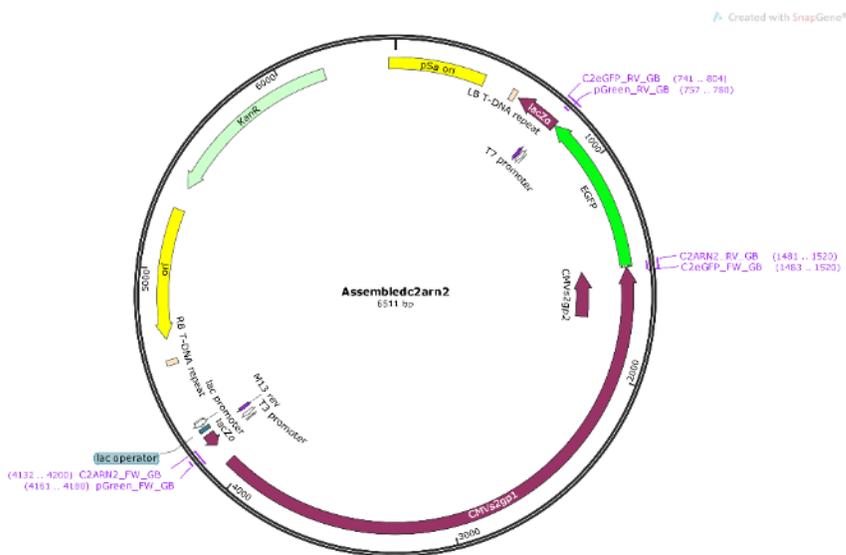
**Figura 8**

*Ensamblaje del constructo C1ARN2 con pGreen*



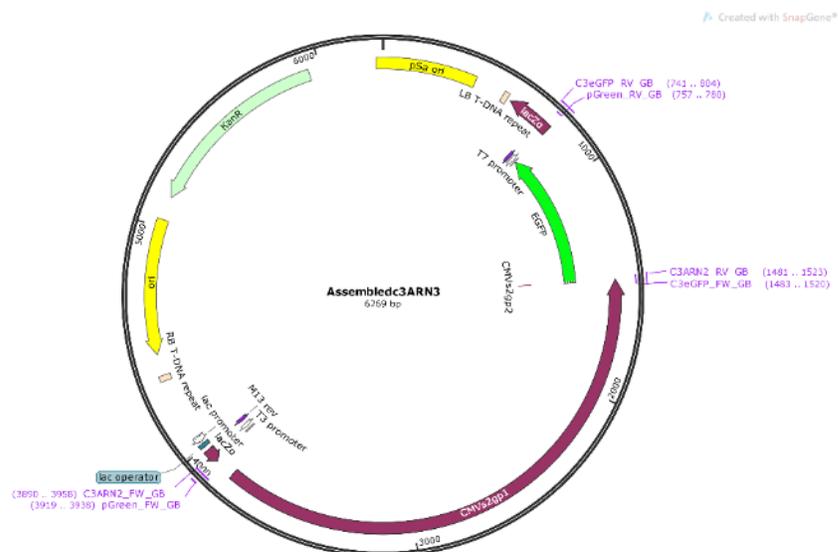
**Figura 9**

*Ensamblaje del constructo C2ARN2 con pGreen*



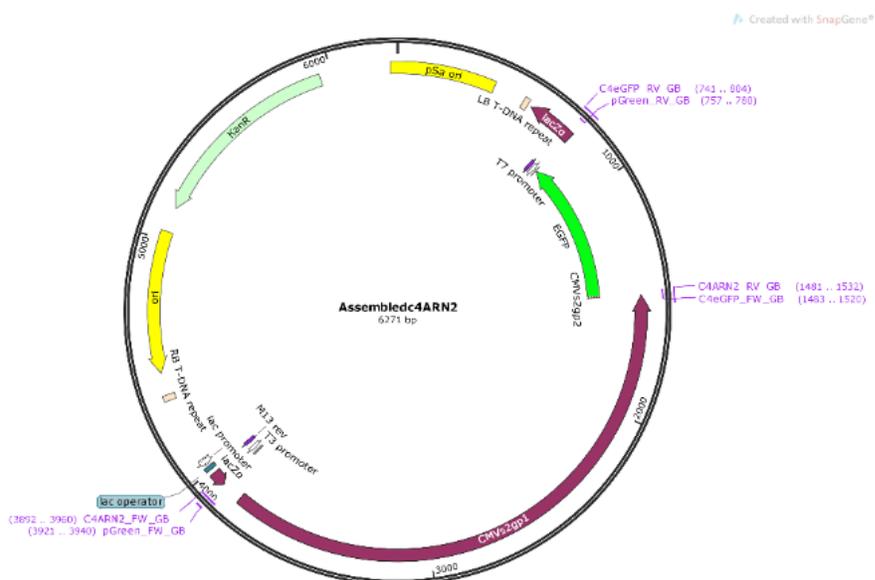
**Figura 10**

*Ensamblaje del constructo C3ARN2 con pGreen*



**Figura 11**

*Ensamblaje del constructo C4ARN2 con pGreen*



**Figura 12***Ensamblaje del constructo C5ARN2 con pGreen*

Adicionalmente se requiere hacer un ensamblaje del ARN2 sin eGFP con pGreen, para que sirva como control WT de la dinámica de infección. Los primers a utilizar para este ensamblaje se enlistan en la tabla 11 y el esquema de ensamblaje se muestra en la figura 13.

**Tabla 11***Primers para ensamblaje del segmento ARN2 WT*

Primer	Secuencia	Tm [°C]	%GC
ARN2_FW_GB	GGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG CTGGAGCTCCGTTTATTTACAAGAGCGTAC GGTTCAACC	72	45
ARN2_RV_GB	AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC GAATTGGGTATGGTCTCCTTTTGGAGGCC	72	47
pGreen_FW_GB	GGAGCTCCAGCTTTTGTTC	58	55
pGreen_RV_GB	TACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60	46



**Tabla 13**

*Condiciones de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos*

<b>Fase</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Tiempo</b>	
Desnaturalización inicial	98	30 segundos	
25-35	Desnaturalización	98	5-10 segundos
Ciclos	Alineamiento	Ta*	10-30 segundos
	Extensión	72	15-30 segundos/Kb
Extensión final	72	5-10 minutos	

\*Dado que la longitud de todos los primers usados en esta reacción es de 20 nt, la temperatura de annealing Ta es igual a la Tm del primer con la menor Tm.

El proceso de ensamblaje se realiza con el Kit GeneArt Gibson Assembly Cloning EX® de la marca Invitrogen™. Los productos de amplificación se purifican con el kit combinado de purificación de PCR y extracción de gel PureLink® de la marca Invitrogen™, cuyo procedimiento se describe previamente. Para maximizar la eficiencia de ensamblaje todos los componentes se deben encontrar en concentraciones equimolares, por lo que previamente se requiere determinar las concentraciones molares, utilizando la fórmula 5.

$$pmol \approx \frac{(peso \text{ en } ng). 1000}{(longitud \text{ del } fragmento \text{ en } bp). 660 \text{ Dalton}} \quad (5)$$

El vector y cada fragmento se lleva a una concentración de 0.04 pmol. Los componentes de la reacción Gibson se mezclan en un tubo de microcentrífuga, sobre hielo, en las cantidades mostradas en la tabla 14.

**Tabla 14***Componentes para la reacción de ensamblaje Gibson*

<b>Componente</b>	<b>Reacción</b>
Fragmento 1	(0.04 pmol) X1 $\mu$ L
Vector	(0.04 pmol) X2 $\mu$ L
GeneArt Gibson Assembly Master Mix A	5 $\mu$ L
Agua desionizada	(5-X1-X2) $\mu$ L
Volumen total	10 $\mu$ L

\*En la reacción también se recomienda incluir un control positivo, del cual se mezclan 5  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de GeneArt Gibson Assembly Master Mix A

Tras agregar todos los componentes, se homogeneiza la mezcla mediante vortex y se incuba en un termociclador, bajo las condiciones indicadas en la tabla 15.

**Tabla 15***Condiciones de termociclador para ensamblaje Gibson*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	37	5 minutos
2	75	20 minutos
3	Enfriar a 60°C a 0.1°C por segundo	
4	60	30 minutos
5	Enfriar a 4°C a 0.1°C por segundo	

Tras finalizar la reacción en el termociclador, se agrega 10  $\mu$ L de GeneArt Gibson Assembly Master Mix B y se homogeneiza con vortex. La mezcla se incuba a 45°C por 15 minutos e inmediatamente se coloca en hielo para proceder con la transformación. Los productos de ensamblaje se transforman en *A. tumefaciens*, por electroporación (Tuo et al., 2017).

### ***Ensamblaje NEBuilder HiFi DNA***

Esta técnica de ensamblaje se basa en el principio de la técnica de Gibson, de utilizar fragmentos amplificados por PCR con sobrelapamientos homólogos, y también ha sido utilizada para la construcción de clones virales en plantas (Bao et al., 2020; Wieczorek et al., 2020). La ventaja que presenta esta técnica es una mayor eficacia de ensamblaje, solventado algunos inconvenientes que resultan del ensamblaje Gibson como un menor porcentaje de mutaciones puntuales y la remoción de 5' o 3' emparejamientos erróneos. Los componentes requeridos para esta técnica son los mismos que se diseñaron para el ensamblaje de Gibson y por tanto se utilizan los mismos primers (BioSpace, 2015). El protocolo se describe a continuación, en base a las instrucciones del kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning® y el trabajo de (Birla & Chou, 2015; Timmons, 2015).

1. Se determina la concentración de los productos de PCR correspondientes a cada uno de los fragmentos para el ensamblaje, mediante Nanodrop® a una absorbancia de 260 nm.
2. Se calcula la concentración en pmol de cada fragmento utilizando la fórmula 4. Para el ensamblaje de uno o dos fragmentos, la concentración debe encontrarse entre 0.03 y 0.2 pmol.
3. Los fragmentos se desnaturalizan a 95°C y se dejan enfriar lentamente a temperatura ambiente.
4. Se mezcla los fragmentos con el vector, en una proporción 1:2.
5. Los fragmentos y el vector pGreen se mezclan con el Master Mix NEBuilder HiFi DNA Assembly®, en las cantidades mostradas en la tabla 16.
6. La mezcla se calienta a 60°C y se mantiene a esta temperatura durante 4 a 8 minutos.

7. La mezcla se incuba a 50°C, por 15 minutos.
8. Tras la incubación, se ha concluido el ensamblaje y los constructos son transformados a *A. tumefaciens* o se almacenan a -20°C.

**Tabla 16***Mezcla de reacción NEBuilder HiFi DNA Assembly*

Componente	Reacción
Fragmentos y Vector	(0.03-0.2pmol) X1 µL
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µL
Agua desionizada	(10-X1) µL
Volumen total	20 µL

\*En la reacción se debe incluir un control positivo, incluido en el kit, del cual se mezclan 10 µL con 10 µL de Master Mix.

***Electroporación***

Para insertar los constructos hechos en pGreen y el plásmido pSoup, complementario a pGreen, se aplica la técnica de electroporación. Para esta etapa se sigue el protocolo general de electroporación en *A. tumefaciens* (Kámán-Tóth et al., 2018; Shen et al., 2014; Tuo et al., 2017), descrito a continuación.

1. Se inicia por preparar células competentes de *A. tumefaciens*, para lo cual se toman células que se han desarrollado en medio Agar-LB y se suspenden en una solución de glicerol al 10%, a 4 °C.
2. La suspensión se centrifuga a 18000 g por 1 minuto, en frío.
3. Al pellet resultante se añade 1 mL de glicerol al 10%, y se vuelve a centrifugar con las condiciones anteriores.
4. El pellet se compone de las células competentes, a las que se añade 200 µL glicerol al 10% estéril.

5. 100  $\mu\text{L}$  de células competentes de *A. tumefaciens* se mezclan con 2.5  $\mu\text{L}$  de los plásmidos a una concentración de 1 a 30  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .
6. La mezcla se deposita en una cubeta para electroporación, previamente enfriada.
7. Se ejecuta la electroporación con un campo de fuerza de 1.8  $\text{kV}/\text{cm}$ .
8. Se añade 1  $\text{mL}$  de medio LB a la cubeta y la mezcla se incuba a  $28^\circ\text{C}$  por 3 horas, en agitación a 200 rpm.
9. Tras evidenciarse crecimiento, se toma una alícuota del cultivo y se siembra en medio Agar-LB con Kanamicina a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Rifampicina a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Colony PCR**

Para confirmar que se ha dado exitosamente la inserción de los plásmidos en *A. tumefaciens*, se realiza una colony PCR. Los primers requeridos para confirmar la inserción de cada plásmido son diseñados con el software Primer3 y su viabilidad se ha analizado con los softwares OligoAnalyzer, PrimerBlast, lo cual se muestra en el Anexo 4. Los primers que se utilizan para comprobar la inserción de cada constructo se muestran en la tabla 17. Las condiciones que se consideró optimizar en Primer3 son:

- Tamaño máximo de primer de 30
- Diferencia máxima de  $T_m$  de 1,
- Rango de tamaño de producto de 2000-4000
- Valores de 1 para Max Self Complementarity, Max 3' Self Complementarity, Max Pair Complementarity, Max 3' Pair Complementarity

**Tabla 17**

*Primers diseñados para confirmar la inserción de los plásmidos*

<b>Plásmido</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>	<b>Amplicón</b>
pARN1	pARN1_FW	GCAGATTACCGCCAACCTCAG	58	55	3982 pb
	pARN1_RV	AAGTCGTGTCTTACCGGGTT	58	55	
pARN3	pARN3_FW	GATCGGAGGGAGGATTCTGG	57	60	2806 pb
	pARN3_RV	AAGTCGTGTCTTACCGGGTT	58	50	
pC1ARN2	pC1ARN2_FW	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	57	55	3592 pb
	pC1ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC2ARN2	pC2ARN2_FW	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	57	55	3501 pb
	pC2ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC3ARN2	pC3ARN2_FW	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	57	55	3259 pb
	pC3ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC4ARN2	pC4ARN2_FW	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	57	55	3261 pb
	pC4ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC5ARN2	pC5ARN2_FW	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	57	55	3261 pb
	pC5ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pARN2	pARN2_FW	CAACACGATCAGTAGCACGG	58	55	2921 pb
	pARN2_RV	CAGGCCGCGATTAAATTCCA	57	50	

\*Los primers de los constructos pC1ARN2, pC2ARN2, pC3ARN2, pC4ARN2 y pC5ARN2, poseen la misma secuencia pero el tamaño de amplicón que generan varía.

El proceso de colony PCR inicia tras haber incubado las células transformadas de *A. tumefaciens* por 48 horas, a 28°C, en medio LB con Kanamicina a 50 µg/mL y Rifampicina a 50 µg/mL. Se muestrea las colonias y se procede con la colony PCR conforme al protocolo que se describe a continuación (Shen et al., 2014).

1. Se toma una alícuota de las bacterias desarrolladas en medio LB y se inocula en 3 mL de medio YEP con antibiótico. Se incuba a 28°C durante una noche o hasta que el cultivo alcance un OD de 0.6 a 1.
2. Las células desarrolladas en el medio se precipitan mediante centrifugación y se elimina el medio sobrenadante.

3. Las células se resuspenden en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se calientan a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
4. Se centrifuga a 13000 rpm por 30 segundos y se toma 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante.
5. El sobrenadante sirve como ADN molde para la PCR. La mezcla de reacción se especifica en la tabla 18 y las condiciones de reacción se muestra en la tabla 19. Para esta reacción de PCR se recomienda el uso de una polimerasa robusta, capaz de soportar inhibidores de la reacción y amplificar segmentos largos. La enzima sugerida para este ensayo es la ADN Polimerasa Phire Hot Start II.

**Tabla 18**

*Composición de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos*

Reactivo	Concentración	Reacción a 20 $\mu\text{L}$
Agua ultra pura	-	13.2 $\mu\text{L}$ - X
5X Phire Reaction Buffer	1X	4 $\mu\text{L}$
dNTPs	200 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{L}$
Forward Primer*	0.5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Reverse Primer*	0.5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
ADN molde	1pg-10ng	X $\mu\text{L}$
ADN Polimerasa Phire Hot Start II		0.4 $\mu\text{L}$

\*El volumen de cada primer se calcula considerando una concentración inicial de 10  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 19**

*Condiciones de reacción para la comprobación de inserción de plásmidos*

Fase	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Tiempo
Desnaturalización inicial	98	30 segundos
25-35 Ciclos	Desnaturalización	5 segundos
	Alineamiento	Ta*
	Extensión	10-15 segundos/Kb
Extensión final	72	1 minuto

\*Dado que la longitud de todos los primers usados en esta reacción es de 20 nt, la temperatura de alineamiento Ta es igual a la Tm del primer con la menor Tm.

### **Infección de CMV recombinante en plantas de *A. thaliana* col-0**

La técnica de agroinfiltración permite la expresión uniforme, rápida y eficiente, de ARN viral dentro de la planta, al mismo tiempo que se evita la aplicación de agentes abrasivos utilizados para la inoculación mecánica, que provocan daño celular y causan interferencias en los resultados (Annamalai & Rao, 2006). El proceso de agroinfiltración se describe a continuación, siguiendo protocolos descritos por (Fujiki et al., 2008; Hu et al., 2012; Hull, 2009).

1. Las bacterias transformadas con los plásmidos virales se hacen crecer en medio LB-Agar con Kanamicina a 50 µg/mL y Rifampicina a 50 µg/mL antibiótico, durante 24 horas a 28°C.
2. Las colonias se suspenden en buffer de infiltración, a una concentración de 10<sup>10</sup> CFU/mL, o una OD de 1.0
3. Las colonias en suspensión se incuban durante dos horas, en oscuridad a 22°C.
4. En el envés de las hojas se hacen pequeñas laceraciones con un bisturí estéril y se aplica 50 µL de la suspensión en el envés de las hojas.

La evaluación del apareamiento de síntomas se realiza en 3, 5, 7, 9, 11 y 14 días post-inoculación. La expresión de GFP se evalúa en los mismos periodos, mediante microscopía de fluorescencia.

### **Visualización del movimiento de CMV recombinante dentro de *A. thaliana* por fluorescencia**

#### ***Aplicación de nanopartículas en A. thaliana***

Para la aplicación de ZnONP, se prepara una suspensión, tomando en consideración la concentración óptima no citotóxica, determinada en ensayos anteriores. 5 mL de la suspensión de ZnONP son rociados diariamente en las hojas de *A. thaliana* con el uso de un aspersor. Se evalúa la aplicación en distintos periodos de

tiempo, durante 7 y 12 días antes de la inoculación viral; y tras la inoculación por 4 y 7 días (Cai et al., 2019; Hamed & Elsharkawy, 2019; Hernández et al., 2020). Los períodos de inoculación se consideran como tratamientos en este diseño experimental esquematizado en la tabla 20. Cada tratamiento se aplica en triplicado. La evaluación estadística para los resultados de este ensayo, se realiza mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Tabla 20**

*Diseño experimental para la evaluación del efecto de ZnONP en el movimiento de CMV*

<b>Periodo</b>	<b>12 días pre- inoculación</b>	<b>7 días pre- inoculación</b>	<b>4 días post- inoculación</b>	<b>7 días post- inoculación</b>	<b>Control (-)</b>
Plantas de <i>A. thaliana</i>	3 plantas	3 plantas	3 plantas	3 plantas	3 plantas

\*El control negativo (-) son plantas de *A. thaliana* inoculadas con CMV-eGFP, a las que no se aplica ZnONP.

Debido a la cantidad de unidades experimentales que se requeriría para la evaluación de los efectos, se sugiere inicialmente probar los periodos de aplicación de ZnONP en plantas infectadas con CMV WT, y en base a esos resultados poder luego estudiar el movimiento del virus con fluorescencia.

### **Visualización de CMV**

Para tener una estimación del daño en la planta provocado por el virus se el área de expansión viral en cada unidad experimental. Para este ensayo de visualización se sigue el siguiente protocolo (De Vylder et al., 2012; Shen et al., 2014).

1. Se toman hojas de cada unidad experimental y se colocan sobre un portaobjetos con una pequeña cantidad de agua destilada.
2. Las hojas se colocan en un escáner de fluorescencia, dentro del cual se excita a GFP con luz a una longitud de onda de 473nm.

3. Las imágenes se toman con un filtro de paso de banda de 530 nm.
4. Se determina el grado de expansión viral en cada unidad experimental, mediante el análisis de las imágenes obtenidas, con el software ImageJ®. El grado de expansión viral se puede cuantificar con el software RosetteTracker®

### **Determinación de carga viral mediante qRT-PCR**

Se busca cuantificar la acumulación viral que se ha producido en las plantas de *A. thaliana* después de haber sido expuestas a CMV, durante el periodo de estudio, para lo cual se aplica una PCR Cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR).

### **Extracción de ARN**

Se requiere primero extraer el ARN total de las plantas, para lo cual se ejecuta el siguiente protocolo (Claros & Cánovas, 1999; Mallory, 2005; Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008).

1. Se inicia colectando 30 mg de tejido foliar de cada unidad experimental, tomando muestras en diversos puntos, y se pulverizan tras aplicar N<sub>2</sub> líquido.
2. Las hojas pulverizadas se homogenizan en 300 µL de solución de lisis, compuesta por 2% SDS, Citrato de Sodio 68mM, Ácido Cítrico 132mM, EDTA 1mM.
3. Se homogeniza por inversión y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Se añade 100 µL de solución para precipitación de ADN y proteínas, compuesta por NaCl 4M, Citrato de Sodio 16 mM, Ácido Cítrico 32 mM.
5. Se homogeniza por inversión y se incuba a 4°C por al menos 10 minutos.
6. Se centrifuga en frío, a máxima velocidad durante 10 minutos. Tras finalizar la centrifugación, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de microcentrífuga y se añade 300 µL de isopropanol.

7. Se mezcla el contenido por inversión, se centrifuga a máxima velocidad durante 4 minutos y se descarta el sobrenadante.
8. El pellet se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 25  $\mu$ L de agua ultrapura.
9. Se añade 3  $\mu$ L de buffer DNAsa 10X y 2 unidades de DNAsa.
10. Se incuba a 30 minutos a 37°C y posteriormente se añade 70  $\mu$ L de agua ultrapura, 50  $\mu$ L de Acetato de amonio 7.5 M y 400  $\mu$ L de etanol 100%.
11. La mezcla se centrifuga en frío durante 20 minutos, se descarta el sobrenadante y el pellet se lava con etanol al 70%.
12. El pellet se resuspende en 20  $\mu$ L de agua ultrapura.
13. La concentración de ARN extraído se determina mediante medición en Nanodrop®, tomando agua ultrapura como blanco.

### ***Síntesis de cDNA***

El cDNA se sintetiza a partir del ARN extraído previamente, el cual se ajusta a una cantidad de 300 ng. Para la síntesis de cDNA se utiliza el kit iScript® cDNA synthesis y se sigue el protocolo sugerido en el kit, que se describe a continuación.

1. Se inicia preparando la mezcla de reacción, cuyos componentes y concentraciones se muestran en la tabla 21.
2. Tras mezclar los componentes se inicia la reacción en un termociclador, cuyos componentes se enlistan en la tabla 22.
3. El producto de reacción se almacena a -20°C, para su posterior análisis por qPCR.

**Tabla 21***Mezcla de reacción para síntesis de cDNA*

Componente	Reacción a 20 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	15 - X $\mu$ L
5X iScript reaction mix	4 $\mu$ L
Transcriptasa reversa iScript	1 $\mu$ L
ARN molde (100 fg- 1 $\mu$ g)	X $\mu$ L

**Tabla 22***Condiciones de reacción para síntesis de cDNA*

Fase	Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Tiempo
Priming	25	5 minutos
Transcripción Reversa	46	20 minutos
Inactivación	95	1 minuto
Finalización	4	Indefinido

**qRT-PCR**

Los primers para la detección del virus se diseñan utilizando el software Primer3 en base al gen de la proteína de movimiento de CMV, encontrada en el segmento de ARN3. Los primers y la sonda que se utiliza para la amplificación cuantitativa se muestran en la tabla 23. El análisis de los primers se adjunta en el Anexo 4.

**Tabla 23***Primers para qPCR*

Primer	Secuencia	Tm [ $^{\circ}$ C]	%GC
CMVCP_FW	GGAGTCCAAGCCAACAACAA	58	50
CMVCP_RV	CAGAGATCGGAGGGAGGATTC	59	57
CMVCP_PR	AGTGCTCCCAGTCTGATTCC	60	55

Previo al ensayo es necesario probar la especificidad de los primers, haciendo una PCR convencional y corriendo una electroforesis. Para ello se prepara una reacción de 25  $\mu\text{L}$  con tres réplicas, con los reactivos que se describen en la tabla 24, utilizando la ADN polimerasa GoTaq®. Se toma como control una muestra que no se trató con transcriptasa reversa y otra sin el cDNA molde, para confirmar la ausencia de ADN genómico u otro contaminante, y que los primers no forman estructuras secundarias (Lilly et al., 2010). Se recomienda también hacer este ensayo de PCR con un gradiente de temperaturas, para poder estandarizar la temperatura de alineamiento óptima.

**Tabla 24**

*Mezcla de reacción para la prueba de primers*

Reactivo	Concentración	Reacción a 25 $\mu\text{L}$
Agua ultra pura	-	4.5 – X $\mu\text{L}$
2X GoTaq Green Master Mix	1X	12.5 $\mu\text{L}$
dNTP	0.2 mM	1 $\mu\text{L}$
Forward Primer	0.4 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Reverse Primer	0.4 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
cDNA	< 250 ng/ $\mu\text{L}$	X $\mu\text{L}$

\*Se considera que la concentración inicial de primer es 10  $\mu\text{M}$ .

El programa sugerido para este ensayo de amplificación se describe en la tabla 25, cuyas condiciones se optimizan según las indicaciones para la polimerasa GoTaq y la naturaleza de los primers.

**Tabla 25***Condiciones de reacción para la prueba de primers*

<b>Fase</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94	5 minutos
35 Ciclos	Desnaturalización	94
	Alineamiento	53
	Extensión	72
Extensión final	72	5 minutos

\*La temperatura de alineamiento  $T_a$ , es 5°C menor a la  $T_m$  del primer con  $T_m$  más baja.

La PCR se ejecuta en un termociclador para PCR en tiempo real, con el sistema de reacción que se describe en la tabla 26. Cada muestra se amplifica en triplicado utilizando el programa descrito en la tabla 27.

**Tabla 26***Mezcla de reacción para la qPCR*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad por Reacción</b>
<b>SYBR Green I Master Mix</b>	1X	5 $\mu$ L
<b>Forward Primer</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
<b>Reverse Primer</b>	5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
<b>cDNA</b>	2.5 ng/ $\mu$ L	3 $\mu$ L

\*Para cada reacción se establece un volumen final de 10  $\mu$ L (Lilly et al., 2010).

**Tabla 27***Condiciones de reacción para la qPCR*

<b>Fase</b>		<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial		95	5 minutos
40 Ciclos	Desnaturalización	95	10 segundos
	Alineamiento		
	Extensión	72	6 segundos
Extensión final		72	5 minutos
Ciclo de análisis de la curva de melting	Desnaturalización	95	5 segundos
	Extensión	65	1 minuto

\*El tiempo de extensión para cada ciclo se calcula dividiendo la longitud del amplicón para 25

\*\* En el ciclo de análisis de la curva de melting se realiza una toma de datos de fluorescencia continua, a 5 tomas por grado centígrado

## Capítulo IV: Resultados Esperados

### Resultados de la síntesis

La mezcla de la solución de sal de Zn con el extracto vegetal, conlleva una serie de cambios físico-químicos que incluyen un marcado cambio de coloración de la mezcla, cuya intensidad y características varían en dependencia de la muestra vegetal que se utilice (Dhandapani et al., 2020; Naseer et al., 2020). Al llevar a cabo la reacción de síntesis bajo el protocolo que ha sido descrito en este trabajo, se espera la formación de ZnONP, con un rendimiento superior al 90%. Al mantener un pH básico durante la reacción de síntesis, se espera la formación de un polvo blanquecino. La temperatura a la que se realiza la calcinación es un factor que influye en el color del polvo resultante y en el porcentaje de rendimiento (Thi et al., 2020). Al aplicar una temperatura superior a 700°C, se espera la formación de un polvo fino, blanquecino, como el que se muestra en la figura 14. En la figura 15, se muestra el posible mecanismo de reacción bajo el cual se da la síntesis verde de las ZnONP.

### Figura 14

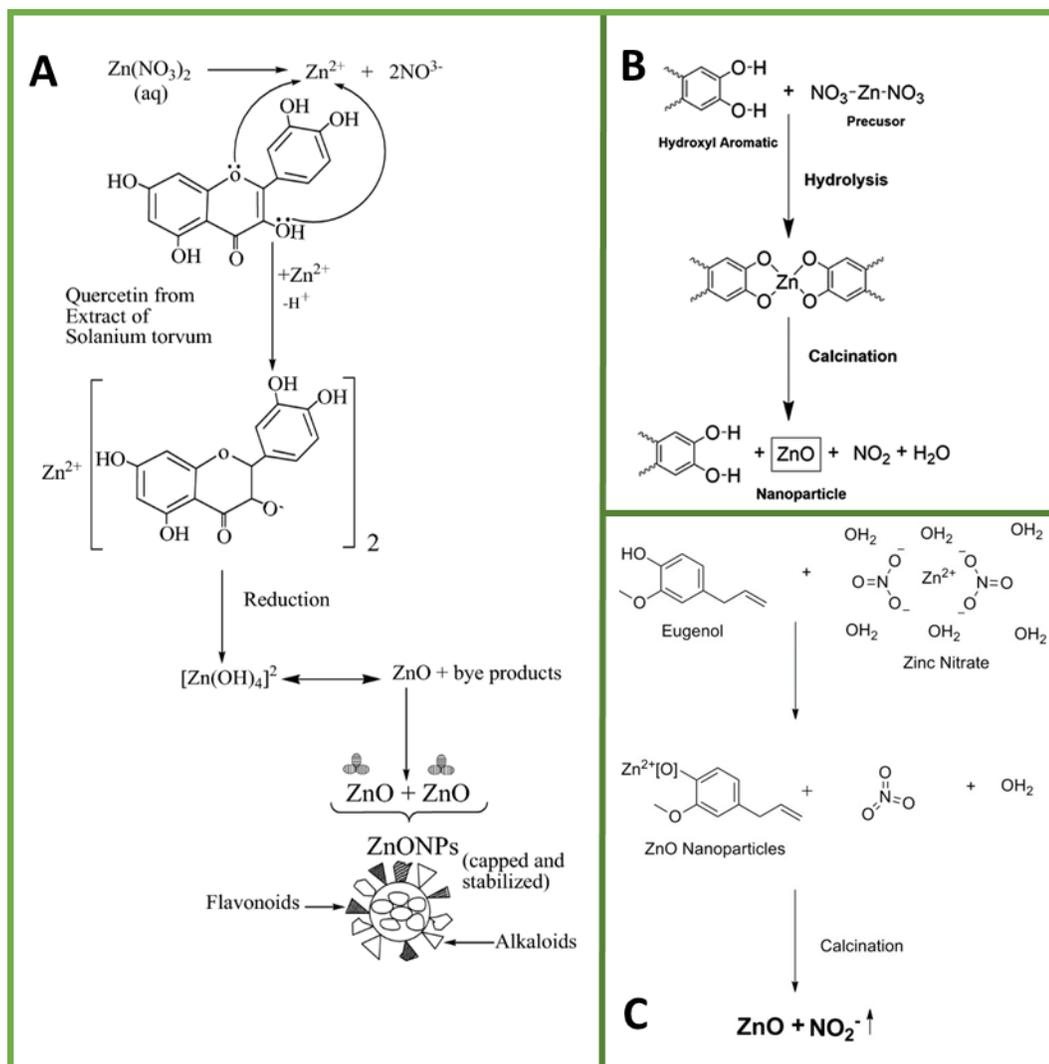
*Polvo de ZnONP resultante del proceso de síntesis*



*Nota.* Se muestran imágenes de ZnONP obtenidas a diferentes temperaturas de secado en mufla. A: 600 °C. B: 700°C. C: 800°C. D: 900°C. Modificado de (Thi et al., 2020).

Figura 15

## Mecanismos de formación de ZnONP



Nota: A: Mecanismo de formación a partir de extracto vegetal, tomado de (Ezealisiji et al., 2019). B: Mecanismo de formación tras hidrólisis y calcinación, tomado de (Thi et al., 2020). C: Mecanismo de formación descrito para la síntesis a partir de *Cinnamomum verum*, tomado de (Ansari et al., 2020).

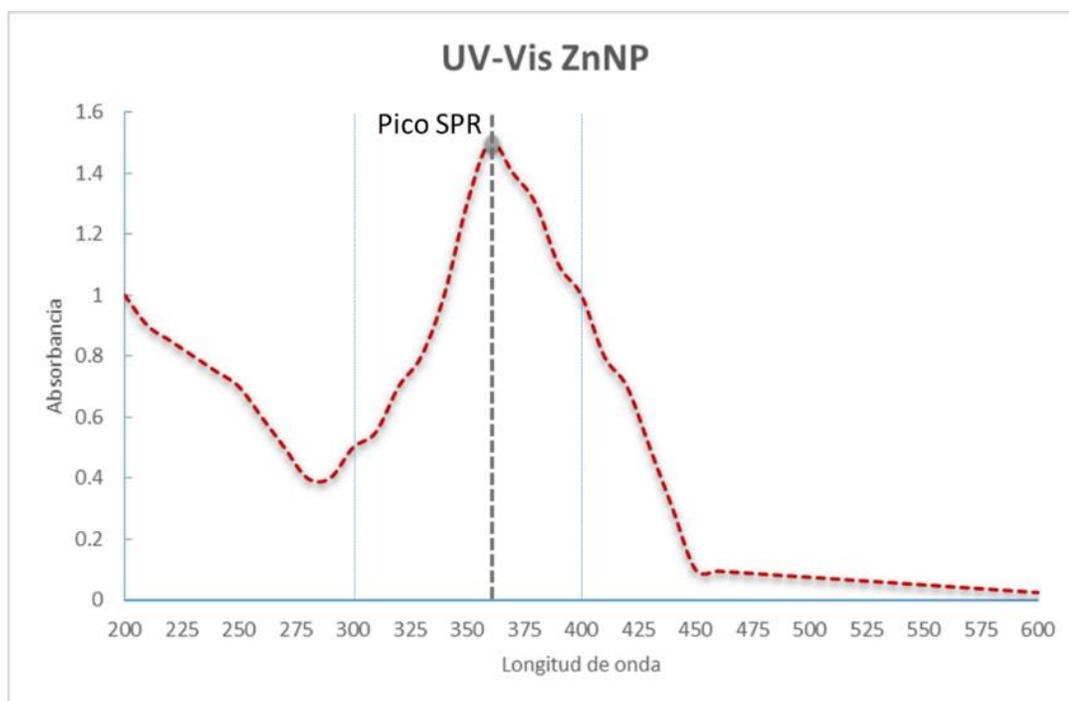
## UV-Vis

En el análisis de UV-Vis, se espera que se encuentre un pico de absorbancia a los  $351.08 \pm 36.34$  nm, correspondiente al SPR de las ZnONP. Este valor se ha obtenido

en base a los datos que se encuentran en el Anexo 1 y se encuentra dentro del rango descrito para las ZnONP, como se muestra en la figura 16. El pico de SPR permite confirmar la formación exitosa de las ZnONP. La determinación de la estabilidad de las ZnONP se realiza haciendo mediciones periódicas del SPR, y verificando que su posición y valor de absorbancia se encuentre igual o cercano al inicial. Se establece que las ZnONP son estables cuando se mantiene SPR y cuando en el periodo de estudio no se evidencia la formación de otros picos. Las ZnONP que presenten una estabilidad superior a 288 horas, se consideran apropiadas para su aplicación en los experimentos.

### Figura 16

*Espectro UV-Vis de ZnONP*



*Nota.* Gráfico construido en base la información provista por (Ezealisiji et al., 2019; Hassan et al., 2015)

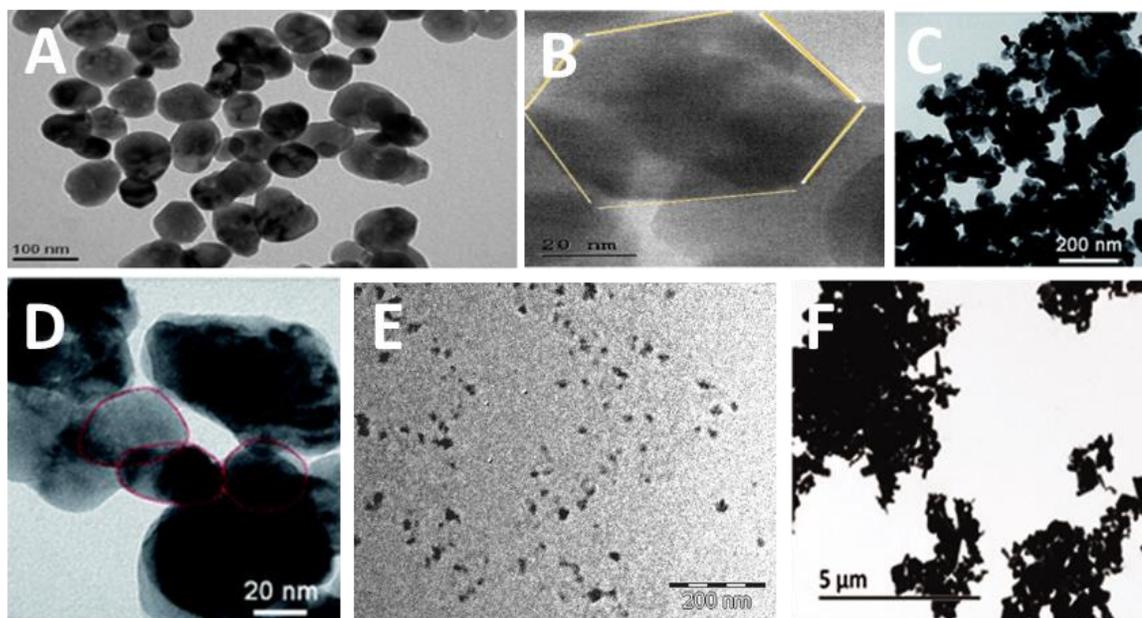
### ***Microscopía electrónica de transmisión***

La imagen obtenida por TEM permite visualizar la morfología de las ZnONP, que puede ser hexagonal o esférica, como se muestra en la figura 17. Además se determina

el diámetro promedio de las NP, que debe ajustarse a un valor de  $46.7 \pm 31.2$ , según los datos del Anexo 1. Los tamaños de una muestra de ZnONP se registran con un software de análisis de imagen, de sugerencia Image-J®, y se construye un histograma de la distribución de tamaños. Se espera obtener una distribución uniforme de las ZnONP, sin existir una gran desviación en su diámetro promedio (Mahendiran et al., 2017). Para la realización de los experimentos del presente estudio, se considera escoger los productos de síntesis, en los que el tamaño de las ZnONP se encuentre en un rango de 50 nm a 150 nm.

### Figura 17

*Observaciones de ZnONP por TEM*



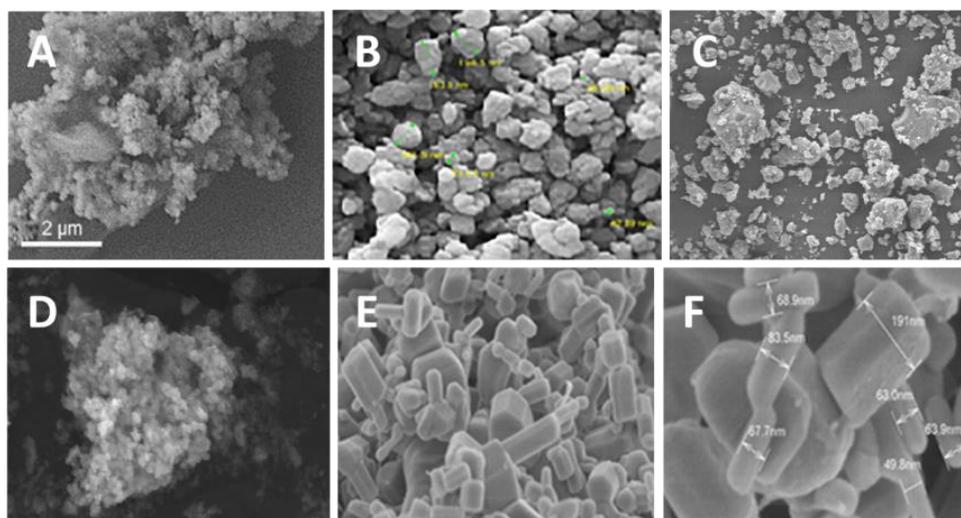
*Nota.* A y B: ZnONP obtenidas con *Prosopis juliflora*, escalas 100 y 20 nm; modificado de (Sheik Mydeen et al., 2020). C y D: ZnONP obtenidas con *Citrus aurantifolia*, escalas 200 y 20 nm; modificado de (Thi et al., 2020). E: ZnONP obtenidas con *Solanum torvum*, escala 200 nm; modificado de (Ezealisiji et al., 2019). F: ZnONP obtenidas con *Matricaria chamomilla*, escala 5  $\mu\text{m}$ ; modificado de (Ogunyemi et al., 2019).

### **Microscopía electrónica de barrido**

Las imágenes de SEM muestran ZnONP con una forma esférica, o hexagonal a manera de cilindros cuyo diámetro se ajusta al valor promedio de  $46.7 \pm 31.2$ . Se puede observar además la naturaleza de la superficie de las ZnONP, que en general se presenta como rugosa, debido a la adsorción de los grupos funcionales provenientes del precursor vegetal. Adicionalmente la observación por SEM permite encontrar impurezas que se pudieron agregar a la muestra durante la síntesis, y como en el caso de TEM, se puede calcular el tamaño promedio. Como se muestra en la figura 18, las ZnONP se pueden encontrar agregada o libres, en dependencia del extracto vegetal que se utilice.

### **Figura 18**

*Observaciones de ZnONP por SEM*



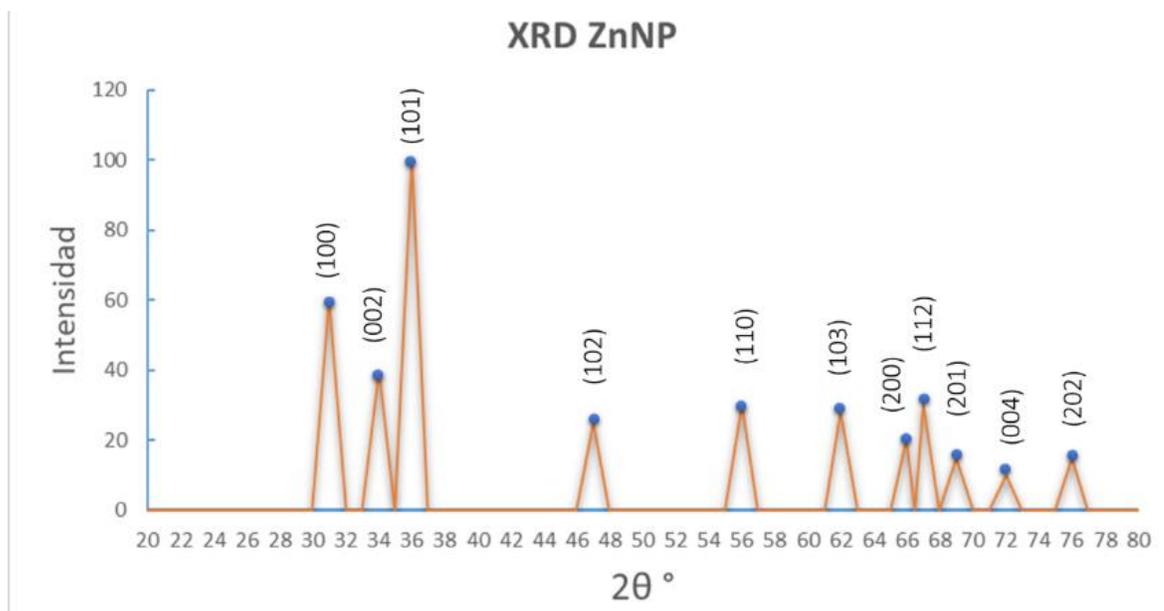
*Nota.* A: ZnONP obtenidas con *Melia azederach*, magnificación a 8 000 X; modificado de (Naseer et al., 2020). B: ZnONP obtenidas con *Laurus nobilis*, magnificación a 30 000 X; modificado de (Fakhari et al., 2019). C: ZnONP obtenidas con *Solanum torvum*, magnificación a 494 X; modificado de (Ezealisiji et al., 2019). D: ZnONP obtenidas con *Allamanda cathartica*, magnificación a 20 000 X; modificado de (Shilpa et al., 2020). E y F: ZnONP obtenidas con *Matricaria chamomilla*, magnificación a 30 000 X y 100 000 X; modificado de (Shilpa et al., 2020).

### Difracción de Rayos X

Se espera que el análisis de XRD demuestre la presencia de picos de difracción situados en valores  $2\theta$  de  $31.7\theta$ ,  $34.4\theta$ ,  $36.3\theta$ ,  $47.5\theta$ ,  $56.5\theta$ ,  $62.7\theta$ ,  $66.3\theta$ ,  $67.8\theta$ ,  $69.1\theta$ ,  $72.5\theta$  y  $76.3\theta$  (Ahmed et al., 2017; Begum et al., 2018; Mahendiran et al., 2017; Sheik Mydeen et al., 2020), que corresponden a los sistemas de planos cristalográficos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) y (202), propios de una estructura de Wurzite hexagonal. Los valores  $2\theta$  deben coincidir con los datos registrados en la carta número 36-1451, del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), que siguen un patrón como el que se muestra en la figura 19. En base a los sistemas de planos cristalográficos se construye la estructura tridimensional característica de las ZnONP, que se asemejaría a la mostrada en la figura 20.

### Figura 19

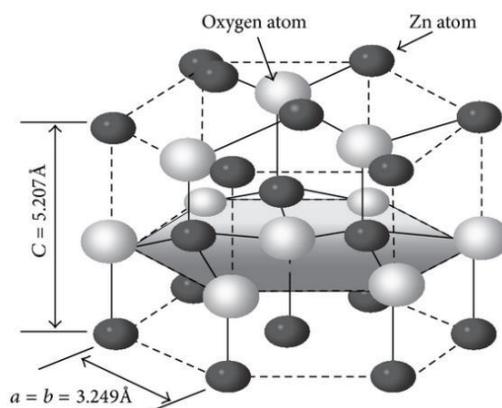
Patrón de XRD para ZnONP



*Nota.* Esquema realizado en base a la información provista por (Ahmed et al., 2017; Begum et al., 2018; Mahendiran et al., 2017; Sheik Mydeen et al., 2020).

## Figura 20

### Estructura cristalina de ZnONP



*Nota.* Estructura cristalina hexagonal de las ZnONP. Tomado de (Sabir et al., 2014).

El tamaño de partícula se calcula con la ecuación de Debye Scherer, donde  $\kappa$  es 0.9,  $\lambda$  es 1.5406,  $\theta$  corresponde a cada ángulo de difracción mencionado previamente y  $\beta$  es el ancho de cada pico a la mitad de su altura. Se calcula el tamaño para cada uno de los 11 picos y el tamaño de la NP corresponde al promedio de cada tamaño calculado. El valor obtenido permite confirmar y ajustar los tamaños determinados por TEM y SEM.

### ***Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier***

Los datos provistos tras el análisis de FTIR, dan información acerca de los grupos funcionales provenientes del extracto vegetal, que tienen las ZnONP adsorbidas en su superficie. En base a los estudios revisados en el Anexo 1, los grupos más comunes que se pueden encontrar, tras la reducción por agentes vegetales, son: O-H, C-H, C-C, C-O, C=O, N-H, C-N. Cada grupo se identifica según el pico de absorción que se encuentra. Los picos característicos de cada grupo se especifican en la tabla 28.

**Tabla 28***Picos de absorción correspondientes a los grupos funcionales*

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Posible Compuesto</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>
O-H	Agua, Alcohol, Ácido Carboxílico	3700-2500
C-H	Alquino, Alqueno, Alcano, Aldehído	3333-2695
C-C	Alqueno, Alqueno cíclico, Aromático	1680-1400, 1000-665
C-O	Ester, Alcohol primario, Alcohol secundario, Éter alifático	1210-1085
C=O	Cetona conjugada, Haluro ácido, Amida, Aldehído, Anhídrido, Ácido carboxílico	1818-1650
N-H	Amina primaria, Amina secundaria	3500-3310
C-N	Amina, Amina aromática	1342-1020

*Nota.* Los datos del compuesto y frecuencia fueron obtenidos de (Chemistry LibreTexts, 2014).

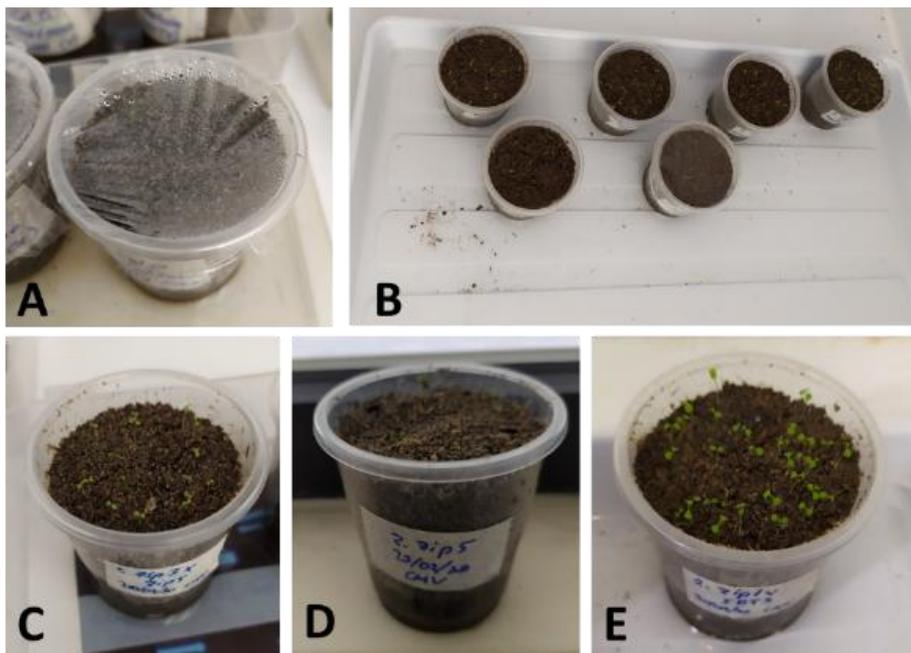
### **Establecimiento de los cultivos de *A. thaliana*.**

La fase de establecimiento de los cultivos se pudo llevar a cabo experimentalmente al inicio de la ejecución del proyecto. Se cultivaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0, de genotipo WiltD-Type, siguiendo el protocolo descrito previamente. También se cultivaron semillas con mutaciones en los transportadores de Zinc, denominados Zip1, IRT3, Zip3, Zip5, en el caso de mutantes simples, y Zip3xZip5 Zip1xIRT3, para mutantes dobles. Se hizo dos réplicas de todos los cultivos. Cada réplica consistió en un vaso donde se sembraron 10 semillas, como mínimo. Los cultivos se dejaron en refrigeración durante 4 días. Pasado ese período se llevaron a la cámara de crecimiento y después de dos días se evidenció la aparición de plántulas en la mayoría de cultivos, a excepción de Zip3xZip5 y Zip5. Después de 14 días se evidenció crecimiento en todos los cultivos y se registró un alto índice de germinación, presentándose más de 10 plantas germinadas por réplica, excepto por los clones

Zip3xZip5 y Zip5, en los que se observó el desarrollo de hasta 6 y 4 plantas, respectivamente. Los resultados de crecimiento se muestran en la figura 21.

### Figura 21

*Cultivos de A. thaliana*



*Nota.* A: cultivos de *A. thaliana* a los 4 días después de la siembra. B: Cultivos en fitotron. C: Plántulas después de 7 días de la siembra. D: Cultivo del clon Zip5 con bajo índice de germinación. E: Plántulas después de 14 días de la siembra. Fotografías tomadas por el autor

### Análisis de citotoxicidad

#### *Viabilidad Celular y Ensayo Cometa*

Se espera una reducción de la viabilidad celular en dependencia de la concentración de ZnONP. En trigo, se ha encontrado que tras la aplicación de una concentración de 300 mg/L, la viabilidad celular de las raíces se reduce a 23%, mientras que a 10 mg/L la viabilidad se mantiene en 10% (Plaksenkova et al., 2020). Al exponer *Allium cepa* y *Nicotiana tabacum*, a concentraciones superiores a 100 mg/L, se

encontró un incremento de la coloración en raíces teñidas con azul de tripano y en un orden de 3 a 4, lo cual se relaciona con una pérdida de viabilidad superior al 50% (Ghosh et al., 2016).

En *Allium cepa* sometida a concentraciones de 200 mg/L se registra una migración de cola de ADN de hasta 5%, mientras que a 400 mg/L la migración aumenta a más de 25% (Ghosh et al., 2016). Otro estudio realizado en *Allium cepa* muestra que a concentraciones de 1mg/L se puede producir una migración de cola de ADN, de hasta 40%, exhibiendo un alto grado de toxicidad (Demir et al., 2013). Los resultados que se pueden obtener en este trabajo de investigación pueden variar significativamente de los que se ha reportado, debido a que se analiza otra especie vegetal y se utiliza ZnONP originadas por síntesis verde, que muestran un menor grado de toxicidad.

### ***Efectos fisiológicos***

Diversos estudios han evaluado los efectos fisiológicos producidos en *A. thaliana*, que se dan ante la exposición de ZnONP. De la información obtenida, se nota un efecto ambivalente, evidenciándose tanto resultados inhibitorios como estimulantes. Se ha establecido que la variación en la respuesta de la planta, se da en función de la concentración de la NP. A concentraciones altas, por sobre los 50 mg/L, se reporta una marcada inhibición de la germinación, de hasta el 90% y disminución en el número de hojas (Lee et al., 2010). En otro estudio, se reporta que a concentraciones superiores a 50 mg/L, se produce una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria acompañada de un incremento en la longitud de las raíces secundarias; además se observa una disminución del área foliar y la presencia de clorosis (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014). A concentraciones superiores a 200 mg/L, se ha reportado un decremento de biomasa, marcado por una disminución del 20% en el número hojas y una reducción de su tamaño (Wang et al., 2016).

Por otro lado, a concentraciones inferiores a 50 mg/L no se reporta una inhibición significativa de la germinación, pero si se presenta una reducción en el crecimiento radicular de hasta el 85% (Lee et al., 2010). A concentraciones por debajo de 20 mg/L no se evidencia afectación al desarrollo radicular (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014). También, se ha reportado efectos estimulantes en ciertas especies, tras la aplicación de ZnONP a bajas concentraciones. (Zaeem et al., 2020) reportan que en *Linum usitatissimum*, al aplicar ZnONP a menos de 10 mg/L, se observa un incremento en el desarrollo radicular y un aumento de actividad antioxidante, evidenciada por el incremento en el contenido de compuestos fenólicos. En *Arachis hypogea*, se ha evidenciado un incremento de germinación y biomasa tras la aplicación foliar de ZnONP en concentraciones inferiores a 10 mg/L (Prasad et al., 2012). *Capsicum annum* mostró un incremento en la longitud de tallo y raíces tras la aplicación de 0.25 g y 0.5 g de ZnONP no disueltas (Afrayeem & Chaurasia, 2017). Otros estudios similares se resumen en el Anexo 5.

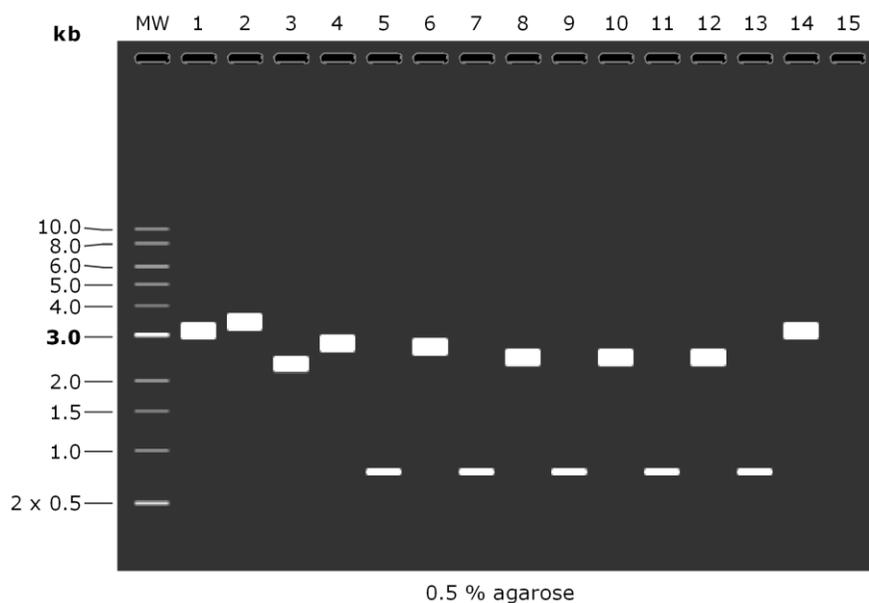
## **Construcción de CMV recombinante para la expresión de GFP**

### ***Obtención de segmentos***

El proceso de obtención de cada segmento que servirá como base para el ensamblaje de cada constructo, se lleva a cabo mediante PCR. En la figura 22 se muestra el resultado de la simulación de una electroforesis con cada segmento, realizada en un gel de agarosa al 0.5%. Las condiciones de esta electroforesis fueron 100 V durante 30 minutos, utilizando Tris-Acetato-EDTA (TAE), como buffer de electroforesis. El tamaño de cada amplicón se muestra en la tabla 29.

## Figura 22

### *Electroforesis de fragmentos para ensamblaje*



*Nota.* 1: pGreen. 2: ARN1. 3: ARN3. 4: C1ARN2. 5: C1eGFP. 6: C2ARN2. 7: C2eGFP. 8: C3ARN2. 9: C3eGFP. 10: C4ARN2. 11: C4eGFP. 12: C5ARN2. 13: C5eGFP. 14: ARN2.

## Tabla 29

*Tamaño de amplicones utilizados como segmentos para el ensamblaje Gibson*

Segmento	Tamaño
pGreen	3131 bp
ARN1	3437 bp
ARN3	2296 bp
C1ARN2	2811 bp
C1eGFP	780 bp
C2ARN2	2720 bp
C2eGFP	780 bp
C3ARN2	2478 bp
C3eGFP	780 bp
C4ARN2	2480 bp

C4eGFP	780 bp
C5ARN2	2480 bp
C5eGFP	780 bp
ARN2	3130 bp

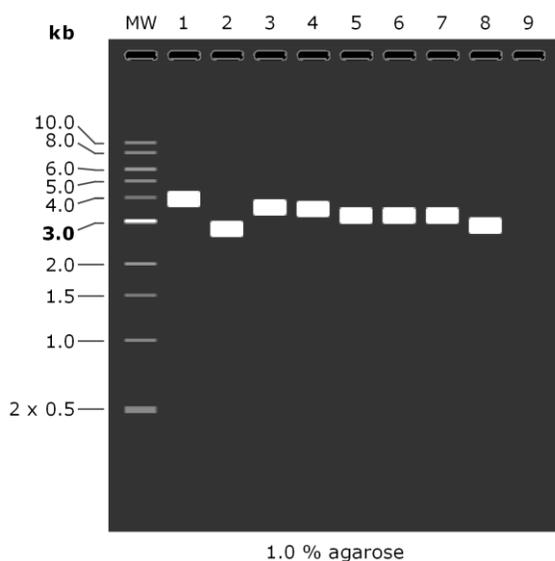
---

### ***Ensamblaje Gibson***

Tras haber aplicado la metodología de ensamblaje Gibson, o alternativamente, la de NEBuilder HiFi, se espera el correcto acoplamiento de cada segmento dentro del vector pGreen. Esto se comprueba realizando una PCR de cada segmento, con los primers especificados en las tablas 17. Al realizar una electroforesis, se espera obtener resultados similares a los que se muestra en la figura 23, que es una simulación llevada a cabo en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se ha realizado a 100 V, durante 30 minutos, utilizando el buffer TAE. El tamaño esperado de cada amplicón se especifica en la tabla 30.

### **Figura 23**

#### *Electroforesis de plásmidos*



*Nota.* 1: pARN1. 2: pARN3. 3: pC1ARN2. 4: pC2ARN2. 5: pC3ARN2. 6: pC4ARN2. 7: pC5ARN2. 8: pARN2

**Tabla 30***Tamaño de los amplicones obtenidos tras ensamblaje*

<b>Plásmido</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC</b>	<b>Amplicon</b>
pARN1	pARN1_FW	gcagattaccgccaactcag	58	55	3982 pb
	pARN1_RV	AAGTCGTGTCTTACCGGGTT	58	55	
pARN3	pARN3_FW	gatcggagggaggattctgg	57	60	2806 pb
	pARN3_RV	AAGTCGTGTCTTACCGGGTT	58	50	
pC1ARN2	pC1ARN2_FW	ctgtacagctcgccatgc	57	55	3592 pb
	pC1ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC2ARN2	pC2ARN2_FW	ctgtacagctcgccatgc	57	55	3501 pb
	pC2ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC3ARN2	pC3ARN2_FW	ctgtacagctcgccatgc	57	55	3259 pb
	pC3ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC4ARN2	pC4ARN2_FW	ctgtacagctcgccatgc	57	55	3261 pb
	pC4ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pC5ARN2	pC5ARN2_FW	ctgtacagctcgccatgc	57	55	3261 pb
	pC5ARN2_RV	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	58	55	
pARN2	pARN2_FW	caacacgatcagtagcacgg	58	55	2921 PB
	pARN2_RV	CAGGCCGCGATTAAATTCCA	57	50	

Según las instrucciones del fabricante, al realizar el proceso de ensamblaje de Gibson, se espera una eficiencia superior al 90% en los controles, pero este valor puede variar según las características de la bacteria, la eficiencia de transformación en función del protocolo que se utilice y las condiciones de crecimiento. En *A. tumefaciens*, se ha

reportado una eficiencia de hasta el 80% de colonias que muestran la presencia del plásmido libre de errores (Tuo et al., 2017). Se ha reportado que la aplicación del Nebuilder HiFi, puede dar un incremento en la eficiencia de hasta 10% (Birla & Chou, 2015).

### ***Electroporación en A. tumefaciens***

La eficiencia de transformación se calcula tras sembrar las células competentes, en medio Agar-LB con Kanamicina a 50 µg/mL y Rifampicina a 50 µg/mL. Se cuenta el número de colonias que se forman tras dos días de incubación y el resultado se expresa como unidades formadoras de colonias (CFU)/µg de ADN (Kámán-Tóth et al., 2018). La cantidad de ADN se calcula en la formación de la concentración del plásmido que se utilizó para la transformación.

### ***Colony PCR***

Tras haber transformado los plásmidos en *A. tumefaciens*, se aplica el protocolo de PCR para confirmar la presencia e integridad de los plásmidos. Los resultados de electroforesis deben coincidir con los presentados en la figura 23 y los amplicones deben tener el tamaño descrito en la tabla 30.

### ***Agroinfiltración de CMV en A. thaliana***

Tras la inoculación de CMV en *A. thaliana*, mediada por agroinfiltración, se espera que se produzca una infección sistémica en la planta. Tras 10 días de inoculación se espera el desarrollo de síntomas de mosaico en las hojas inoculadas a consecuencia de la presencia viral en los meristemas apicales y una acumulación de la proteína CP (Ryu et al., 2004). La acumulación de CP es un indicador de la alta carga viral, que se espera cuantificar por qRT-PCR. A los 7 días de inoculación también se ha reportado la presencia del virus en primordios florales. Tras 42 días se da una limitación de crecimiento, reducción de biomasa e inhibición de floración (Zhang et al., 2017). A

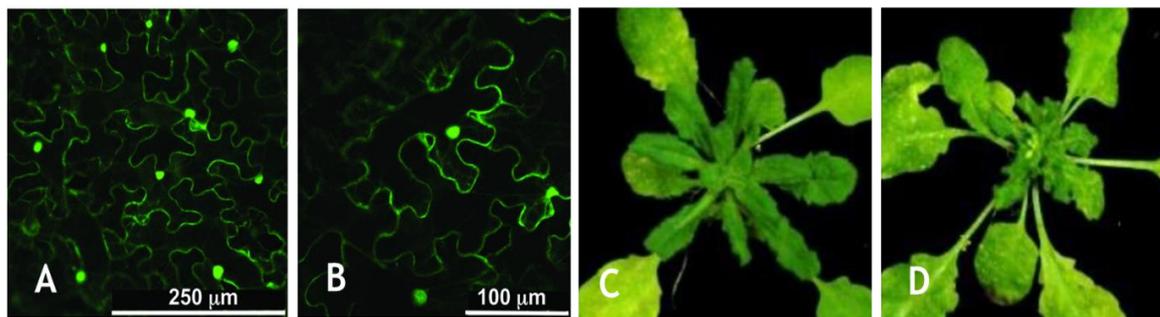
los 14 días se puede presentar una deformación pronunciada de las hojas y el virus se podría expandir a los brotes en desarrollo. Dependiendo de la severidad de la infección, la expansión del virus se puede acelerar provocando marcados efectos a los 21 días, que incluyen el marchitamiento de la mayoría de hojas y disminución de su tamaño (Elsharkawy et al., 2013).

### **Visualización del movimiento de CMV recombinante dentro de *A. thaliana* por fluorescencia**

En relación al CMV recombinante capaz de expresar eGFP, se espera que tenga una dinámica de infección similar al Wild-Type, siguiendo las mismas etapas que se describieron previamente. Se puede establecer que el virus es válido para el objetivo de estudio, cuando este es capaz de provocar una infección sistémica, sin una pérdida temprana de fluorescencia. En las figura 24 y 25, se muestra el fenotipo de una planta infectada con CMV y como se esperaría que fuera la visualización del virus mediante microscopía de fluorescencia.

### **Figura 24**

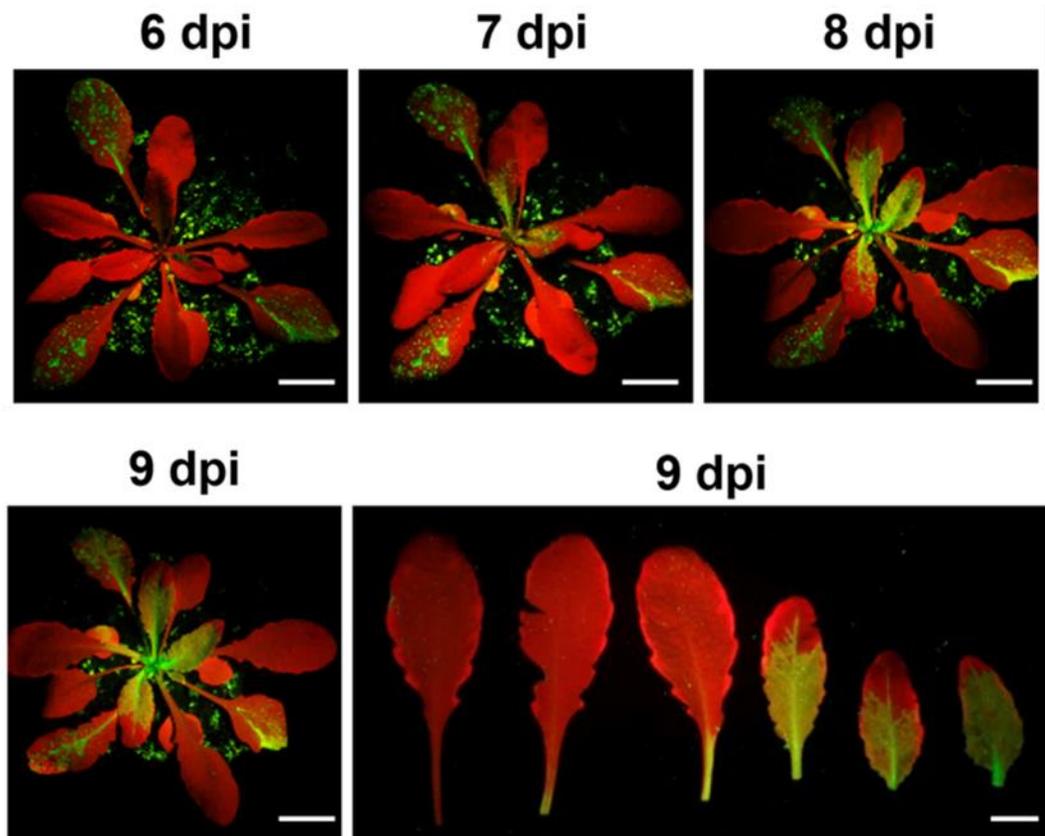
*Efectos de CMV en A. thaliana*



*Nota.* A y B: visualización por microscopía de fluorescencia de la ubicación celular de CMV expresando GFP, modificado de (Watt et al., 2020). C: efectos de CMV en el ecotipo Col-0. D, efectos de CMV en el ecotipo sgs3. Modificado de (Zhang et al., 2019).

**Figura 25**

*Visualización de virus fluorescente en A. thaliana*



*Nota.* Observaciones de *Turnip mosaic virus* (TuMV) que expresa GFP. Se espera que los resultados obtenidos tras la ejecución sean similares tras excitación con luz UV. Modificado de (Zhang et al., 2019).

## Capítulo V: Discusión

### Caracterización de las nanopartículas sintetizada

El cambio de coloración que se produce en la mezcla de reacción, tras la incubación, se puede utilizar como un indicador del progreso de síntesis, que se detiene cuando la reacción se ha completado (Naseer et al., 2020). Este fenómeno se produce por la incitación de vibraciones en la superficie de los plasmones de las ZnONP, lo cual interviene en las propiedades de reflexión de luz (Ezealisiji et al., 2019).

Los factores que mayor influencia tienen en las propiedades de las NP son el pH y temperatura de reacción (Rahaiee et al., 2020). Se ha establecido que a una mayor temperatura de síntesis, disminuye el tamaño de la NP, por lo que se sugiere una temperatura de incubación no mayor a 60°C (Talam et al., 2012). Se recomienda mantener niveles de pH básicos, puesto se ha evidenciado una mayor eficiencia de reducción en este tipo de entornos (Akintelu & Folorunso, 2020). Se ha establecido que las ZnONP sintetizadas a un pH superior a 10, tienden a presentar un mayor tamaño, en base a los estudios reportados en el Anexo 1. De acuerdo con (Thi et al., 2020), se recomienda someter al producto de reacción, a una temperatura de calcinación por encima de 700°C, puesto que se evidencia la formación de ZnONP con un tamaño superior a 50 nm, lo cual es una característica deseada para la realización de este proyecto. Este incremento de tamaño dependiente de la temperatura, se debe a la expansión de la estructura cristalina de las ZnONP (Bala et al., 2014). El tamaño de la ZnONP se puede dar en dependencia de la cantidad de grupos reductores que contiene el extracto vegetal, de modo que al existir más grupos reductores, se tiene una mayor eficiencia de reducción, que da lugar a la formación de NP más pequeñas (Naseer et al., 2020).

Se considera que los grupos presentes en los extractos vegetales, generalmente flavonoides, alcaloides, carotenoides, polifenoles, son los encargados de la reducción

de los iones  $Zn^{+2}$  y actúan como agentes estabilizantes y protectores (Ezealisiji et al., 2019; Naseer et al., 2020). La presencia de estos grupos se comprueba con el análisis de FTIR, el cual puede dar evidencia de la presencia de diversos compuestos, en función de las frecuencias encontradas, que se muestran en la tabla 28. En base a las conclusiones establecidas por (Bhumi & Savithamma, 2014; Luque et al., 2018; Thi et al., 2020), se puede inferir que el mecanismo de síntesis inicia por la ionización de la sal de Zn, que libera  $Zn^{+2}$  al medio acuoso. Los iones  $Zn^{+2}$  interactúan con los electrones libres de los compuestos orgánicos presentes en el extracto vegetal, formando complejos, que ante la influencia de una temperatura superior a  $400^{\circ}C$  se separan, dando como resultando las NP de ZnO. De este modo los principios activos del extracto vegetal actúan como agentes reductores que permiten la transición de  $Zn^{+2}$  a ZnONP.

#### ***Análisis de UV-Vis***

El ensayo de espectroscopia UV-Vis comúnmente se utiliza para la caracterización de ZnONP obtenidas por síntesis verde, puesto que permite comprobar su formación según el SPR. El apareamiento del SPR se da por la interacción entre la luz y los electrones libres de la superficie de las NP, que produce ondas electromagnéticas evanescentes que tienen un máximo de absorción en el rango de 300-400 nm (Santorum, 2017). La localización del SPR puede variar en función de las propiedades ópticas, la forma y el tamaño de la NP (Tomaev et al., 2019). El SPR promedio obtenido de los datos listados en el Anexo 1, tiene un valor de  $46.7 \pm 31.2$ , que se encuentra dentro del rango establecido para ZnONP de 289-385 nm (Rajakumar et al., 2018). El valor de absorbancia que presenta el SPR, depende en gran medida del tamaño de las ZnONP, de modo que su valor aumenta al incrementarse en 15-40 nm el tamaño de la NP (Goh et al., 2014).

### ***Observaciones de TEM y SEM***

Las ZnONP obtenidas por síntesis verde pueden adquirir una forma esférica o hexagonal en dependencia del precursor vegetal que se utilice. Las ZnONP por naturaleza presentan una estructura hexagonal, confirmada por análisis de XRD, pero pueden adquirir formas esféricas debido a la presencia de los grupos funcionales adsorbidos en su superficie (Dhandapani et al., 2020). La forma esférica también puede ser resultado de la adsorción de proteínas y péptidos. No solo la presencia de grupos activos es responsable de la reducción de los iones  $Zn^{+2}$ , sino que además se puede dar la reducción por parte de proteínas. La presencia de grupos C-H y N-H puede sugerir una adsorción de proteínas, péptidos y aminoácidos, lo cual es una característica deseable, porque proveen estabilidad a las Zn y evitan su aglomeración (Naseer et al., 2020; Ramesh et al., 2015). La aglomeración de ZnONP es un fenómeno que ocurre frecuentemente, dado por la atracción electrostática que existe entre cada NP. La tendencia a la formación de cúmulos puede presentar efectos indeseables como una limitación en la movilización de las ZnONP y una interferencia en la interacción con otras moléculas (Fatehah et al., 2014). La dinámica de aglomeración parece ser distinta en relación al precursor de Zinc que se utiliza. (Divya et al., 2013; Fakhari et al., 2019) han reportado que al utilizar Acetato de Zinc se da evidencia una mayor aglomeración, adquiriendo formas de racimos, en comparación con Nitrato de Zinc que presenta una menor aglomeración en forma de varas.

### ***Análisis de XRD***

Cada pico se evalúa de manera independiente y debe producir un tamaño del dominio al cristalino consistente. El  $D_p$  no es necesariamente igual al tamaño de partícula, porque la misma puede ser policristalina, teniendo varios dominios cristalinos. Los valores de plano permiten determinar la pureza de la muestra, puesto que la

presencia de picos adicionales evidencia la presencia de impurezas (Begum et al., 2018). Es posible que se presenten picos que no corresponden a los característicos de ZnO, que pueden ser resultados de la cristalización de fases bioorgánicas provenientes del extracto vegetal, adheridas en la superficie de las ZnONP (Roshitha et al., 2019).

### **Análisis de FTIR**

La información obtenida tras el análisis de FTIR permite inferir que clase de grupos funcionales provenientes del extracto vegetal estuvieron involucrados en la síntesis de ZnONP. Al análisis de las ZnONP se le puede complementar un análisis previo del extracto vegetal puro, de modo que se pueda determinar que grupos funcionales se mantuvieron en el proceso de síntesis (Ezealisiji et al., 2019). Para la caracterización de las ZnONP se ha utilizado también la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), pero no se recomienda su aplicación en este trabajo porque la información provista por los demás ensayos mencionados previamente es suficiente para establecer las características de las ZnONP. Además se ha reportado que esta técnica es significativamente menos precisa en la medición de la distribución del tamaño promedio de las NP (Hondow et al., 2012).

### **Establecimiento de los cultivos de *A. thaliana*.**

La dinámica normal de crecimiento que se espera para un cultivo de *A. thaliana* ecotipo Col-0 se describe a continuación en base a las etapas de formación descritas por (Boyes et al., 2001). Tras sembrar la semilla en el sustrato apropiado, se espera que surja la radícula después de 4.3 días y el hipocotiledón y cotiledón, después de 5.5 días. Los cotiledones se pueden encontrar completamente abiertos a los 6 días y aparecen las dos primeras hojas a los 12.5 días. Se espera la formación de hasta 14 hojas, con una longitud superior a 1 mm, dentro de 25.5 días. La roseta alcanza su crecimiento completo a los 29.3 días. La primera flor empieza a aparecer a los 26 días y se abre a

los 31.8 días. El proceso de floración se completa a los 49.4 días. La senescencia inicia después de la maduración de los frutos que se presentan como silicuas lineares, a los 48 días. Dentro de cada silicua se puede encontrar hasta 30 semillas. (Lièvre et al., 2016; Wieters et al., 2021).

Se puede presentar variaciones a los tiempos establecidos en este estudio, debido a las diferencias en las condiciones. Para este caso se considera condiciones ambientales estándar con un fotoperiodo de 16 horas. La pérdida de viabilidad de los mutantes Zip5 y Zip3xZip5, puede darse como consecuencia de la mutaciones del gen que han sufrido estas plantas, lo cual generalmente tiene repercusiones en la morfología y el tiempo de desarrollo (Masson & Paszkowski, 1997). También se pudo presentar un menor índice de germinación porque las condiciones a las que fueron sometidos los cultivos no fueron apropiadas para estas variedades.

### **Citotoxicidad de las nanopartículas en *A. thaliana***

La citotoxicidad de las ZnONP es un aspecto importante a evaluar, no solo por la interferencia en los ensayos que se puede presentar en el trabajo de investigación, sino por el potencial riesgo de contaminación que representa la liberación de estas NP. Se conoce que anualmente se libera un promedio de 101 a 1000 toneladas de este material, por su inclusión en cosméticos y pinturas, lo cual puede causar efectos adversos en pequeños vertebrados, invertebrados, organismos acuáticos y plantas (Hou et al., 2018; Piccinno et al., 2011; Vimercati et al., 2020). Se espera que las ZnONP ejerzan una limitada toxicidad, debido a su naturaleza de síntesis verde, que ha sido descrita como menos tóxica en comparación a las resultantes de síntesis química (Hamed & Elsharkawy, 2019).

Se ha demostrado que el grado de toxicidad que ejercen las ZnONP es dependiente de la concentración a la que se expone la planta (Lin & Xing, 2008). Esto

concuenda con los efectos reportados por (Lee et al., 2010). Los efectos fisiológicos ejercidos por las ZnONP se dan por su facilidad de movimiento a través del plasmodesmo, la pared celular y la membrana plasmática (Arruda et al., 2015). Se sugiere que la toxicidad ejercida por las ZnONP, es producto del estrés que provocado por la NP, en función de su superficie, tamaño y forma (Brunner et al., 2006). Se especula que una parte de la toxicidad se debe a la presencia de iones  $Zn^{+2}$ , que se liberan por la disolución de las ZnONP en el medio circundante, y que pueden afectar a la planta a partir de concentraciones superiores a 43 mg/L (Franklin et al., 2007; Paschke et al., 2000). (Lee et al., 2010) establece que en una concentración de 400 mg/L de ZnONP, se libera 14.6 mg/L de  $Zn^{+2}$ . En el estudio realizado por (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014), no se reporta un incremento en la concentración de  $Zn^{+2}$  en *A. thaliana*, tras la exposición a ZnONP, que se administró en el medio, a concentraciones inferiores a 200 mg/L. Sin embargo, si se presentó un incremento significativo de la concentración de los iones en las raíces. Esto se puede explicar por el factor de translocación de las ZnONP, que se refiere a la capacidad de movimiento desde las raíces a las hojas, y que en *A. thaliana* tiene un índice bajo, de 0.01 a 0.02 (Lee et al., 2010; Raliya et al., 2015).

El alto grado de inhibición en la germinación que se ha reportado en los estudios de (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014; Kellermeier et al., 2014; Lee et al., 2010) puede ser resultado del contacto directo de las semillas, con las ZnONP dispersas en el medio. Esto puede provocar que se dé un contacto con el embrión, tras ingresar a través de pequeños poros en la cubierta de la semilla (Van Dongen et al., 2003). La reducción de la biomasa puede ser provocada por una disminución en la fotosíntesis, en un grado de 60%, a una concentración de 300 mg/L (Wang et al., 2016). A esta concentración también se produce una reducción en la tasa de respiración, con la

misma intensidad. Las alteraciones en el desarrollo radicular pueden darse a consecuencia de la disminución en los niveles de Fósforo, Potasio, Azufre y Cobre. El déficit de nutrientes en *A. thaliana* tiene como principales consecuencias la alteración en el desarrollo normal del sistema radicular (Kellermeier et al., 2014).

Los análisis de expresión genética realizados en *A. thaliana* expuesta a ZnONP, muestran una sobreexpresión de los genes AtHMA3 y AtHMA4 en las hojas y un decremento general en la expresión de los genes de la familia ZIP (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014). AtHMA3 produce una proteína asociada a metales pesados, que se encarga de desintoxicar a la planta mediante secuestro vacuolar, ante la presencia de metales pesados, (Morel et al., 2009). AtHMA4 ayuda en el transporte de Zn de la raíz a los brotes (Kendziorek et al., 2016). La familia de genes ZIP, influyen en el transporte de metales pesados incluyendo Zn (Zheng et al., 2018), y podría ser una respuesta para prevenir la acumulación en exceso de Zn. La variación de la expresión de estos genes, muestran las estrategias que usa *A. thaliana* ante la presencia de contaminantes y puede llevar al apareamiento de efectos secundarios.

Los efectos benéficos que presentan las ZnONP en ciertas especies vegetales, pueden darse como un efecto del ligero estrés provocado a bajas concentraciones, lo cual promueve la liberación de hormonas de desarrollo y aumento de la actividad metabólica. El incremento en el desarrollo también puede darse por la acción como cofactor que cumple el Zn (Moghadam et al., 2013; Thiruvengadam et al., 2015).

En base a los estudios revisados, se espera que a la concentración más alta de 1000 µg/mL, se produzcan efectos citotóxicos que puedan comprometer la integridad de la planta, pero a concentraciones menores a 100 µg/mL, el efecto citotóxico no sería muy pronunciado y por la estimulación en la respuesta inmune de la planta, se podría ver incluso efectos estimulantes. Debido a la baja tasa de translocación de las ZnONP,

no se esperaría afecciones considerables a la raíz, puesto que la aplicación se da por rociado foliar. A pesar de que se tiene una buena idea de los posibles efectos que tendrán las ZnONP en el cultivo, no se puede establecer conclusiones concretas, porque se pueden presentar variaciones debidas mayoritariamente a la composición del suelo, condiciones ambientales, condiciones propias de la planta y las características de las NP que se apliquen.

### **CMV recombinante para la expresión de GFP**

#### ***Consideraciones para el diseño de CMV con expresión de GFP***

En diversos estudios se ha logrado expresar GFP en el vector viral de CMV, para estudiar la dinámica de su infección dentro de algunas plantas. (Canto & Palukaitis, 1999) describen un ensamblaje de GFP en asociación con las proteínas de movimiento 3A y CP. Se evidenció una exitosa expresión de GFP en la cápside del virus, pero debido a que GFP altera la correcta expresión de 3A y CP, se pierde la movilidad del virus, limitando su distribución al punto de inoculación. De igual modo, en el trabajo realizado por (Fujiki et al., 2008), la expresión de GFP se hizo en el segmento ARN 3, bajo el promotor subgenómico de ARN 4 localizado aguas arriba del gen de movimiento CP. Sin embargo, bajo esa estrategia se reporta que se restringe el movimiento intercelular y la infección se limita a las hojas que son inoculadas, no habiendo una infección sistémica como se desea para este estudio.

En el estudio realizado por (Krenz et al., 2015), se aprovechó una estrategia en la que se interviene el segmento de ARN 2, inicialmente propuesta por (Otagaki et al., 2006; Matsuo et al., 2007; Takeshita et al., 2011), en la que se utiliza el promotor subgenómico que regula la transcripción del supresor de silenciamiento 2b, localizado en el 2 ARN. Esta estrategia ha mostrado ser más efectiva para mantener una expresión constante de GFP, al mismo tiempo que se asegura una infección sistémica

(Takeshita et al., 2011). Bajo esta estrategia se produce una porción truncada del gen 2b, al disectar un tercio del gen, pero que a pesar de ello, su actividad se asemeja a la del WT. Sin embargo esta estrategia no resulto ser efectiva al ser probada en varias especies de *Nicotiana* y por tanto se propone probar algunos constructos en *A. thaliana* para determinar cual tiene mayor eficiencia en producción de GFP e infección sistémica.

En los estudios realizados por (Krenz et al., 2015; Takeshita et al., 2011; X. Yang et al., 2018) se ha mostrado que el uso de Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) facilita el seguimiento de la infección sistémica del virus, en comparación al uso de la GFP wild-type. El mutante eGFP fue diseñado inicialmente por (Cormack et al., 1996) y se caracteriza por presentar un aumento de 100 veces en la intensidad de emisión tras la excitación con luz UltraVioleta, lo cual se traduce en un brillo más acentuado, que hace más notoria su distribución en tejidos (Cinelli et al., 2000)

### ***Ensamblaje Gibson y Nebuilder HiFi***

La técnica de Gibson permite llevar a cabo una reacción de ligación entre varios segmentos, hasta un tamaño total de 300 Kb, en un solo paso, de manera isotérmica (Gibson et al., 2009). Esta técnica se basa en el principio de homología de productos de PCR con solapamiento de 20 a 40 bp, de modo que al existir dos segmentos cuyos solapamientos se complementan, se da una reacción de ligación que inicia por la generación de extremos cohesivos, tras la acción de una exonucleasa que escinde los nucleótidos de una de las cadenas, en dirección 5'. Posteriormente se da el alineamiento de los segmentos y una ADN polimerasa se encarga de incorporar los nucleótidos faltantes. Finalmente una ADN ligasa une covalentemente los segmentos de ADN. Todo el proceso se realiza a una misma temperatura, de aproximadamente 50°C (Gibson et al., 2009; Xia et al., 2019).

Es posible que se introduzcan errores en la secuencia tras el ensamblaje, a una tasa de 1 error por 50 moléculas de ADN que se unen (Gibson et al., 2009). Debido a que en este trabajo, se unen únicamente hasta 3 segmentos, es poco probable que se introduzcan errores en la secuencia. La limitada tasa de error de esta técnica de ensamblaje, se puede explicar por la protección que tiene la parte interna de cada ADN, al permanecer como doble cadena (Birla & Chou, 2015).

El ensamblaje de Gibson ha sido previamente utilizado para la construcción de sistemas de virus recombinantes que expresan proteínas fluorescentes, entre los que se incluye Lettuce mosaic virus (LMV), Papaya ringspot virus (PRSV), Papaya leaf distortion mosaic virus (PLDMV), Tomato blistering mosaic virus (ToBMV) (Blawid & Nagata, 2015; Bordat et al., 2015; Tuo et al., 2017).

La técnica de ensamblaje NEBuilder HiFi, se ha diseñado en base a la metodología de Gibson, con la diferencia de que utiliza una polimerasa y una exonucleasa de mayor fidelidad (Rabe & Cepko, 2020). Presenta un incremento en la eficiencia de ensamblaje, con menor ocurrencia de errores, debido a la remoción de acoplamiento erróneos (Birla & Chou, 2015). Se ha descrito estas dos técnicas de ensamblaje porque para ambas se puede utilizar los mismos sets de primers y su costo es relativamente bajo. Es posible que se pueda presentar problemas de eficiencia de ensamblaje al usar la técnica de Gibson, y la presencia de errores debidos a una actividad endonucleasa inherente de la exonucleasa T5 (Rabe & Cepko, 2020). Se espera que al reemplazar el kit de Gibson por el de NEBuilder HiFi, se tenga una mayor eficiencia de ensamblaje, en caso de que no se tengan óptimos resultados con la técnica de Gibson (Birla & Chou, 2015).

En relación a los cinco constructos propuestos, es posible que el constructo 1 muestre una mayor expresión de GFP, pero no sea capaz de lograr una infección

sistémica, como se demostró en el trabajo de (Watt et al., 2020). Sin embargo no se puede establecer conclusiones concretas en sobre cuál de los constructos será capaz de inducir una infección sistemática al mismo tiempo que se asegura la expresión de eGFP. (Krenz et al., 2015) reportó diferencias en el comportamiento de cada constructo entre los hospederos. En *Nicotiana tabacum*, los constructos 2, 3 y 4 no produjeron infección sistémica. En *Nicotiana clevelandii*, ninguno de los constructos fue infeccioso y en *Nicotiana benthamiana*, se registró una infección sistémica para todos los constructos.

### **Transformación en *A. tumefaciens***

Se recomienda que tras haber concluido con el proceso de ensamblaje, los plásmidos resultantes sean transformados directamente en *A. tumefaciens*. Esto permite optimizar el tiempo de trabajo, evitando hacer una transformación previa en *E. coli*. También se ha demostrado que la inserción de algunos virus dentro de *E. coli*, produce toxicidad en la bacteria, disminuyendo la eficiencia de clonación (Bedoya & Daròs, 2010; Tuo et al., 2017). El plásmido pGreen es un vector de alto número de copias que puede generar toxicidad, pero que muestra ser estable en *A. tumefaciens*, por la capacidad de esta bacteria de soportar altos niveles de toxicidad (Hellens et al., 2000).

### **Agroinfiltración**

Existen diversas estrategias para la inoculación viral en planta, siendo las más populares, la inoculación Sap o por daño mecánico, y la agroinfiltración. Para este estudio se ha optado por la agroinfiltración, debido a que este sistema de entrega viral permite simular las condiciones naturales de infección y se asegura la integridad de los genomas virales (Choi et al., 2018; Seo et al., 2009). Además, debido a que se busca la expresión de eGFP, es necesario inocular el virus dentro de un vector, de modo que se

disminuya el riesgo de perder el gen de eGFP por recombinación (Liao et al., 2015; Seo et al., 2008).

### **Efecto de las nanopartículas en el movimiento de CMV en *A. thaliana***

El efecto que pueden tener las ZnONP en la respuesta hormonal de *A. thaliana*, ha sido estudiado por (Vankova et al., 2017), y se ha encontrado que a concentraciones superiores a 20 mg/L, disminuye la producción de auxinas y citoquininas en los brotes, y también hay un aumento de las hormonas de estrés, cis-zeatina y ácido abscísico, en hojas y ápices. La expresión de estas hormonas sugiere una estimulación en los mecanismos de defensa de la planta, lo cual puede traer como consecuencia una mayor eficiencia en la supresión de ciertos fitopatógenos.

Se ha reportado varios efectos que ejercen las ZnONP a nivel intracelular, que incluyen: un aumento de las especies reactivas de oxígeno seguido de un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, sobreexpresión de proteínas de respuesta a daño y chaperoninas, y sobreexpresión de genes involucrados en la reparación de ADN (Gopalakrishnan Nair & Chung, 2014; Vankova et al., 2017; L. Zhao et al., 2012).

La respuesta antiviral que se puede presentar en la planta tras la aplicación de las ZnONP, puede darse por el estrés oxidativo que induce las NP, y que provoca un aumento de moléculas antioxidantes (Zafar et al., 2016). La respuesta ante el estrés oxidativo que se da en la planta puede activar mecanismos de inmunidad que contribuyen a la respuesta antiviral

Abdelkhalek & Al-Askar (2020) investigaron el efecto de las ZnNP sobre la expansión de TMV en *Datura stramonium* y se reporta que tras la aplicación ZnNP, a una concentración de 100 µg/mL, se da una disminución en el número de lesiones, una mejora en el crecimiento de la planta y una menor carga viral. Se evaluó también el

efecto de la aplicación previo a la infección y post infección, y se muestra que ambas estrategias tienen eficacia antiviral. Cuando se juntan ambas estrategias se puede observar hasta un 90.21% de reducción en la carga viral. Cai et al., (2019) reporta una inhibición en la expansión viral de *Tobacco mosaic virus* (TMV), en *Nicotiana benthamiana*, tras la aplicación foliar de ZnONP por 12 días, posiblemente por la unión de la NP con la envoltura glicoproteica del virus.

Se ha revisado estudios sobre el efecto antiviral que tienen las ZnNP en diferentes hospederos y en base a esos resultados se puede hipotetizar que se espera una reducción en la expansión viral tras la aplicación de las ZnNP, habiendo una mayor eficacia cuando se lo aplica como tratamiento preventivo. No se pueden establecer conclusiones sobre el efecto de las nanopartículas sobre CMV en *A. thaliana*, porque ningún estudio se ha realizado con el virus y el hospedero que se propone en este proyecto.

## Capítulo VI: Conclusiones

Se ha realizado una evaluación teórica del posible efecto inhibitorio que ejercen las nanopartículas de zinc, en el movimiento de *Cucumber mosaic virus*, dentro de *Arabidopsis thaliana*. Se ha encontrado que hay una alta probabilidad de inhibición del virus, dado por la potenciación de respuestas inmunitarias en la planta ante los efectos de estrés que inducen las nanopartículas.

Se ha recopilado y analizado información obtenida de trabajos de investigación científica, y se ha establecido una base teórica que permite explicar los mecanismos de síntesis de nanopartículas de Zinc, la importancia de su caracterización, su posible efecto citotóxico y el rol que cumplirían en su uso como tratamiento antiviral.

Se ha definido los protocolos requerido para cada fase de la investigación, de modo puedan ser ejecutados posteriormente en un trabajo experimental.

Se ha diseñado un clon infeccioso de *Cucumber mosaic virus* que exprese de la proteína verde fluorescente (GFP) en su cápside y se ha definido la metodología que permitiría su construcción en laboratorio.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda probar la efectividad de los clones infecciosos de CMV propuestos en este estudio, también en *Nicotiana Benthamiana*, como una forma de control debido a la eficacia que se ha reportado en esta especie de ser infectada por versiones recombinantes de CMV.

Se recomienda hacer un estudio de modelamiento molecular, para investigar la posible interacción entre las ZnONP con la proteína de movimiento del virus.

Para la síntesis de ZnONP, se recomienda hacer un análisis de FTIR, del extracto vegetal, de modo que se tenga información de los grupos funcionales encontrados en la planta. Esta información permitiría determinar qué grupos funcionales pudieron estar involucrados en la reducción, al hacer una comparación con los resultados de las NP.

Para los ensayos de citotoxicidad, se recomienda priorizar la evaluación de los efectos fisiológicos.

### Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdelkhalek, A., & Al-Askar, A. A. (2020). Green Synthesized ZnO Nanoparticles Mediated by *Mentha Spicata* Extract Induce Plant Systemic Resistance against Tobacco Mosaic Virus. *Applied Sciences*, 10(15), 5054.  
<https://doi.org/10.3390/app10155054>
- Abraham, J., Jose, B., Jose, A., & Thomas, S. (2020). Chapter 2—Characterization of green nanoparticles from plants. In N. Thajuddin & S. Mathew (Eds.), *Phytonanotechnology* (pp. 21–39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822348-2.00002-4>
- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., & Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537–545.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>
- Afrayeem, S. M., & Chaurasia, A. K. (2017). Effect of zinc oxide nanoparticles on seed germination and seed vigour in chilli (*Capsicum annum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 1564–1566.
- Ahmed, S., Annu, Chaudhry, S. A., & Ikram, S. (2017). A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: A prospect towards green chemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.011>
- Ahn, J.-W., Yin, C.-J., Liu, J. R., & Jeong, W.-J. (2010). Cucumber mosaic virus 2b protein inhibits RNA silencing pathways in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Reports*, 29(9), 967–975. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0882-0>

- Akintelu, S. A., & Folorunso, A. S. (2020). A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Extracts and Its Biomedical Applications. *BioNanoScience*, 10(4), 848–863. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00774-6>
- Amaguaña, D. (2018). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductor químico el extracto acuoso de las hojas de sensitiva (Mimosa albida)*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/15265>
- Anil Kumar, S., Abyaneh, M. K., Gosavi, S. W., Kulkarni, S. K., Pasricha, R., Ahmad, A., & Khan, M. I. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. *Biotechnology Letters*, 29(3), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9256-7>
- Annamalai, P., & Rao, A. L. N. (2006). Delivery and expression of functional viral RNA genomes in planta by agroinfiltration. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 16, 16B.2.1-16B.2.15. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b02s01>
- Ansari, M. A., Murali, M., Prasad, D., Alzohairy, M. A., Almatroudi, A., Alomary, M. N., Udayashankar, A. C., Singh, S. B., Asiri, S. M. M., Ashwini, B. S., Gowtham, H. G., Kalegowda, N., Amruthesh, K. N., Lakshmeesha, T. R., & Niranjana, S. R. (2020). Cinnamomum verum Bark Extract Mediated Green Synthesis of ZnO Nanoparticles and Their Antibacterial Potentiality. *Biomolecules*, 10(2), 336. <https://doi.org/10.3390/biom10020336>
- Aragonés, C. G. (2014). *Study of Cucumber mosaic virus infection in the resistant melon accession PI 161375* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=91111>
- Armendáriz, I., Landázuri, P. A., Taco, J. M., & Ulloa, S. M. (2016). Efectos del control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en el plátano. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 319–327.

- Aromal, S., & Philip, D. (2012). Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *97*, 1–5.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.083>
- Arruda, S. C. C., Silva, A. L. D., Galazzi, R. M., Azevedo, R. A., & Arruda, M. A. Z. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, *131*, 693–705.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C., & Martínez-Zapater, J.-M. (2005). Environmental regulation of flowering. *The International Journal of Developmental Biology*, *49*(5–6), 689–705. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052022ia>
- Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., & Nandy, P. (2014). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: Effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, *5*(7), 4993–5003. <https://doi.org/10.1039/C4RA12784F>
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M., & da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *15*, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>
- Bao, W., Yan, T., Deng, X., & Wuriyangan, H. (2020). Synthesis of Full-Length cDNA Infectious Clones of Soybean Mosaic Virus and Functional Identification of a Key Amino Acid in the Silencing Suppressor Hc-Pro. *Viruses*, *12*(8), 886.  
<https://doi.org/10.3390/v12080886>
- Barzinjy, A. A., & Azeez, H. H. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Eucalyptus globulus* Labill. Leaf extract and zinc nitrate hexahydrate salt. *SN Applied Sciences*, *2*(5), 991.  
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-2813-1>

- Bayrami, A., Haghgoie, S., Rahim Pouran, S., Mohammadi Arvanag, F., & Habibi-Yangjeh, A. (2020). Synergistic antidiabetic activity of ZnO nanoparticles encompassed by *Urtica dioica* extract. *Advanced Powder Technology*, 31(5), 2110–2118. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2020.03.004>
- Bedoya, L. C., & Daròs, J.-A. (2010). Stability of Tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research*, 149(2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.02.004>
- Begum, S., Ahmaruzzaman, Md., & Adhikari, P. P. (2018). Ecofriendly bio-synthetic route to synthesize ZnO nanoparticles using *Eryngium foetidum* L. and their activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters*, 228, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.05.091>
- Bhumi, G., & Savithamma, N. (2014). Biological Synthesis of Zinc oxide Nanoparticles from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Leaf extract and validation for antibacterial activity. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(1). [https://www.ijddr.in/abstract/biological-synthesis-of-zinc-oxide-nanoparticles-from-catharanthusrnroseus-l-g-don-leaf-extract-and-validation-for-antibacterial-activity-5450.html](https://www.ijddr.in/abstract/biological-synthesis-of-zinc-oxide-nanoparticles-from-catharanthusroseus-l-g-don-leaf-extract-and-validation-for-antibacterial-activity-5450.html)
- Bilichak, A., Yao, Y., Titov, V., Golubov, A., & Kovalchuk, I. (2014). Genome stability in the uvh6 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33(6), 979–991. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1580-0>
- BioSpace. (2015). *New England Biolabs, Inc. Introduces Novel Cloning And DNA Assembly Method: NEBuilder® HiFi*. BioSpace. <https://www.biospace.com/article/new-england-biolabs-inc-introduces-novel-cloning-and-dna-assembly-method-nebuilder-and-174-hifi/>

- Birla, B. S., & Chou, H.-H. (2015). Rational Design of High-Number dsDNA Fragments Based on Thermodynamics for the Construction of Full-Length Genes in a Single Reaction. *PLoS ONE*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145682>
- Blawid, R., & Nagata, T. (2015). Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *Journal of Virological Methods*, *222*, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.003>
- Bonilla, A. (2009). *Manejo Fitosanitario de las principales Plagas del plátano del clon dominico—Hartón en las fincas integrales Jatun Paccha y Unión Base*. <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/41>
- Bordat, A., Houvenaghel, M.-C., & German-Retana, S. (2015). Gibson assembly: An easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virology Journal*, *12*. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0315-3>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *The Plant Cell*, *13*(7), 1499–1510. <https://doi.org/10.1105/TPC.010011>
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., & Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, *40*(14), 4374–4381. <https://doi.org/10.1021/es052069i>
- Buitrón-Bustamante, J. L., & Morillo-Velastegui, L. E. (2017). Estandarización de un método de detección molecular del Cucumber mosaic virus (cmv) en banano ecuatoriano. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, *18*(1), 113–124. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:562](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:562)
- Buttner, C., von Bargen, S., & Bandte, M. (2015). Phytopathogenic Viruses. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 115–122). Springer International Publishing.

- Cai, L., Liu, C., Fan, G., Liu, C., & Sun, X. (2019). Preventing viral disease by ZnONPs through directly deactivating TMV and activating plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Environmental Science: Nano*, 6(12), 3653–3669.  
<https://doi.org/10.1039/C9EN00850K>
- Campos Tapia, V. (2013). *Preparación y caracterización de grafeno modificado con nanopartículas metálicas y bimetálicas* [Masters, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/3282/>
- Canto, T., & Palukaitis, P. (1999). The hypersensitive response to cucumber mosaic virus in *Chenopodium amaranticolor* requires virus movement outside the initially infected cell. *Virology*, 265(1), 74–82. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0028>
- Canto, T., Choi, S. K., & Palukaitis, P. (2001). A subpopulation of RNA 1 of Cucumber mosaic virus contains 3' termini originating from RNAs 2 or 3. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 4), 941–945. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-941>
- Chemistry LibreTexts. (2014, November 30). *Infrared Spectroscopy Absorption Table*. Chemistry LibreTexts.  
[https://chem.libretexts.org/Ancillary\\_Materials/Reference/Reference\\_Tables/Spectroscopic\\_Parameters/Infrared\\_Spectroscopy\\_Absorption\\_Table](https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table)
- Chen, S., Gu, H., Wang, X., Chen, J., & Zhu, W. (2011). Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(6), 465–471. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr031>
- Choi, S., Lee, J.-H., Kang, W.-H., Kim, J., Huy, H. N., Park, S.-W., Son, E.-H., Kwon, J.-K., & Kang, B.-C. (2018). Identification of Cucumber mosaic resistance 2 (cmr2) That Confers Resistance to a New Cucumber mosaic virus Isolate P1 (CMV-P1) in Pepper (*Capsicum* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01106>

- Cinelli, R. A., Ferrari, A., Pellegrini, V., Tyagi, M., Giacca, M., & Beltram, F. (2000). The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: Local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochemistry and Photobiology*, 71(6), 771–776. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0771:tegfpa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0771:tegfpa>2.0.co;2)
- Claros, M. G., & Cánovas, F. M. (1999). RNA isolation from plant tissues: A practical experience for biological undergraduates. *Biochemical Education*, 27(2), 110–113. [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(98\)00289-1](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(98)00289-1)
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1 Spec No), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- Darvishi, E., Kahrizi, D., & Arkan, E. (2019). Comparison of different properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green (using *Juglans regia* L. leaf extract) and chemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 286, 110831. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.108>
- De Vylder, J., Vandebussche, F., Hu, Y., Philips, W., & Van Der Straeten, D. (2012). Rosette Tracker: An Open Source Image Analysis Tool for Automatic Quantification of Genotype Effects1[C][W]. *Plant Physiology*, 160(3), 1149–1159. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202762>
- Demir, E., Kaya, N., & Kaya, B. (2013). Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by Comet assay. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 38, 31–39. <https://doi.org/10.3906/biy-1306-11>
- Dhand, C., Dwivedi, N., Loh, X. J., Ying, A. N. J., Verma, N. K., Beuerman, R. W., Lakshminarayanan, R., & Ramakrishna, S. (2015). Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive

overview. *RSC Advances*, 5(127), 105003–105037.

<https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>

Dhandapani, K. V., Anbumani, D., Gandhi, A. D., Annamalai, P., Muthuvenkatachalam, B. S., Kavitha, P., & Ranganathan, B. (2020). Green route for the synthesis of zinc oxide nanoparticles from *Melia azedarach* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101517. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101517>

*Biotechnology*, 24, 101517. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101517>

Ding, S.W., Rathjen, J. P., Li, W.-X., Swanson, R., Healy, H., & Symons, R. H. (1995).

Efficient infection from cDNA clones of cucumber mosaic cucumovirus RNAs in a new plasmid vector. *Journal of General Virology*, 76(2), 459–464.

<https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-459>

Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. (2013). *Análisis del sector banano*.

DICI, ProEcuador.

Divya, M. J., Sowmia, C., Joona, K., & Dhanya, K. P. (2013). Synthesis of zinc oxide nanoparticle from hibiscus rosa-sinensis leaf extract and investigation of its antimicrobial activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4, 1137–1142.

Dubey, V. K., Aminuddin, & Singh, V. P. (2010). Molecular characterization of Cucumber mosaic virus infecting *Gladiolus*, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. *Virus Genes*, 41(1), 126–134.

<https://doi.org/10.1007/s11262-010-0483-6>

Elmer, W., Ma, C., & White, J. (2018). Nanoparticles for plant disease management.

*Current Opinion in Environmental Science & Health*, 6, 66–70.

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.08.002>

- Elmer, W., & White, J. C. (2018). The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 111–133.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050108>
- Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki, K., & Hyakumachi, M. (2013). Induction of Systemic Resistance against Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *The Plant Pathology Journal*, 29(2), 193–200. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.01>
- Elumalai, K., & Velmurugan, S. (2015). Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Applied Surface Science*, 345, 329–336.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.03.176>
- Ezealisiji, K. M., Siwe-Noundou, X., Maduelosi, B., Nwachukwu, N., & Krause, R. W. M. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Solanum torvum* (L) leaf extract and evaluation of the toxicological profile of the ZnO nanoparticles–hydrogel composite in Wistar albino rats. *International Nano Letters*, 9(2), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s40089-018-0263-1>
- Fakhari, S., Jamzad, M., & Fard, H. K. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A comparison. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 12(1), 19–24. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1547925>
- Farouk, F., & Ibrahim, R. (2018). Comparing Surface Chemical Modifications of Zinc Oxide Nanoparticles for Modulating their Antiviral Activity against Herpes Simplex Virus Type-1. *International Journal of Nanoparticles and Nanotechnology*, 4(1).  
[https://doi.org/Comparing Surface Chemical Modifications of Zinc Oxide Nanoparticles for Modulating their Antiviral Activity against Herpes Simplex Virus Type-1](https://doi.org/Comparing%20Surface%20Chemical%20Modifications%20of%20Zinc%20Oxide%20Nanoparticles%20for%20Modulating%20their%20Antiviral%20Activity%20against%20Herpes%20Simplex%20Virus%20Type-1)

- Fatehah, M. O., Aziz, H. A., & Stoll, S. (2014). Stability of ZnO Nanoparticles in Solution. Influence of pH, Dissolution, Aggregation and Disaggregation Effects. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 3(1), 75–84.  
<https://doi.org/10.1166/jcsb.2014.1072>
- Fernández-Bautista, N., Domínguez-Núñez, J. A., Moreno, M. M. C., & Berrocal-Lobo, M. (2016). Plant Tissue Trypan Blue Staining During Phytopathogen Infection. *Bio-Protocol*, 6(24), e2078–e2078.
- Fiallo, J., & Beltran, P. (2017). *Importancia del sector agrícola en una economía dolarizada*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/6807>
- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., & Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24), 8484–8490.  
<https://doi.org/10.1021/es071445r>
- Fujiki, M., Kaczmarczyk, J. F., Yusibov, V., & Rabindran, S. (2008). Development of a new cucumber mosaic virus-based plant expression vector with truncated 3a movement protein. *Virology*, 381(1), 136–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.022>
- Garcés, F. R., & Carbo, J. J. (2013). Primer reporte de *Puccinia thaliae* en *Canna* spp. En Ecuador. *Bioagro*, 25(3), 207–210.
- García-Arenal, F., & Palukaitis, P. (2008). Cucumber Mosaic Virus. In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (pp. 614–619). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00640-3>
- García-López, J. I., Lira-Saldivar, R. H., Zavala-García, F., Olivares-Sáenz, E., Niño-Medina, G., Ruiz-Torres, N. A., Méndez-Argüello, B., & Díaz-Barriga, E. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of

- Capsicum chinense. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100(5–7), 560–572. <https://doi.org/10.1080/02772248.2018.1550781>
- Gergerich, R., & Dolja, V. (2006). *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
- Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., Mukherjee, A., & Mukherjee, A. (2016). Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.07.006>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Goh, E. G., Xu, X., & McCormick, P. (2014). Effect of particle size on the UV absorbance of zinc oxide nanoparticles. *Scripta Materialia*, s 78–79, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2014.01.033>
- Goodhew, P., Humphreys, J., & Beanland, R. (2001). *Electron Microscopy and Analysis*. Taylor and Francis.
- Gopalakrishnan Nair, P. M., & Chung, I.-M. (2014). Cell cycle and mismatch repair genes as potential biomarkers in Arabidopsis thaliana seedlings exposed to silver nanoparticles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(6), 719–725. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1254-1>
- Hamed, A., & Elsharkawy, M. (2019). A new strategy to control Cucumber mosaic virus using fabricated NiO-nanostructures. *Journal of Biotechnology*, 306, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.003>
- Hao, Y., Yuan, W., Ma, C., White, J. C., Zhang, Z., Adeel, M., Zhou, T., Rui, Y., & Xing, B. (2018). Engineered nanomaterials suppress Turnip mosaic virus infection in

- tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Environmental Science: Nano*, 5(7), 1685–1693. <https://doi.org/10.1039/C8EN00014J>
- Hara, T., Takeda, T., Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., & Fukada, T. (2017). Physiological roles of zinc transporters: Molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(2), 283–301. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0521-4>
- Hassan, S. S. M., Azab, W. I. M. E., Ali, H. R., & Mansour, M. S. M. (2015). Green synthesis and characterization of ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of anthracene. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4), 045012. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/6/4/045012>
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., & Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42(6), 819–832. <https://doi.org/10.1023/A:1006496308160>
- Hernández, M., Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R., Rico-García, E., Ocampo-Velázquez, R., Juárez, L., & Pacheco, I. (2020). Nanoparticles as Potential Antivirals in Agriculture. *Agriculture*, 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100444>
- Hidalgo, L. (2017). *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: El sector florícola ecuatoriano*. <http://repositorio.uasb.edu.ec/handle/10644/6095>
- Hily, J. M., García, A., Moreno, A., Plaza, M., Wilkinson, M. D., Fereres, A., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2014). The Relationship between Host Lifespan and Pathogen Reservoir Potential: An Analysis in the System *Arabidopsis thaliana*-Cucumber mosaic virus. *PLOS Pathogens*, 10(11), e1004492. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004492>

- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and Cellular Factors Involved in Phloem Transport of Plant Viruses. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
- Hodoroaba, V & Rades, S. (2016). *Characterisation of nanoparticles by means of high-resolution SEM/EDS in transmission mode*. 109(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/109/1/012006>
- Holder, C. F., & Schaak, R. E. (2019). Tutorial on Powder X-ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials. *ACS Nano*, 13(7), 7359–7365. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05157>
- Hondow, N., Wang, P., Brydson, R., Holton, M., Rees, P., Summers, H., & Brown, A. (2012). TEM analysis of nanoparticle dispersions with application towards the quantification of in vitro cellular uptake. *Journal of Physics: Conference Series*, 371. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/371/1/012020>
- Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., & Wang, X. (2018). Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. *Chemosphere*, 193, 852–860. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.077>
- Hu, Z., Zhang, T., Yao, M., Feng, Z., Miriam, K., Wu, J., Zhou, X., & Tao, X. (2012). The 2a protein of Cucumber mosaic virus induces a hypersensitive response in cowpea independently of its replicase activity. *Virus Research*, 170(1–2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.007>
- Hull, R. (2009). Mechanical Inoculation of Plant Viruses. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 16, Unit 16B.6. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b06s13>
- Ifeanyichukwu, U. L., Fayemi, O. E., & Ateba, C. N. (2020). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from Pomegranate (*Punica granatum*) Extracts and

- Characterization of Their Antibacterial Activity. *Molecules*, 25(19), 4521.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25194521>
- Ingale, A., & Chaudhari, A. (2013). *Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An EcoFriendly Approach*. 4(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000165>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 84, 439–504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0>
- Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2021). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 355–374. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>
- Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 168–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.10.002>
- James, A. P. (2011). *Viruses of banana in East Africa* [Phd, Queensland University of Technology]. <https://eprints.qut.edu.au/51288/>
- Jeyabharathi, S., Kalishwaralal, K., Sundar, K., & Muthukumaran, A. (2017). Synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) by aqueous extract of *Amaranthus caudatus* and evaluation of their toxicity and antimicrobial activity. *Materials Letters*, 209, 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.08.030>
- Jones, K. H., & Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of*

- Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 33(1), 77–79. <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>
- Jørgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (Vol. 75). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Kámán-Tóth, E., Pogány, M., Dankó, T., Szatmári, Á., & Bozsó, Z. (2018). A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech*, 8(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1171-9>
- Kang, W.-H., Seo, J.-K., Chung, B. N., Kim, K.-H., & Kang, B.-C. (2012). Helicase Domain Encoded by Cucumber mosaic virus RNA1 Determines Systemic Infection of Cmr1 in Pepper. *PLOS ONE*, 7(8), e43136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043136>
- Kaplan, I. B., Gal-On, A., & Palukaitis, P. (1997). Characterization of cucumber mosaic virus. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology*, 230(2), 343–349. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8468>
- Kavanagh, T. A., & Spillane, C. (1995). Strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making*, 149–158. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0357-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0357-2_19)
- Kawasaki, M., & Nishimura, N. (2006). 1064-nm laser fragmentation of thin Au and Ag flakes in acetone for highly productive pathway to stable metal nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253, 2208–2216. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.04.024>
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T. J., Danku, J., Salt, D. E., & Amtmann, A. (2014). Analysis of the Root System Architecture of *Arabidopsis* Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *The Plant Cell*, 26(4), 1480–1496. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122101>

- Kendziorek, M., Klimecka, M., Barabasz, A., Borg, S., Rudzka, J., Szczęsny, P., & Antosiewicz, D. M. (2016). Engineering high Zn in tomato shoots through expression of AtHMA4 involves tissue-specific modification of endogenous genes. *BMC Genomics*, *17*(1), 625. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2990-x>
- Kim, S., Lee, S., & Lee, I.-S. (2012). Alteration of Phytotoxicity and Oxidant Stress Potential by Metal Oxide Nanoparticles in *Cucumis sativus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-1067-3>
- Kiran Kumar, A. B. V., Saila, E. S., Narang, P., Aishwarya, M., Raina, R., Gautam, M., & Shankar, E. G. (2019). Biofunctionalization and biological synthesis of the ZnO nanoparticles: The effect of *Raphanus sativus* (white radish) root extract on antimicrobial activity against MDR strain for wound healing applications. *Inorganic Chemistry Communications*, *100*, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2018.12.014>
- Korbekandi, H., Iravani, S., & Abbasi, S. (2009). Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, *29*(4), 279–306. <https://doi.org/10.3109/07388550903062462>
- Koyama, H., Toda, T., & Hara, T. (2001). Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: Pectin–Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *Journal of Experimental Botany*, *52*(355), 361–368. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.355.361>
- Krenz, B., Bronikowski, A., Lu, X., Ziebell, H., Thompson, J. R., & Perry, K. L. (2015). Visual monitoring of Cucumber mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana* following transmission by the aphid vector *Myzus persicae*. *The Journal of General Virology*, *96*(9), 2904–2912. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000185>

- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Choudhary, R. C., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2018). Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 494–506.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.130>
- Kwon, H.J., Kim, H.H., Yoon, S. Y., Ryu, Y. B., Chang, J. S., Cho, K.-O., Rho, M.-C., Park, S.-J., & Lee, W. S. (2010). In vitro inhibitory activity of *Alpinia katsumadai* extracts against influenza virus infection and hemagglutination. *Virology Journal*, 7, 307. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-307>
- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.-C., Braam, J., & Alvarez, P. J. J. (2010). Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 669–675.  
<https://doi.org/10.1002/etc.58>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(Database issue), D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa-Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador*.
- Lepcha, S. S., Chaudhary, K., & Pratap, D. (2017). First Report of Cucumber mosaic virus Infecting *Musa x paradisiaca* cv. Chini Champa in Sikkim, Northeast India. *Plant Disease*, 101(5), 844–844. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1081-PDN>
- Lewsey, M. G., Murphy, A. M., Maclean, D., Dalchau, N., Westwood, J. H., Macaulay, K., Bennett, M. H., Moulin, M., Hanke, D. E., Powell, G., Smith, A. G., & Carr, J. P. (2010). Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA

- silencing suppressor. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(7), 835–845. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0835>
- Li, X., An, M., Xia, Z., Bai, X., & Wu, Y. (2017). Transcriptome analysis of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruits in response to Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) infection. *Scientific Reports*, 7(1), 16747. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17140-4>
- Liao, Q., Tu, Y., Carr, J. P., & Du, Z. (2015). An improved cucumber mosaic virus-based vector for efficient decoying of plant microRNAs. *Scientific Reports*, 5(1), 13178. <https://doi.org/10.1038/srep13178>
- Lièvre, M., Granier, C., & Guédon, Y. (2016). Identifying developmental phases in the *Arabidopsis thaliana* rosette using integrative segmentation models. *The New Phytologist*, 210(4), 1466–1478. <https://doi.org/10.1111/nph.13861>
- Lilly, S. T., Drummond, R. S. M., Pearson, M. N., & MacDiarmid, R. M. (2010). Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 294–304. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0236>
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 150(2), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Lin, D., & Xing, B. (2008). Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5580–5585. <https://doi.org/10.1021/es800422x>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Viruses: Structure, Function, and Uses. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>

- Luque, P. A., Soto-Robles, C. A., Nava, O., Gomez-Gutierrez, C. M., Castro-Beltran, A., Garrafa-Galvez, H. E., Vilchis-Nestor, A. R., & Olivas, A. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Citrus sinensis* extract. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *29*(12), 9764–9770.  
<https://doi.org/10.1007/s10854-018-9015-2>
- Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P., & Xing, B. (2015). Metal-Based Nanotoxicity and Detoxification Pathways in Higher Plants. *Environmental Science & Technology*, *49*(12), 7109–7122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00685>
- Macías, J. (2018). *VIROSIS EN EL CULTIVO DE SANDÍA (CITRULLUS LANATUS) EN EL CANTÓN ROCAFUERTE*. [Thesis, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí].  
<https://repositorio.uleam.edu.ec/handle/123456789/1450>
- Mahamuni, P. P., Patil, P. M., Dhanavade, M. J., Badiger, M. V., Shadija, P. G., Lokhande, A. C., & Bohara, R. A. (2019). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *17*, 71–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.11.007>
- Mahendiran, D., Subash, G., Arumai Selvan, D., Rehana, D., Senthil Kumar, R., & Kalilur Rahiman, A. (2017). Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Extracts of *Aloe vera* and *Hibiscus sabdariffa*: Phytochemical, Antibacterial, Antioxidant and Anti-proliferative Studies. *BioNanoScience*, *7*(3), 530–545.  
<https://doi.org/10.1007/s12668-017-0418-y>
- Mahjabeen, Akhtar, K. P., Sarwar, N., Saleem, M. Y., Asghar, M., Iqbal, Q., & Jamil, F. F. (2012). Effect of cucumber mosaic virus infection on morphology, yield and phenolic contents of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *45*(7), 766–782. <https://doi.org/10.1080/03235408.2011.595965>

- Majeed, S., Danish, M., Ismail, M. H. B., Ansari, M. T., & Ibrahim, M. N. M. (2019). Anticancer and apoptotic activity of biologically synthesized zinc oxide nanoparticles against human colon cancer HCT-116 cell line- in vitro study. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *14*, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100179>
- Mallory, A. C. (2005). *Total RNA extraction from Arabidopsis and tobacco*. 1.
- Masson, J. E., & Paszkowski, J. (1997). Arabidopsis thaliana mutants altered in homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(21), 11731–11735.
- Matsuo, K., Hong, J.-S., Tabayashi, N., Ito, A., Masuta, C., & Matsumura, T. (2007). Development of Cucumber mosaic virus as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta*, *225*(2), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0346-5>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2010). Effects of Cucumber mosaic virus infection on vector and non-vector herbivores of squash. *Communicative & Integrative Biology*, *3*(6), 579–582. <https://doi.org/10.4161/cib.3.6.13094>
- Menke, M., Chen, I.-P., Angelis, K. J., & Schubert, I. (2001). DNA damage and repair in Arabidopsis thaliana as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *493*(1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00165-6)
- Meyers, M. A., Mishra, A., & Benson, D. J. (2006). Mechanical properties of nanocrystalline materials. *Progress in Materials Science*, *51*(4), 427–556. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2005.08.003>
- Ming, R., & Moore, P. H. (Eds.). (2014). *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7>

- Mochizuki, T., & Ohki, S. T. (2012). Cucumber mosaic virus: Viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, *13*(3), 217–225.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>
- Moghadam, T., Zahedi, H., & Ashkiani, A. (2013). Effect of zinc foliar application on auxin and gibberellin hormones and catalase and superoxide dismutase enzyme activity of corn (*Zea mays* L) under water stress. *Maydica*, *58*, 218–223.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K., & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, *10*(3), 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9275-x>
- Monica, R. C., & Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, *62*(2), 161–165. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589681>
- Moorman, G. W., Gevens, A. J., Granke, L. L., Hausbeck, M. K., Hendricks, K., Roberts, P. D., Pettitt, T. R., & Hong, C. (2017). CHAPTER 1: Sources and Distribution Systems of Irrigation Water and Their Potential Risks for Crop Health. In *Biology, Detection, and Management of Plant Pathogens in Irrigation Water* (Vol. 1–0, pp. 3–11). The American Phytopathological Society.  
<https://doi.org/10.1094/9780890544914.002>
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., & Richaud, P. (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *149*(2), 894–904.  
<https://doi.org/10.1104/pp.108.130294>
- Mowry, T. M. (2005). Insecticidal reduction of Potato leafroll virus transmission by *Myzus persicae*. *Annals of Applied Biology*, *146*(1), 81–88.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.03149.x>
- Mukherjee, A., Peralta-Videa, J. R., Bandyopadhyay, S., Rico, C. M., Zhao, L., & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Physiological effects of nanoparticulate ZnO in

- green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 6(1), 132–138. <https://doi.org/10.1039/c3mt00064h>
- Naseer, M., Aslam, U., Khalid, B., & Chen, B. (2020). Green route to synthesize Zinc Oxide Nanoparticles using leaf extracts of *Cassia fistula* and *Melia azadarach* and their antibacterial potential. *Scientific Reports*, 10(1), 9055. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65949-3>
- Navarro, J. A., Sanchez-Navarro, J. A., & Pallas, V. (2019). Chapter One—Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. In M. Kielian, T. C. Mettenleiter, & M. J. Roossinck (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 104, pp. 1–64). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>
- Northern Illinois University. (2007). *FT-IR Sample Preparation—NIU - Department of Chemistry and Biochemistry*. Northern Illinois University. <https://niu.edu/chembio/research/analytical-lab/ftir/sample-preparation.shtml>
- Ochoa, J., & Insuasti, M. L. (2000). *Enfermedades del tomate de árbol sintomatología y etiología*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3578>
- Ochoa-Tufiño, A. (2018). *Exploring the genetics underlying the Zn deficiency response in Arabidopsis thaliana*. University of Wageningen.
- Ogunyemi, S. O., Abdallah, Y., Zhang, M., Fouad, H., Hong, X., Ibrahim, E., Masum, M. M. I., Hossain, A., Mo, J., & Li, B. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 341–352. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1557671>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>

- Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-93>
- Onofre, J., Carballal, A., Santos, E., & Flores, J. (2018). *Application of electrotherapy for the elimination of cucumber mosaic virus (CMV) in micropropagated banana plants (Musa spp.)*. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2018.03.02.7>
- Ortiz, P., & Carrión, G. (2018). *La importancia de la agricultura en el Ecuador*. La Hora Noticias de Ecuador, sus provincias y el mundo. <https://lahora.com.ec/loja/noticia/1102152925/la-importancia-de-la-agricultura-en-el-ecuador>
- Otagaki, S., Arai, M., Takahashi, A., Goto, K., Hong, J.-S., Masuta, C., & Kanazawa, A. (2006). Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotechnology*, 23(3), 259–265. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.259>
- Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). Chapter 1 - Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In A. K. Shukla & S. Iravani (Eds.), *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00001-0>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Palukaitis, P., & García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62, 241–323. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)62005-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)62005-1)

- Paredes, J. R. (2011). *Capacidad de dos especies de áfidos (HOMÓPTERA: APHIDIDAE) para transmitir Squash Mosaic Virus-SqMV en melón bajo condiciones de invernadero e identificación de sus enemigos naturales*.
- Paschke, M. W., Redente, E. F., & Levy, D. B. (2000). Zinc toxicity thresholds for important reclamation grass species of the western united states. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11), 2751–2756.  
<https://doi.org/10.1002/etc.5620191120>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2011). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Pigliucci, M. (2002). Ecology and Evolutionary Biology of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 1. <https://doi.org/10.1199/tab.0003>
- Plaksenkova, I., Kokina, I., Petrova, A., Jermaļonoka, M., Gerbreders, V., & Krasovska, M. (2020, December 2). *The Impact of Zinc Oxide Nanoparticles on Cytotoxicity, Genotoxicity, and miRNA Expression in Barley (Hordeum vulgare L.) Seedlings* [Research Article]. The Scientific World Journal; Hindawi.  
<https://doi.org/10.1155/2020/6649746>
- Prakash, M. G., & Chung, I. M. (2016). Determination of zinc oxide nanoparticles toxicity in root growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, 67(3), 286–296. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.3.6>
- Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., Sreeprasad, T. S., Sajanlal, P. R., & Pradeep, T. (2012). Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles on the Germination, Growth and Yield of Peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905–927.  
<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>

- Prashanth, G. K., Prashanth, P. A., Nagabhushana, B. M., Ananda, S., Krishnaiah, G. M., Nagendra, H. G., Sathyananda, H. M., Rajendra Singh, C., Yogisha, S., Anand, S., & Tejabhiram, Y. (2018). Comparison of anticancer activity of biocompatible ZnO nanoparticles prepared by solution combustion synthesis using aqueous leaf extracts of *Abutilon indicum*, *Melia azedarach* and *Indigofera tinctoria* as biofuels. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(5), 968–979. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1351982>
- Pumisacho, M., & Velásquez, J. (2009). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/840>
- Quinto, R., Quito, D., Ochoa, J., & Martin, R. (2015). *Identificación de patógenos virales presentes en el cultivo de Tomate de árbol en Ecuador*. Guayaquil: CIBE-ESPOL.
- Quito, D. (2018). *Enfermedades virales en cultivos agrícolas: Un tema olvidado o simplemente desconocido en Ecuador? – Yachay Tech*. <https://www.yachaytech.edu.ec/evento/enfermedades-virales-cultivos/>
- Quito, D. (2019). *Situación del Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) en Ecuador: Nuevos hallazgos y potenciales alternativas para su manejo en cultivos de papaya y babaco*. IV Simposio de Fitopatología – Control Biológico e Interacciones Planta – Patógeno, Quito-Ecuador.
- Rabe, B. A., & Cepko, C. (2020). A Simple Enhancement for Gibson Isothermal Assembly. *BioRxiv*, 2020.06.14.150979. <https://doi.org/10.1101/2020.06.14.150979>
- Rahaiee, S., Ranjbar, M., Azizi, H., Govahi, M., & Zare, M. (2020). Green synthesis, characterization, and biological activities of saffron leaf extract-mediated zinc oxide nanoparticles: A sustainable approach to reuse an agricultural waste.

*Applied Organometallic Chemistry*, 34(8), e5705.

<https://doi.org/10.1002/aoc.5705>

Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., Mydhili, G., Gomathi, T., & Chung, I.-M. (2018).

Green approach for synthesis of zinc oxide nanoparticles from *Andrographis paniculata* leaf extract and evaluation of their antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(1), 21–30.

<https://doi.org/10.1007/s00449-017-1840-9>

Rajeshkumar, S., Kumar, S. V., Ramaiah, A., Agarwal, H., Lakshmi, T., & Roopan, S. M.

(2018). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Mangifera indica* leaves and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties in lung cancer (A549) cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 91–95.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.009>

Rajeswari, M., & Agrawal, P. (2020). Rapid Water Disinfection Using ZnO Nanoparticles

Synthesized from *Citrus aurantifolia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(5), 989–996.

<https://doi.org/10.1007/s40011-020-01164-4>

Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.-N., & Biswas, P. (2015). Mechanistic

evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*, 7(12), 1584–1594. <https://doi.org/10.1039/C5MT00168D>

Ramesh, M., Anbuvaran, M., & Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO

nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136,

864–870. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.105>

Ramos, K., Sivaprasad, Y., Guevara, F., Ochoa-Corona, F., Viera, W., & Flores, F.

(2020). Occurrence of potato yellowing virus in naranjilla (*Solanum quitoense*

- Lam.) in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 597–597.  
<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00479-0>
- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S., & Rahiman, A. K. (2017). In vitro antioxidant and antidiabetic activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(6), 943–957.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-017-1758-2>
- Rivera, M., & Echeverría, C. (2017). *Identificación de enfermedades virales en el cultivo de fréjol (phaseolus vulgaris l.) en el cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura*. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/7074>
- Rizzo, T. M., & Palukaitis, P. (1990). Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts. *Molecular and General Genetics MGG*, 222(2), 249–256.  
<https://doi.org/10.1007/BF00633825>
- Rodelo-Urrego, M., Pagán, I., González-Jara, P., Betancourt, M., Moreno-Letelier, A., Ayllón, M. A., Fraile, A., Piñero, D., & García-Arenal, F. (2013). Landscape heterogeneity shapes host-parasite interactions and results in apparent plant-virus codivergence. *Molecular Ecology*, 22(8), 2325–2340.  
<https://doi.org/10.1111/mec.12232>
- Roossinck, M. J. (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology*, 479–480, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.041>
- Rosa, G. de la, López-Moreno, M. L., Haro, D. de, Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: Root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure and Applied Chemistry*, 85(12), 2161–2174.  
<https://doi.org/10.1351/pac-con-12-09-05>

- Roshitha, S. S., Mithra, V., Saravanan, V., Sadasivam, S. K., & Gnanadesigan, M. (2019). Photocatalytic degradation of methylene blue and safranin dyes using chitosan zinc oxide nano-beads with *Musa × paradisiaca* L. pseudo stem. *Bioresource Technology Reports*, 5, 339–342.  
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.08.004>
- Rybicki, E. P. (2015). A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology*, 160(1), 17–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2295-9>
- Ryu, C.-M., Murphy, J. F., Mysore, K. S., & Kloepper, J. W. (2004). Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal*, 39(3), 381–392.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02142.x>
- Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014, November 11). *Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications* [Review Article]. *The Scientific World Journal*; Hindawi.  
<https://doi.org/10.1155/2014/925494>
- Santorum, N. (2017). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando el extracto de las hojas de Matico (Piper aduncum) como un agente reductor*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/13214>
- Sapkota, M., & Knoell, D. L. (2018, October 17). *Essential Role of Zinc and Zinc Transporters in Myeloid Cell Function and Host Defense against Infection* [Review Article]. *Journal of Immunology Research*; Hindawi.  
<https://doi.org/10.1155/2018/4315140>
- Sarwar, M., Shad, N. A., & Batool, R. (2020). Chapter 50—Integrated management of vectored viral diseases of plants. In L. P. Awasthi (Ed.), *Applied Plant Virology*

(pp. 707–724). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00050-5>

Savithramma, N., Rao, M., Rukmini, K., & Devi, P. (2011). Antimicrobial activity of Silver Nanoparticles synthesized by using Medicinal Plants. *International Journal of ChemTech Research*, 3.

Seo, J.-K., Kwon, S.-J., Choi, H.-S., & Kim, K.-H. (2009). Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, 383(2), 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.033>

Seo, J.-K., Lee, H.-G., & Kim, K.-H. (2008). Systemic gene delivery into soybean by simple rub-inoculation with plasmid DNA of a Soybean mosaic virus-based vector. *Archives of Virology*, 154(1), 87. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0286-4>

Shang, Y., Hasan, Md. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., & Zhou, J. (2019). Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/molecules24142558>

Sharma, D., Sabela, M. I., Kanchi, S., Mdluli, P. S., Singh, G., Stenström, T. A., & Bisetty, K. (2016). Biosynthesis of ZnO nanoparticles using Jacaranda mimosifolia flowers extract: Synergistic antibacterial activity and molecular simulated facet specific adsorption studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.043>

Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 17(8), 852–870. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0705-6>

- Sheik Mydeen, S., Raj Kumar, R., Kottaisamy, M., & Vasantha, V. S. (2020). Biosynthesis of ZnO nanoparticles through extract from *Prosopis juliflora* plant leaf: Antibacterial activities and a new approach by rust-induced photocatalysis. *Journal of Saudi Chemical Society*, 24(5), 393–406.  
<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2020.03.003>
- Shen, Y., Zhao, X., Yao, M., Li, C., Miriam, K., Zhang, X., & Tao, X. (2014). A versatile complementation assay for cell-to-cell and long distance movements by cucumber mosaic virus based agro-infiltration. *Virus Research*, 190, 25–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.013>
- Shilpa, V., Thavamani, S., Vijayan, S., Panicker, L. M., Jilsha, G., & Muddukrishnaiah, K. (2020). Green synthesis Zinc Oxide nanoparticle using *Allamanda cathartica* leaf extract and their cytotoxic and antibacterial activity.  
<https://doi.org/10.22034/NMRJ.2020.03.010>
- Shobha, N., Nanda, N., Giresha, A. S., Manjappa, P., P., S., Dharmappa, K. K., & Nagabhushana, B. M. (2019). Synthesis and characterization of Zinc oxide nanoparticles utilizing seed source of *Ricinus communis* and study of its antioxidant, antifungal and anticancer activity. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.023>
- Silva, J. (2015). *Producción de pepino (Cucumis sativus L), tutorado y sin tutorar con dos abonos orgánicos*. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/1539>
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 84.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
- Singh, S., Awasthi, L. P., & Jangre, A. (2020). Chapter 24—Transmission of plant viruses in fields through various vectors. In L. P. Awasthi (Ed.), *Applied Plant*

- Virology* (pp. 313–334). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00024-4>
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Soler, S., López, C., & Nuez, F. (2005). Natural Occurrence of Viruses in *Lycopersicon* spp. In Ecuador. *Plant Disease*, 89(11), 1244. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1244C>
- Szőllősi, R., Molnár, Á., Kondak, S., & Kolbert, Z. (2020). Dual Effect of Nanomaterials on Germination and Seedling Growth: Stimulation vs. Phytotoxicity. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/plants9121745>
- Tabrizi, S. M., Elahi, B., & Javanbakht, V. (2020). Biosynthesis of pure zinc oxide nanoparticles using Quince seed mucilage for photocatalytic dye degradation. *Journal of Alloys and Compounds*, 821, 153519. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.153519>
- Tailor, G., Chaudhay, J., Verma, D., & Kr. Sarma, B. (2019). Microscopic study of zinc nanoparticles synthesised using thermosetting polymer. *Applied Microscopy*, 49(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s42649-019-0018-0>
- Takahashi, H., Fukuhara, T., Kitazawa, H., & Kormelink, R. (2019). Virus Latency and the Impact on Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02764>
- Takeshita, M., Koizumi, E., Noguchi, M., Sueda, K., Shimura, H., Ishikawa, N., Matsuura, H., Ohshima, K., Natsuaki, T., Kuwata, S., Furuya, N., Tsuchiya, K., & Masuta, C. (2011). Infection Dynamics in Viral Spread and Interference Under the Synergism Between Cucumber mosaic virus and Turnip mosaic virus.

*Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 25(1), 18–27.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0170>

Talam, S., Karumuri, S. R., & Nagarjuna, G. (2012). Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles. *ISRN Nanotechnology*, 2012.

<https://doi.org/10.5402/2012/372505>

Tang, Q., Xia, H., Liang, W., Huo, X., & Wei, X. (2020). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Morus nigra* and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 202, 111698. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111698>

Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815.

<https://doi.org/10.1038/35048692>

Thi, T., Thoai, T., Dang, Y., Thi, K., Thang, B., & Ngoc, K. (2020). Green synthesis of ZnO nanoparticles using orange fruit peel extract for antibacterial activities. *RSC Advances*, 10(40), 23899–23907. <https://doi.org/10.1039/D0RA04926C>

Thiruvengadam, M., Gurunathan, S., & Chung, I.-M. (2015). Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *Rapa* L.). *Protoplasma*, 252(4), 1031–1046.

<https://doi.org/10.1007/s00709-014-0738-5>

Thompson, J. R., & Tepfer, M. (2009). The 3' untranslated region of cucumber mosaic virus (CMV) subgroup II RNA3 arose by interspecific recombination between CMV and tomato aspermy virus. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 9), 2293–2298. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011452-0>

- Timmons, J. (2015). *HiFi DNA Assembly (NEB)*.  
<https://doi.org/10.17504/protocols.io.dn85hv>
- Tiwari, N., Pandit, R., Gaikwad, S., Gade, A., & Rai, M. (2017). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by petals extract of *Rosa indica* L., its formulation as nail paint and evaluation of antifungal activity against fungi causing onychomycosis. *IET Nanobiotechnology*, 11(2), 205–211. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0003>
- Tomaev, V., Polischuk, V., Vartanyan, T., & Vasil'ev, E. (2019). Surface Plasmon Resonance in Zinc Nanoparticles. *Glass Physics and Chemistry*, 45, 238–241.
- Tripathi, S., Patil, B. L., & Verma, R. (2016). Viral Diseases of Banana and Their Management. In R. K. Gaur, N. M. Petrov, B. L. Patil, & M. I. Stoyanova (Eds.), *Plant Viruses: Evolution and Management* (pp. 289–308). Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-1406-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1406-2_17)
- Tuo, D., Fu, L., Shen, W., Li, X., Zhou, P., & Yan, P. (2017). Generation of stable infectious clones of plant viruses by using *Rhizobium radiobacter* for both cloning and inoculation. *Virology*, 510, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.012>
- Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., & Borstlap, A. C. (2003). Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany*, 91(6), 729–737.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg066>
- Van Norman, J. M., & Benfey, P. N. (2009). *Arabidopsis thaliana* as a Model Organism in Systems Biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 1(3), 372–379. <https://doi.org/10.1002/wsbm.25>
- Vankova, R., Landa, P., Podlipna, R., Dobrev, P. I., Prerostova, S., Langhansova, L., Gaudinova, A., Motkova, K., Knirsch, V., & Vanek, T. (2017). ZnO nanoparticle

- effects on hormonal pools in *Arabidopsis thaliana*. *Science of The Total Environment*, 593–594, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.160>
- Velastegui, C., Orellana, H., & Solórzano, H. (2008). *El cultivo de banano*. Edifarm.
- Venkatesan, A., Prabakaran, R., & Sujatha, V. (2017). Phytoextract-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles using aqueous leaves extract of *Ipomoea pes-caprae* (L).R.br revealing its biological properties and photocatalytic activity. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s41204-017-0018-7>
- Vimercati, L., Cavone, D., Caputi, A., De Maria, L., Tria, M., Prato, E., & Ferri, G. M. (2020). Nanoparticles: An Experimental Study of Zinc Nanoparticles Toxicity on Marine Crustaceans. General Overview on the Health Implications in Humans. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00192>
- Vinayagam, R., Selvaraj, R., Arivalagan, P., & Varadavenkatesan, T. (2020). Synthesis, characterization and photocatalytic dye degradation capability of *Calliandra haematocephala*-mediated zinc oxide nanoflowers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111760. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111760>
- Vishnoi, R., Kumar, S., & Raj, S. K. (2013). Molecular characterization of a Cucumber mosaic virus isolate associated with mosaic disease of banana in India. *Phytoparasitica*, 41(5), 545–555. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0315-z>
- Vishwakarma, K. (2013). *Green synthesis of ZnO nanoparticles using abrus precatorius seeds extract and their characterization* [MSc]. <http://ethesis.nitrkl.ac.in/5012/>
- Von Moos, N., & Slaveykova, V. I. (2014). Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae—State of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 8(6), 605–630. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>

- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, C., Gao, X., Wang, L., & Wang, S. (2016). Zinc Oxide Nanoparticles Affect Biomass Accumulation and Photosynthesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *6*.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01243>
- Watt, L. G., Crawshaw, S., Rhee, S.-J., Murphy, A. M., Canto, T., & Carr, J. P. (2020). The cucumber mosaic virus 1a protein regulates interactions between the 2b protein and ARGONAUTE 1 while maintaining the silencing suppressor activity of the 2b protein. *PLOS Pathogens*, *16*(12), e1009125.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009125>
- Wieczorek, P., Budziszewska, M., Frąckowiak, P., & Obrepalska-Stepłowska, A. (2020). Development of a New Tomato Torrado Virus-Based Vector Tagged with GFP for Monitoring Virus Movement in Plants. *Viruses*, *12*, 1195.  
<https://doi.org/10.3390/v12101195>
- Wieters, B., Steige, K. A., He, F., Koch, E. M., Ramos-Onsins, S. E., Gu, H., Guo, Y.-L., Sunyaev, S., & Meaux, J. de. (2021). Polygenic adaptation of rosette growth in Arabidopsis thaliana. *PLOS Genetics*, *17*(1), e1008748.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008748>
- Woehrl, G., Huthcison, J., Özkar, S., & Finke, R. (2006). Analysis of Nanoparticle Transmission Electron Microscopy Data Using a Public Domain Image-Processing Program, Image. *Turkish Journal of Chemistry*, *30*, 1–13.
- Xia, Y., Li, K., Li, J., Wang, T., Gu, L., & Xun, L. (2019). T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, *47*(3), e15–e15.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1169>
- Yan, J. (2018). *Study of the resistance to cucumber mosaic virus aggressive strains in the melon (cucumis melo l.) accession pi 161375*

[[Http://purl.org/dc/dcmitype/Text](http://purl.org/dc/dcmitype/Text), Universitat Autònoma de Barcelona].

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=272944>

- Yang, C., Xiao, F., Wang, J., & Su, X. (2015). 3D flower- and 2D sheet-like CuO nanostructures: Microwave-assisted synthesis and application in gas sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *207*, 177–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.10.063>
- Yang, X., Ren, Y., Sun, S., Wang, D., Zhang, F., Li, D., Li, S., & Zhou, X. (2018). Identification of the Potential Virulence Factors and RNA Silencing Suppressors of Mulberry Mosaic Dwarf-Associated Geminivirus. *Viruses*, *10*(9), 472.  
<https://doi.org/10.3390/v10090472>
- Yang, X. X., Li, C. M., & Huang, C. Z. (2016). Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of respiratory syncytial virus infection. *Nanoscale*, *8*(5), 3040–3048. <https://doi.org/10.1039/C5NR07918G>
- Yardimci, N., Çulal Kiliç, H., & Kor, A. (2015). Identification of Cucumber Mosaic Virus (CMV) on Squash (CUCURBITA PEPO L) cultivars in Lakes region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, *24*, 417–421.
- Yu, D., Goh, K., Wang, H., Wei, L., Jiang, W., Zhang, Q., Dai, L., & Chen, Y. (2014). Scalable synthesis of hierarchically structured carbon nanotube–graphene fibres for capacitive energy storage. *Nature Nanotechnology*, *9*(7), 555–562.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2014.93>
- Yupa, F., & Rocha, A. (2014). *Derecho a la Soberanía Alimentaria, Principios Jurídicos para desarrollar un Sistema Sostenible y Sustentable en el Ecuador*.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/3253>
- Zaeem, A., Drouet, S., Anjum, S., Khurshid, R., Younas, M., Blondeau, J. P., Tungmunnithum, D., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2020). Effects of Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Oxidative Stress

Response in Flax Seedlings vs. In Vitro Cultures: A Comparative Analysis.

*Biomolecules*, 10(6), 918. <https://doi.org/10.3390/biom10060918>

Zafar, H., Ali, A., Ali, J. S., Haq, I. U., & Zia, M. (2016). Effect of ZnO Nanoparticles on Brassica nigra Seedlings and Stem Explants: Growth Dynamics and Antioxidative Response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00535>

Zeedan, G. S., EL-Razik, K. A. A., Allam, A. M., Abdalhamed, A. M., & Zeina, H. A. A. (2020). Evaluations of Potential Antiviral Effects of Green Zinc Oxide and Silver Nanoparticles against Bovine Herpesvirus-1. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(4). <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.4.433.443>

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>

Zhang, X.-P., Liu, D.-S., Yan, T., Fang, X.-D., Dong, K., Xu, J., Wang, Y., Yu, J.-L., & Wang, X.-B. (2017). Cucumber mosaic virus coat protein modulates the accumulation of 2b protein and antiviral silencing that causes symptom recovery in planta. *PLOS Pathogens*, 13(7), e1006522. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006522>

Zhang, Z., Tong, X., Liu, S.-Y., Chai, L.-X., Zhu, F.-F., Zhang, X.-P., Zou, J.-Z., & Wang, X.-B. (2019). Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, 9(1), 3187. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39436-3>

Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J. A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J. R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela-Ramirez, A., Zhang, J., & Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Stress response and tolerance of Zea mays to CeO<sub>2</sub> nanoparticles:

- Cross talk among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano*, 6(11), 9615–9622. <https://doi.org/10.1021/nn302975u>
- Zhao, Y., Yang, X., Zhou, G., & Zhang, T. (2020). Engineering plant virus resistance: From RNA silencing to genome editing strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 18(2), 328–336. <https://doi.org/10.1111/pbi.13278>
- Zheng, X., Chen, L., & Li, X. (2018). Arabidopsis and rice showed a distinct pattern in ZIPs genes expression profile in response to Cd stress. *Botanical Studies*, 59. <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0238-6>
- Zhou, W., & Wang, Z. L. (Eds.). (2007). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0>
- Zitter, T., & Murphy, J. (2009). *Cucumber Mosaic Virus*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0518-01>

## Anexos