

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	4
1. El cultivo de los cítricos: Origen, distribución e importancia económica	5
2. La mejora genética clásica de cítricos	6
3. Biotecnología y genómica en la mejora de cítricos.....	8
3.1 Genómica funcional	8
4. Vectores virales.....	11
4.1 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).....	12
4.1.1 Mecanismo del silenciamiento.....	12
4.1.2 Amplificación y diseminación de la señal	15
4.1.3 Supresores del silenciamiento.....	16
4.1.4 Vectores VIGS desarrollados	17
4.2 Vectores virales para la expresión de proteínas	20
4.2.1 Tipos de vectores de expresión	22
a. Vectores de inserción	23
b. Vectores de sustitución	23
c. Vectores modulares.....	25
d. Vectores de fusión.....	25
5. Movimiento de los virus en la planta	26
6. El virus del manchado foliar de los cítricos	27
6.1 Sintomatología, gama de huéspedes, transmisión e incidencia.....	27
6.2 Estructura y características moleculares	30
6.3 Técnicas de diagnóstico.....	32
Justificación y objetivos.....	34

CAPITULO 1:

Desarrollo de vectores virales basados en CLBV para la expresión de proteínas o silenciamiento de genes en cítricos.....38

1. Introduction 39

2. Results 41

2.1 Infectivity of CLBV based vectors 41

2.2 Genetic stability of CLBV-based vectors in *N. benthamiana* 49

2.3 Genetic stability of CLBV-based vectors in citrus plants 52

2.4 CLBV-based vectors expressing GFP trigger RNA silencing of a *gfp* transgene in citrus plants 54

2.5 CLBV-based vectors can trigger silencing of endogenous citrus genes 56

3. Discussion 59

4. Material and methods 63

4.1 Plasmid constructs 63

4.2 Plant growth, agroinoculation of *N. benthamiana* leaves and slash- and graft-inoculation of citrus plants 68

4.3 RNA extraction, RT-PCR detection and RNA quantification by real time RT-PCR and northern blot analysis..... 69

4.4 GFP detection 71

CAPITULO 2:

Estudio del movimiento y distribución de CLBV en plantas de *Nicotiana benthamiana* y cítricos 73

1. Introduction 74

2. Results and discussion 75

CAPITULO 3:

Ensayo de la eficiencia de los vectores desarrollados para el silenciamiento de genes en Nicotiana benthamiana y cítricos.....	86
1. Introduction	87
2. Results	89
2.1 VIGS in N. benthamiana plants	89
2.2 VIGS in citrus plants	93
2.3 siRNAs analysis in N. benthamiana and citrus plants infected with different CLBV-based vectors	96
2.4 VIGS of other citrus genes	99
3. Discussion	101
4. Material and methods	105
4.1 CLBV-based constructs	105
4.2 Plant growth and inoculations.....	107
4.3 RNA extraction and northern blot analyses.....	108
4.4 RT-PCR detection and real-time RT-PCR quantitation	110
4.5 Effectiveness of gene silencing	111
DISCUSIÓN GENERAL	112
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	124