

RESUM

Els cítrics són el cultiu fruiter econòmicament més important tant a Espanya com a la resta de països productors. La clau per a mantindre la competitivitat d'aquest sector està basat en obtindre material vegetal d'una alta qualitat, per la qual cosa són indispensables els programes de millora. La millora dels cítrics per mètodes clàssics és molt complicada, per tant cal recórrer a les noves tecnologies per a intentar accelerar i optimitzar el procediment. La recent seqüenciació del genoma de dues espècies de cítrics ha permès identificar una llarga llista de gens candidats a participar en determinats processos biològics. No obstant això, són necessàries noves anàlisis per a associar cada gen a un fenotip específic o funció biològica.

L'ús de vectors virals per a determinar la funció de gens per mitjà de silenciament gènic induït per virus (VIGS) ha demostrat ser una ferramenta molt útil per als estudis de genètica reversa realitzats en plantes. Aquest sistema presenta avantatges respecte als mètodes tradicionals per a estudiar la funció de gens, com són la mutagènesi o la transformació genètica, en tant que permet assajar la funció de nombrosos gens en un curt període de temps. Això és especialment crític en el cas dels cítrics, que presenten llargs períodes juvenils d'entre 6 i 8 anys i on la transformació genètica de plantes adultes és molt complicada. A més, permet estudiar la funció de gens que són essencials per al creixement o el desenvolupament de la planta, l'anàlisi dels quals és inviable amb els mètodes tradicionals.

Al començament de la tesi s'havia desenvolupat un vector viral per a cítrics basat en el virus de la tristesa dels cítrics (CTV), amb el qual es poden expressar proteïnes, però que no s'ha assajat per a estudiar la funció de gens per mitjà de VIGS. Al laboratori disposàvem d'un clon infecció de cDNA del genoma complet del virus del tacat foliar dels cítrics (CLBV), un virus que infecta a totes les espècies i varietats de cítrics assajades, i que és asimptomàtic en la majoria d'elles. Aquest clon infecció s'ha modificat per a obtindre vectors virals basats en el genoma de CLBV que hi poden servir tant per a expressar proteïnes com per a silenciar, mitjançant VIGS, gens de cítrics per a la millora genètica d'aquest cultiu. Per a dur-ho a terme, s'ha introduït un punt de tall únic *PmlI* en dues zones del genoma de CLBV: a l'extrem 3' no traduïble (vector *clbv3'*) o en la zona del intergènica localitzada entre els gens de les proteïnes de moviment i càpsida (CP) (vector *clbvIN*). Per a l'expressió de seqüències foranies mitjançant la formació d'un nou RNA subgenòmic

(sgRNA) es va delimitar la seqüència mínima promotora del sgRNA CP mitjançant la clonació de fragments de diferent longitud al voltant de l'origen de transcripció del sgRNA al vector *clbv3'*. El fragment de 92 bases localitzat entre els nucleòtids -42 i +50 respecte a l'inici de la transcripció del sgRNA CP contenia tots els elements necessaris per a la promoció d'un nou sgRNA *in vivo*. Aquesta seqüència mínima promotora es va clonar als dos vectors virals prèviament desenvolupats per a genera els vectors *clbv3'pr* i *clbvINpr* respectivament. Ambdós vectors van ser capaços de produir un nou sgRNA i expressar proteïnes recombinants.

Per a determinar l'estabilitat dels vectors obtinguts, es clonaren en ells fragments de seqüències lineals de diferent grandària o en tàndem invertit, per a la formació d'una estructura en forquilla, i s'inocularen plantes de *N. benthamiana* i cítrics. Totes les construccions derivades del vector *clbv3'* es mostraren estables al llarg de les diferents brotacions analitzades durant al menys 3 anys, comprovant-ne la replicació viral e integritat de l'inserit. No obstant això, no es va detectar multiplicació viral amb cap de les construccions derivades del vector *clbvIN*. L'estabilitat de les construccions derivades dels vectors amb el promotor duplicat depenia de la grandària de l'inserit. Amb totes elles es va detectar replicació viral, però es van observar esdeveniments de recombinació quan es clonaven fragments superiors a 720 nt en el vector *clbvINpr* o 408 nt en el vector *clbv3'pr*.

Un factor important per a determinar l'eficiència i funcionalitat dels vectors desenrotllats és conèixer com es mou i es distribuïx el virus en els distints teixits de la planta. Per a això, es van inocular plantes de *N. benthamiana* i cítrics amb la construcció *clbv3'pr-GFP*, que expressa GFP en els teixits on es localitza el virus. En *N. benthamiana*, l'observació de GFP va permetre detectar la presència de CLBV en la majoria de teixits, acumulant-se preferentment en òvuls i regions meristemàtiques. En cítrics no es va poder visualitzar GFP però el virus es va detectar en regions meristemàtiques per mitjà de RT-PCR a temps real i hibridació molecular. L'acumulació de CLBV en teixits meristemàtics explicaria la dificultat d'eliminar este virus per mitjà de microempelt. Per a avaluar la capacitat dels vectors *clbv3'pr* i *clbvINpr* per a expressar proteïnes es va clonar en ells la seqüència completa del gen *gfp* i es va quantificar la proteïna GFP sintetitzada en les plantes infectades.

En *N. benthamiana*, la quantitat de GFP estimada per al vector *clbv3'pr* va ser de 16 µg de proteïna per gram de pes fresc, quantitat que va resultar entre 5 i 6 vegades superior a l'estimada per al vector *clbvINpr*. No obstant això, en cítrics, a causa de la inestabilitat del vector *clbv3'pr*, només es va poder quantificar la

proteïna expressada per la construcció del vector *clbvINpr*, estimant-se en 0.6 µg de GFP per gram de pes fresc.

L'efectivitat dels vectors *clbv3'*, *clbv3'pr* i *clbvINpr* per a silenciar gens per mitjà de VIGS es va assajar clonant fragments de gens tant endògens de plantes (*pds*, *actina*, *sulfur*) com el gen *gfp* introduït experimentalment en plantes transgèniques. En cítrics, totes les construccions dels tres vectors van induir fenotip de silenciament del gen assajat, encara que el vector *clbv3'* va ser el més efectiu per a l'estudi de VIGS en este hoste. No obstant això, en *N. benthamiana* només es va desencadenar el silenciament en les plantes inoculades amb la construcció *clbv3'pr-hp58PDS*, que expressa una forquilla de doble cadena d'un fragment de 58 nt del gen *pds*. En totes les plantes silenciades es va detectar una disminució del corresponent mRNA del gen assajat i una acumulació de siRNAs derivats tant del mRNA del gen inserit com del RNA genòmic del virus. D'altra banda, el fenotip de silenciament dels gens assajats es va observar en successives brotacions, la qual cosa confirma la gran estabilitat dels vectors basats en el genoma de CLBV.

Els vectors virals desenrotllats en esta tesi constitueixen una ferramenta eficient per a l'estudi de la funció de gens per mitjà de genètica reversa utilitzant la tècnica VIGS. També poden ser útils per a estudis de genètica directa per mitjà d'expressió de proteïnes o per a la protecció del cultiu enfront de malalties produïdes per virus, bacteris i fongs o enfront de plagues d'invertebrats.