

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



***Análisis de la implicación del factor de inicio de
la traducción 4E de la planta huésped en el
movimiento sistémico del potyvirus del mosaico
amarillo del calabacín***

Grado en Biotecnología

Curso 2014-2015

Autor:

Miguel Estruch Soler

Tutor:

Carmelo López del Rincón

Director:

José Antonio Darós Arnau

Valencia, Febrero de 2015



Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Análisis de la implicación del factor de inicio de la traducción 4E de la planta huésped en el movimiento sistémico del potyvirus del mosaico amarillo del calabacín.
Autor:	Miguel Estruch Soler
Localidad y fecha:	Valencia, Febrero de 2015
Tutor:	Carmelo López del Rincón
Director:	José Antonio Darós Arnau
Tipo de Licencia:	Licencia Creative Commons. "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".

Resumen

El virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) es un virus de ARN perteneciente al género *Potyvirus*. Este virus afecta sobre todo a cultivos de cucurbitáceas, causando importantes pérdidas en todo el mundo. En este trabajo se ha tratado de entender cómo el ZYMV se mueve por la planta huésped. Se disponía de un clon infeccioso del virus etiquetado con el gen reportero *Rosea1* (ZYMV-Ros1), el cual induce la biosíntesis de antocianinas, pigmentos rojos que permiten seguir la infección viral a simple vista. Este virus se replica muy eficientemente en *Nicotiana benthamiana* e induce la producción de antocianinas en el tejido inoculado. Sin embargo, se mueve a larga distancia de forma subóptima y en hojas distales solo se observan unas pocas manchas rojas inducidas por unas pocas partículas virales que, de alguna manera, consiguen entrar en el floema y alcanzar el tejido sistémico. Por esto, debe haber algún factor o factores en las cucurbitáceas, y no en *N. benthamiana*, que medien el movimiento a larga distancia de este virus. Gracias a la posibilidad de seguir visualmente la infección, el clon infeccioso ZYMV-Ros1 constituye un sistema experimental con un enorme potencial para estudiar cuales son estos factores. Varios trabajos previamente publicados han sugerido que los factores de inicio de la traducción 4E (eIF4E) del huésped o sus isoformas eIF(iso)4E podrían mediar en el movimiento a larga distancia de los potyvirus. Con el fin de contrastar esta hipótesis se clonaron los eIF4E y eIF(iso)4E de calabacín (*Cucurbita pepo*) y melón (*Cucumis melo*), huéspedes en los que el ZYMV se mueve eficientemente, de *N. benthamiana* en el que el virus se mueve subóptimamente, y de *N. tabacum* cv. Xanthi nc donde el virus no se mueve. Los factores de traducción se clonaron en un plásmido que permitía su expresión transitoria en *N. benthamiana* y se coexpresaron junto al clon infeccioso ZYMV-Ros1. Se analizó el efecto de esta coexpresión sobre la aparición de focos de infección sistémicos en *N. benthamiana*. Los resultados mostraron que la coexpresión de dos alelos de eIF4E de calabacín y eIF(iso)4E de *N. tabacum* cv. Xanthi nc favorecen el movimiento sistémico del ZYMV, apoyando la hipótesis de que este factor está

implicado en el movimiento a larga distancia del virus. Por otro lado se clonaron el eIF4E de calabacín y el eIF(iso)4E de *N. tabacum* cv. Xanthi nc en el clon infeccioso ZYMV-Ros1 para estudiar el efecto de estas proteínas sobre el movimiento viral cuando se expresan desde la misma poliproteína del virus. En este caso los resultados mostraron que los factores de traducción entorpecían el movimiento viral. La conclusión de este trabajo es que los factores de inicio de traducción del huésped parecen estar implicados en el movimiento a larga distancia del ZYMV pero no son suficientes para mediarlo. Otros factores del huésped deben estar también implicados en el proceso.

Palabras clave

Virus de plantas, virus del mosaico amarillo del calabacín, ZYMV, cucurbitáceas, movimiento sistémico, factores de inicio de la traducción, eIF4E, eIF(iso)4E, gen reportero, Rosea1

Resum

El virus del mosaic groc de la carabasseta (ZYMV) és un virus d'ARN pertanyent al gènere *Potyvirus*. Este virus afecta sobretot a cultius de cucurbitàcies, provocant importants pèrdues en tot el món. En aquest treball es tractà d'entendre com el ZYMV es mou per la planta hoste. Es disposava d'un clon infecció del ZYMV etiquetat amb el gen reporter Rosea1 (ZYMV- Ros1), el qual induïx la biosíntesi d'antocianines, pigments rojos que permeten seguir la infecció viral a simple vista. Este virus es replica molt eficientment en *Nicotiana benthamiana* i induïx la producció d'antocianines en el teixit inoculat. No obstant això, es mou a llarga distància de forma subòptima i en fulles distals només s'observen unes poques taques roges induïdes per unes poques partícules virals que, d'alguna manera, aconseguen entrar en el floema i arribar a teixit sistèmic. Per açò ha d'haver algun factor o factors en les cucurbitàcies, i no en *N. benthamiana*, que medien el moviment a llarga distància d'este virus. Gracies a la possibilitat de seguir visualment la infecció, el clon infecció ZYMV-Ros1 constitueix un sistema experimental amb un potencial enorme per a estudiar quins són estos factors. Diversos treballs, prèviament publicats, han suggerit que els factors d'inici de la traducció 4E (eIF4E) de l'hoste o les seues isoformes eIF(iso)4E podrien mediar en el moviment a llarga distància dels potyvirus. A fi de contrastar esta hipòtesi, es van clonar els eIF4E i eIF(iso)4E de carabasseta (*Cucurbita pepo*) i meló (*Cucumis melo*), hostes en els quals el ZYMV es mou eficientment, de *N. benthamiana*, en que el virus es mou subòptimament, i *N. tabacum* cv. Xanthi nc on el virus no es mou. Els factors de traducció es clonaren en un plàsmid que permetia la seua expressió transitòria en *N. benthamiana* i es van coexpressar junt el clon infecció ZYMV-Ros1. Es va analitzar l'efecte d'esta coexpressió en l'aparició de focus d'infecció sistèmics en *N. benthamiana*. Els resultats mostraren

que la coexpressió de dos al·lels de l'eIF4E de carabasseta i l'eIF(iso)4E de *N. tabacum* cv. Xanthi nc afavorixen el moviment sistèmic del ZYMV, recolzant la hipòtesi de que este factor està implicat en el moviment a llarga distància del virus. Per altra banda, es van clonar l'eIF4E de carabasseta i l'eIF(iso)4E de *N. tabacum* cv. Xanthi nc en el clon infecció ZYMV-Ros1, per a estudiar l'efecte d'estes proteïnes sobre el moviment viral quan s'expressen des de la mateixa poliproteïna del virus. En este cas els resultats mostraren que els factors de traducció entorpien el moviment viral. La conclusió d'este treball és que els factors d'inici de la traducció de l'hoste pareixen estar implicats en el moviment a llarga distància del ZYMV, però no són suficients per a mediar este procés. Altres factors de l'hoste han d'estar també implicats en el moviment sistèmic del virus.

Paraules clau

Virus de plantes, virus del mosaic groc de la carabasseta, ZYMV, cucurbitàcies, moviment sistèmic, factors d'inici de la traducció, eIF4E, eIF(iso)4E, gen reporter, Rosea1

Abstract

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is a RNA virus belonging to genus *Potyvirus*. This virus particularly affects cucurbitaceous plants and induces huge losses worldwide. This work has been aimed to understand how ZYMV moves throughout the host plants. A ZYMV infectious clone tagged with the report gene Rosea1 (ZYMV-Ros1) was available. This virus induces anthocyanin production and red pigments accumulation, allowing the tracking by the naked eye of infection dynamics in the whole plant. The infectious clone efficiently replicates in *Nicotiana benthamiana* and induces anthocyanin synthesis in the inoculated tissue. However, the ZYMV-Ros1 clone moves suboptimally through the plant and a few numbers of red spots are detected in some systemic leaves, what means that, somehow, some viral particles have entered in the phloem and have reached systemic tissues. For this reason, some factor or factors from cucurbitaceous plants that are not present in *N. benthamiana* should mediate in the long-distance movement of this virus. The infectious clone ZYMV-Ros1 provides an extraordinary experimental system to study which are these factors, since the virus allows following the infection by the naked eye. Previous researchers have suggested that the translation initiation factors 4E (eIF4E), from host plants, or its isoforms eIF(iso)4E could mediate in the long-distance movement of potyviruses throughout the host plants. With the aim of testing this hypothesis, the eIF4E and eIF(iso)4E factors from zucchini (*Cucurbita pepo*) and melon (*Cucumis melo*), host plants in which the ZYMV moves efficiently, from *N. benthamiana*, where the virus moves suboptimally, and from *N. tabacum* cv. Xanthi nc, where the virus does not move, were cloned. The

translation factors were cloned in an expression plasmid that allows their expression in *N. benthamiana* and were coexpressed together with the infectious clone ZYMV-Ros1. The effect that the coexpression had on the systemic infection in *N. benthamiana* was analyzed. The results showed that coexpression of two eIF4E alleles from zucchini and the eIF(iso)4E from *N. tabacum* cv. Xanthi nc improved the ZYMV systemic movement, supporting the hypothesis that this factor is involved in the long distance movement of virus. Besides this, the eIF4E from zucchini and the eIF(iso)4E from *N. tabacum* cv. Xanthi nc were cloned in the infectious clone ZYMV-Ros1 to study the effect of these proteins on viral movement when they are expressed from the virus polyprotein. In this case the results showed that translation factors hampered the viral movement. The conclusion of this work is that translation initiation factors of the host appear to be involved in the long distance movement of ZYMV, but they alone are not sufficient to mediate this movement. Other host factors must be also involved in the process.

Key words

Plant viruses, zucchini yellow mosaic virus, ZYMV, cucurbits, systemic movement, translation initiation factors, eIF4E, eIF(iso)4E, reporter gene, Rosea1

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Virus de plantas.....	2
1.2. <i>Potyvirus</i>	3
1.3. Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV)	5
1.4. Movimiento sistémico de los virus	7
1.5. Factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E y su interacción con los virus	8
1.6. Familia de las cucurbitáceas	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES.....	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Material bacteriano.....	15
3.3. Plásmidos	15
4. MÉTODOS	16
4.1. Purificación de ARN total con columnas de gel de sílice	16
4.2. Transcripción inversa (RT)	16
4.3. Amplificación de ADN mediante PCR con la DNA polimerasa Phusion.....	16
4.4. Electroforesis en gel de agarosa	17
4.5. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa	17
4.6. Fosforilación de ADN	17
4.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción	18
4.8. Ligación de ADN	18
4.9. Ensamblaje Gibson	18
4.10. Purificación de ácidos nucleicos a partir de disolución	18
4.11. Transformación de células competentes mediante electroporación	19
4.12. Crecimiento de bacterias en medio de cultivo sólido	19
4.13. Crecimiento de colonias aisladas en medio de cultivo líquido	19
4.14. Extracción rápida de plásmidos para análisis electroforético	19
4.15. Miniprep de plásmidos	20
4.16. Cuantificación de ADN	20
4.17. Secuenciación	20

4.18. Agroinfiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
4.19. Inoculación mecánica de ZYMV-Ros1	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. Clonación de los eIF4E y eIF(iso)4E de melón, calabacín, <i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi y <i>Nicotiana benthamiana</i>	23
5.2. Inserción de los factores de traducción en el vector de expresión pG53TVZ	26
5.3. Coexpresión de los factores de traducción junto al clon viral ZYMV-Ros1 en <i>N. benthamiana</i>	28
5.4. Inserción de los factor de traducción TC01 de calabacín, eIF(iso)4E de <i>N. tabacum</i> y eIF4E de <i>N. benthamiana</i> en el clon infeccioso ZYMV-Ros1	31
5.5. Agroinfiltración de los clones virales derivados de ZYMV-Ros1 que contienen el eIF(iso)4E de <i>N. tabacum</i> y el TC01 de calabacín	36
6. CONCLUSIONES	39
7. BIBLIOGRAFÍA	41
8. ANEXOS	45
Anexo 1: Secuencias consenso de los factores de traducción 4E amplificados	45

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus de plantas

En 1886 el alemán Adolph Mayer publicó los resultados de sus estudios sobre una enfermedad que causaba mosaico en las hojas de tabaco. Mayer consiguió transmitir la enfermedad de plantas infectadas a plantas sanas, pero no consiguió aislar el agente infeccioso. Aunque sí demostró que debía ser muy pequeño y no era cultivable. Años más tarde, en 1892, Dimitri Ivanovsky, trabajando con la misma enfermedad, descubrió que el agente causal pasaba a través de los filtros de porcelana, los filtros bacteriológicos de la época, y propuso que el causante de la enfermedad debía ser un microorganismo productor de toxinas, las cuales sí podían pasar a través de los filtros que utilizó. Pero seis años después, en 1898, Martinus Willem Beijerinck realizó un experimento muy parecido al de Ivanovsky, llegando a la conclusión de que el agente causal no solo podía pasar los filtros de porcelana, sino que además difundía a través de agar y era capaz de multiplicarse en los tejidos de las plantas infectadas, lo cual descartaba totalmente la toxina bacteriana. Beijerinck llamó al agente causal del mosaico del tabaco “*Contagium vivum fluidum*” (Beijerinck, 1898) y aunque al principio tuvo poca aceptación, a principios del siglo XX se fueron descubriendo agentes infecciosos, filtrables, capaces de causar enfermedades en animales y poco a poco fueron adquiriendo el nombre de virus (Milton, 1998; Horzinek, 1997).

Desde el momento en el que Beijerinck acuñó el término de “*Contagium vivum fluidum*” se llevaron a cabo toda una serie de experimentos con el fin de describir lo que hoy conocemos como virus. Los virus son algo totalmente diferente a lo que se conocía hasta la época ya que no son formas de vida celulares. Las partículas virales se ensamblan a partir de los componentes estructurales codificados en su propio genoma y precisan de la maquinaria de la célula huésped para poder replicarse, lo cual hace que fuera de esta no puedan multiplicarse, convirtiéndolos en parásitos obligados (James y Perry, 2004). En cuanto a la morfología, puede ser muy variada, pero todos los virus están formados básicamente por una cápsida proteica que envuelve el material genético, bien en forma de ADN o ARN, tanto de doble como simple cadena, y además, algunos virus presentan una membrana lipoproteica que los rodea. A partir de su material genético los virus generan ARN mensajero (ARNm) para poder sintetizar las proteínas que necesitan para replicarse. Para poder moverse a través de sus plantas huésped necesitan poder interactuar con alguna proteína, o factor, de la misma, que permita su diseminación, ya que por sí solos no tienen esta capacidad (Gergerich y Dolja, 2006).

Los virus de plantas suponen un enorme problema, sobre todo cuando afectan a los cultivos más importantes, sobre los que pueden causar grandes pérdidas en la producción. Esto repercute en pérdidas económicas, como se ve en la Tabla 1, y lo que es más importante, comprometen el abastecimiento de alimentos especialmente en las regiones menos desarrolladas (Strange y Scott, 2005). A pesar de que siempre se toma a los virus como agentes perjudiciales, se están empezando a describir relaciones planta-virus que proporcionan efectos beneficiosos a la propia planta, como aumentar la resistencia a la sequía o las bajas temperaturas (Roossinck, 2013; Xu *et al.* 2008).

Tabla 1. Ejemplos de pérdidas económicas causadas por virus (Hull, 2009). Datos obtenidos a partir de Prins y Goldbach (1996).

Cultivo	Virus	País	Perdidas/año
Arroz	Tungro	Sud este asiático	\$1,5 x 10 ⁹
	Ragged stunt	Sud este asiático	\$1,4 x 10 ⁵
	Hoja blanca	Sur y centro américa	\$9 x 10 ⁶
Cebada	Barley yellow dwarf	RU	£6 x 10 ⁶
Trigo	Barley yellow dwarf	RU	£5 x 10 ⁶
Patata	Potato leafroll	RU	£3 - 5 x 10 ⁷
	Potato virus Y		
	Potato virus X		
Remolacha azucarera	Beet yellows	RU	£5 - 50 x 10 ⁶
	Beet mild yellows		
Cítricos	Citrus tristeza	Todo el mundo	£9 -24 x 10 ⁶
Cassava	African cassava mosaic	África	\$2 x 10 ⁹
Diferentes cultivos	Tomato spotted wilt	Todo el mundo	\$1 x 10 ⁹

Los virus pueden transmitirse de muchas formas. Cada virus es un caso particular y podrá transmitirse de una u otra manera, dependiendo de las interacciones entre virus, huésped y medio ambiente. Una de las principales vías que los virus tienen para pasar de una planta a otra son los vectores, ya sean insectos, hongos o nematodos. Además, el contacto con material vegetal infectado también puede permitir la transmisión del virus, a través de injertos, polen o plantas parásitas por ejemplo. La multiplicación vegetativa de las plantas también es una vía común de propagación viral, en los tubérculos, bulbos o esquejes. Asimismo, unos pocos virus tienen la capacidad de mantenerse en las semillas y de esta forma infectar la nueva planta cuando esta empieza a crecer. Por último es importante señalar que la acción humana favorece la transmisión mecánica de los virus, por medio de los utensilios de trabajo o la ropa. Esto hasta no hace mucho limitaba la transmisión de los virus a zonas más o menos cercanas, pero con la globalización y las formas tan fáciles que hay para moverse a largas distancias se ha favorecido la diseminación de los virus a zonas a las que antes era impensable que pudieran llegar (Roossinck, 2013).

1.2. Potyvirus

La familia *Potyviridae* engloba a unas 200 especies de virus diferentes, los cuales infectan a un gran número de plantas, incluyendo legumbres, cereales, frutales o plantas ornamentales. Entre ellas se encuentran algunas de gran valor comercial, como la patata, tomate, melón o calabacín. Los virus de esta familia se caracterizan por provocar en las células infectadas inclusiones citoplasmáticas en forma de molinillo, fáciles de ver con el microscopio electrónico (López-Moya y García, 2008). Además, todos los virus de esta familia presentan un genoma de ARN de cadena

simple y polaridad positiva, encapsidado en una partícula proteica con morfología de filamento flexuoso (Figura 1).

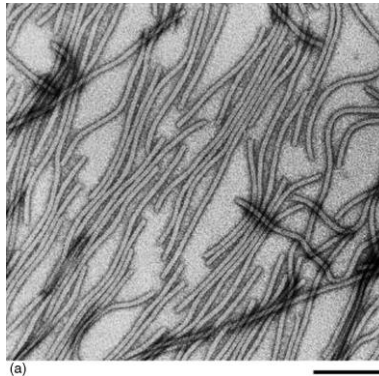


Figura 1. Partículas del virus del grabado del tabaco, género *Potyvirus*, bajo microscopio electrónico. Escala 200 nm (López-Moya y García, 2008).

Esta familia está formada por seis géneros, de los cuales, el género *Potyvirus* es el más importante, ya que engloba a más de la mitad de todos los virus que la forman, unas 120 especies. Los virus de este género son transmitidos por áfidos, de manera no persistente. Las partículas virales tienen una cápsida proteica formada por aproximadamente 2000 unidades de proteína de cubierta (CP), con una longitud de entre 700 y 900 nm y una anchura de entre 11 y 15 nm (Figura 1). El genoma de estos virus es monapartido. Está formado por una única molécula de ARN de cadena simple y

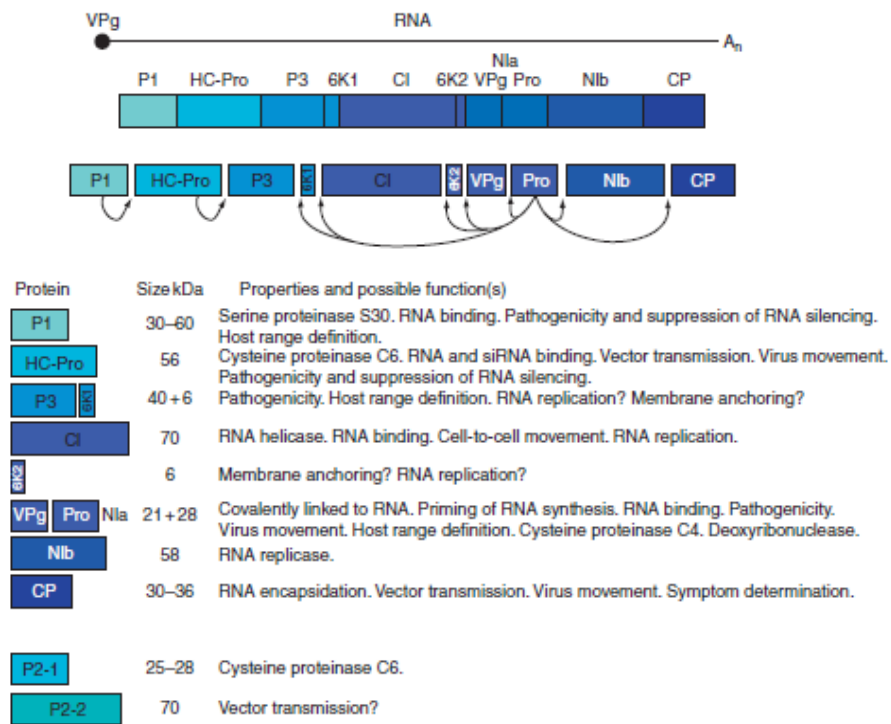


Figura 2. Mapa genómico de los virus del género *Potyvirus*, cascada de proteólisis de la poliproteína formada tras la traducción, las flechas señalan el lugar donde cada proteasa actúa, y función de cada una de las proteínas (López-Moya y García, 2008).

polaridad positiva de 10 kb, unida covalentemente a la proteína VPg (viral protein genome-linked) en el extremo 5'. En 3' contienen una cola de poliadenina de longitud variable. El genoma tiene una pauta abierta de lectura (ORF, de open reading frame) principal, que codifica una poliproteína de entre 340-370 kDa, a partir de la cual se genera una cascada de autoproteólisis, que da lugar a un total de 10 proteínas maduras (Figura 2). Estas son P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaPro, NIb y CP, codificadas del extremo amino- terminal (N-terminal) al carboxilo terminal (C-terminal). Las funciones de estas proteínas y sus tamaños están recogidas en la Figura 2. Además, hay dos regiones de unos 200 nucleótidos no codificantes, tanto en el extremo 5' como en el 3' del genoma, antes de la cola de poliadenina. Estas regiones participan en la traducción y replicación del ARN (Adams et al. 2005; López-Moya y García, 2008).

Una vez el potyvirus entra en la célula vegetal lo primero que ocurre es la liberación del material genético y su traducción a través de la maquinaria de la célula huésped. A continuación, las proteínas virales traducidas actúan junto a proteínas de la planta para formar un complejo de replicación viral. Se forma una doble cadena de ARN a partir de la cual se sintetizan nuevos genomas virales. Estas nuevas cadenas de ARN son encapsidadas, y una vez ensambladas, las nuevas partículas virales ya pueden ser adquiridas por los vectores y transmitirse a otras plantas, o bien, moverse a través de la planta. (López-Moya y García, 2008; Dougherty y Carrington, 1998).

Para moverse a través de la planta es necesario que las partículas virales interaccionen con proteínas de la planta que faciliten su diseminación. Varias investigaciones, como la de Contreras-Paredes *et al.* (2013) o Ruffel *et al.* (2002), señalan a los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E como posibles factores que facilitan el movimiento sistémicos de los potyvirus a través de la planta.

1.3. Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV)

En 1973 apareció una nueva enfermedad en los cultivos de calabacín en el norte de Italia. Años más tarde, en 1981, Lisa *et al.* (1981). describieron que esta enfermedad estaba causada por un virus perteneciente al género de los potyvirus, al que llamaron virus del mosaico amarillo del calabacín (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV). En muy poco tiempo se encontró el ZYMV en los cinco continentes (Lecoq y Desbiez, 2008).

El ZYMV, como todos los potyvirus, presenta partículas virales alargadas y flexuosas, con una longitud de 750 nm, y su genoma está formado por 9600 nucleótidos (Lisa *et al.* 1981). Este virus infecta principalmente a todas las especies de cucurbitáceas, sobre las que puede causar pérdidas de hasta el 100% de la cosecha, sobre todo si infección se produce en estadios tempranos (Blua y Perring, 1989). También puede infectar algunas especies ornamentales o hierbáceas, y aunque estas muestran normalmente síntomas mucho menos severos, siempre aparecen las típicas inclusiones citoplasmáticas en forma de molinillo de los potyvirus (Figura 3). Los síntomas varían dependiendo del cultivo infectado y la cepa del virus, pero en líneas generales puede producir retraso del crecimiento, clorosis local, ampollas, aclaramiento de venas, amarilleamiento y mosaico en las hojas. También deformación de hojas, frutos e incluso semillas, provocando ratios de germinación muy bajos. Además, en los frutos puede causar mosaico, necrosis y

endurecimiento de la carne, entre otros. Si los síntomas son muy severos puede llegar a causar necrosis sistémica y muerte de la planta (Lecoq y Desbiez, 2008; Lisa *et al.* 1981). En la Figura 4 se muestran algunos de estos síntomas.

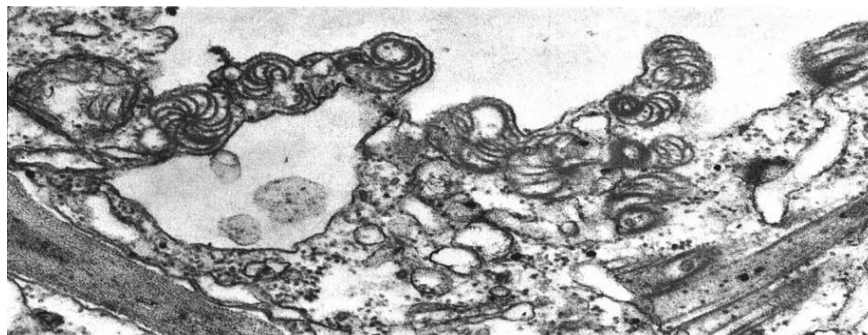


Figura 3. Inclusiones citoplasmáticas en forma de molinillo (pinwheels) provocadas por el ZYMV en células del mesófilo de calabacín. (Lisa *et al.* 1981)

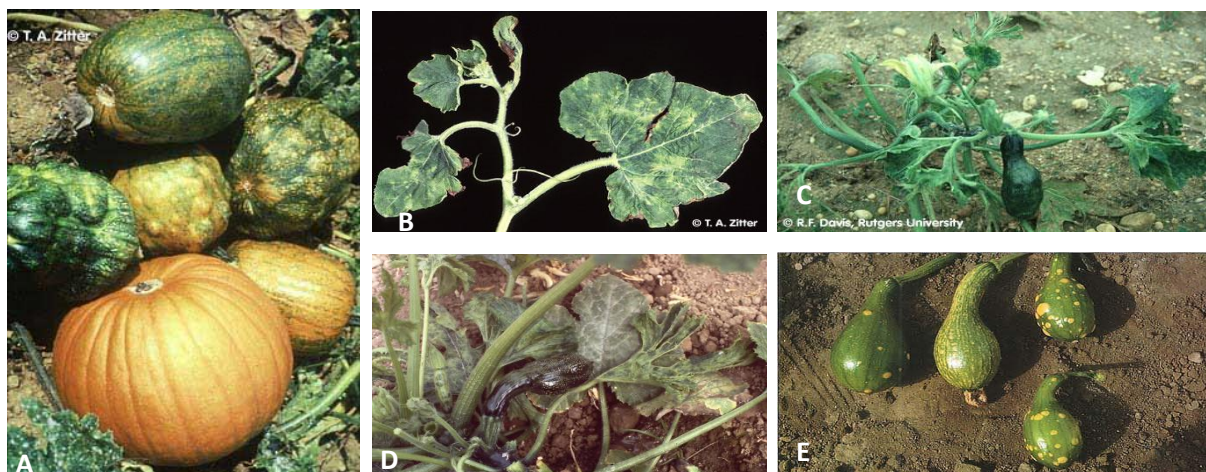


Figura 4. Síntomas causados por el ZYMV. (A) Síntomas en fruto de calabaza (*Cucurbita pepo* L.). (B) Síntomas en hoja de calabaza “butternut” (*Cucurbita moschata*). (C) Síntomas en calabaza de verano (*Cucurbita pepo*). (D) Síntomas en hojas y fruto de calabacín (*Cucurbita pepo*). Tomado de Astier *et al.* (2001). (E) Síntomas en calabaza de verano (*Cucurbita pepo*). Tomado de Perring *et al.* (1992).

El ZYMV se transmite de forma no persistente por medio de diferentes especies de áfidos, como las que se muestran en la Tabla 2 (Lisa *et al.* 1981; Perring *et al.*, 1992). Los principales reservorios son cultivos y hierbas que permanecen infectadas de la temporada previa, aunque los frutos (Lecoq y Desbiez, 2008), e incluso las semillas, también pueden ser focos de infección. Esta última capacidad se ha encontrado sólo en algunas cepas, pero podría explicar la rápida expansión del ZYMV a todo el mundo (Schrijnwerkers *et al.*, 1991; Glasa y Kollerová, 2007).

Tabla 2. Tabla con los diferentes áfidos capaces de transmitir el ZYMV (Perring *et al.*, 1992)

Vectors of ZYMV	
<i>Aphis spireacola</i> Van der Goot	Spirea aphid
* <i>Aphis craccivora</i> Koch	Cowpea aphid
* <i>Aphis gossypii</i> Glover	Melon/cotton aphid
<i>Aphis middletonii</i> (Thomas)	Erigeron root aphid
* <i>Acyrtosiphon kondoi</i> Shinji	Blue alfalfa aphid
* <i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris)	Pea aphid
* <i>Lipaphis erysimi</i> (Kaltenbach)	Turnip aphid
* <i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Thomas)	Potato aphid
* <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	Green peach aphid
<i>Uroleucon</i> sp.	



Figura 5. *Aphis craccivora* Koch

El ZYMV es un virus muy variable. Se han encontrado cepas que causan síntomas muy diferentes en los mismos huéspedes, incluso cepas que encuentran resistencia en huéspedes susceptibles para otras. Además, diferentes cepas son transmitidas por diferentes especies de áfidos. Tras muchos estudios, se ha descrito la región que codifica la CP como zona de alta variabilidad, sobre todo la región N-terminal, ya de por sí muy variable entre los potyvirus. Tal es la variabilidad que actualmente se tienen más de 200 secuencias parciales diferentes de esta región en ZYMV (Lecoq y Desbiez, 2008). Este dato es clave, ya que la amplia capacidad de variar que posee esta especie hace que sea especialmente difícil encontrar resistencias, por lo que es esencial conocer con todo detalle cómo y qué factores intervienen en su replicación y movimiento a través de la planta huésped. Además de todo esto, la peligrosidad de este virus radica en la rapidez en que es capaz de transmitirse e infectar las plantas, sobre todo las más jóvenes. Así, nada más se realiza la plantación, si hay un reservorio de ZYMV, este infectará las plantas más cercanas y en muy poco tiempo los vectores transmitirán el virus a toda la plantación, causando grandes pérdidas.

1.4. Movimiento sistémico de los virus

Una vez el virus entra en una planta y empieza a replicarse tiene dos opciones, bien ser adquirido por un vector y transmitirse a otro huésped, o bien moverse a través de la planta. Los virus pueden moverse a células adyacentes y volver a empezar su ciclo infectivo, o pueden moverse a larga distancia, a otros tejidos alejados del foco primario de infección, lo que se conoce como movimiento sistémico de los virus. Este movimiento sistémico es un proceso muy complejo. Una vez el virus entra en la planta tiene que replicarse dentro de la célula infectada, luego, tiene que moverse célula a célula a través de los plasmodesmos hasta llegar al sistema vascular, a través del cual se mueve a zonas alejadas de la planta. Finalmente, las partículas virales tienen que salir del sistema vascular, para lo cual tienen que restablecer el movimiento célula a célula y su capacidad de replicación. Para que el virus consiga realizar este proceso tiene que pasar a través de tipos celulares y órganos muy diferentes. En la Figura 6 se muestra esquemáticamente este proceso (Nelson y van Bel, 1998; Cronin *et al.*, 1995).

El proceso que permite al virus moverse sistémicamente involucra tanto proteínas del propio virus como de la planta huésped. Muchas investigaciones proponen que las proteínas de los potyvirus VPg, CP o HC-Pro y, particularmente, P3N-PIPO tienen un papel importante en este proceso (Gilbertson y Lucas, 1996; Seron y Haenni, 1996; Cronin *et al.*, 1995; Vijayapalani *et al.*, 2012). En

cuanto a los factores del huésped, se ha atribuido funciones a proteínas como la PME (pectin methylesterase), la β -1,3-glucanasa, o los factores de inicio de la traducción eIF4E y su isoforma eIF(iso)4E (Ueki y Citovsky, 2007). Los factores de traducción 4E poseen la capacidad de moverse a través de las células de las plantas (Gao *et al.*, 2004), lo que los hace grandes candidatos a ser factores clave en el movimiento sistémico de los potyvirus.

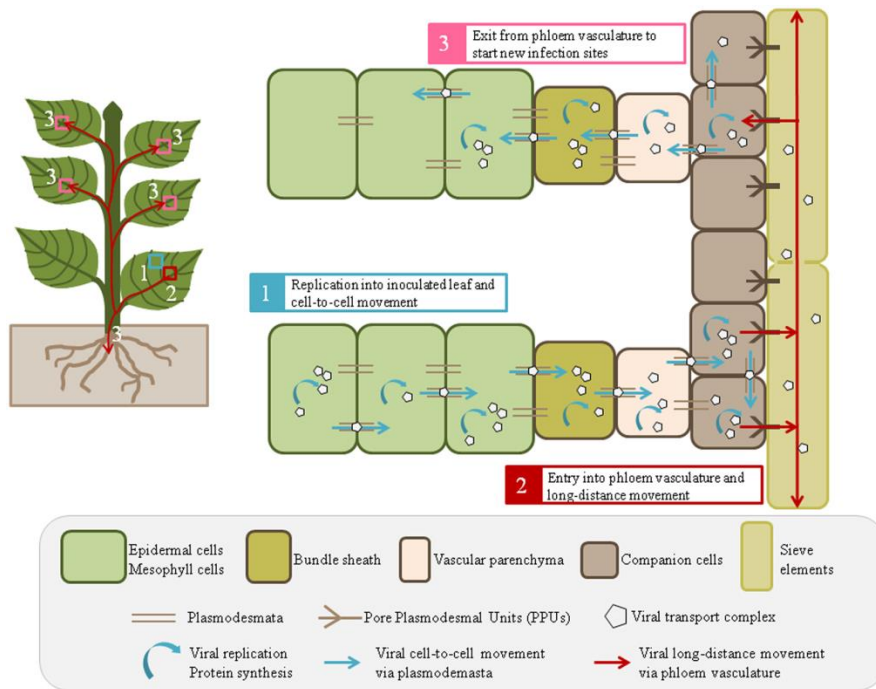


Figura 6. Movimiento sistémico de las partículas virales en la planta. Se ve como el virus ha de pasar por células de diferentes tejidos y a través del sistema vascular para poder llegar a las zonas más lejanas de la planta. Tomado de Clémence *et al.* (2013).

1.5. Factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E y su interacción con los virus

Los factores de inicio de la traducción eIF4E y su isoforma, eIF(iso)4E, forman parte del complejo de inicio de la traducción de eucariotas (Figura 7), y además participan en otros procesos celulares como la exportación de ARN desde el núcleo (Lejbkovicz *et al.*, 1992).

En el proceso de traducción el paso crítico es el del inicio, y es en este momento cuando actúan los factores 4E, ya que son los que interaccionan directamente con los ARN mensajeros a través de la caperuza 5' (Robaglia y Caranta, 2006). Además de con la caperuza 5' de los ARN mensajeros, se ha visto que estos factores son capaces de interaccionar directamente con los ARN virales, permitiendo el inicio de su síntesis (Wang *et al.*, 1997).

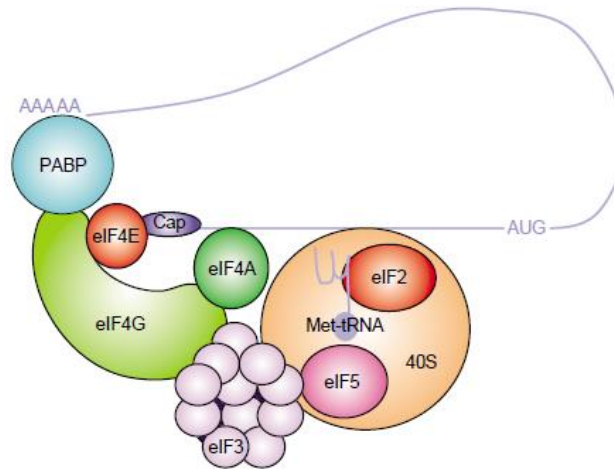


Figura 7. Complejo de inicio de la traducción eucariota (Robaglia y Caranta, 2006). Se observa como es eIF4E el factor que interacciona con la caperuza, Cap, del ARN mensajero.

Hay muchos estudios que describen la relación de los factores 4E con la capacidad de los potyvirus de iniciar su ciclo infeccioso. Wang *et al.* (2009) identificaron al eIF(iso)4E de ciruelo (*Prunus domestica*) como el factor que permitía al virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV) infectar estas plantas a través de la interacción con la proteína viral VPg. Leonard *et al.* (2000) descubrieron que eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* era necesario para que el virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) pudiera infectar estas plantas. Además, se vio que esto se daba por la interacción de la proteína VPg con el factor de traducción y encontraron un dominio de VPg altamente conservado entre los potyvirus a través del que se da la interacción con el factor eIF(iso)4E, sugiriendo que esta interacción es crítica para la producción viral. Estas observaciones, junto a otras mostradas en la Tabla 3, identifican a los factores 4E como cruciales para que los potyvirus puedan iniciar su ciclo infeccioso en las plantas que infectan.

Tabla 3. Factores de inicio de la traducción requeridos por diferentes virus para poder iniciar su ciclo infeccioso.

Virus	Planta	Factor de traducción	Resultado	Referencias
Virus de la sharka (PPV)	<i>Prunus domestica</i>	eIF4(iso)E	82% plantas trasngénicas resistentes	Wang <i>et al.</i> , 2013
Virus del mosaico del nabo (TuMV)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF4(iso)E	Plantas resistentes	Leonard <i>et al.</i> , 2000
Virus del grabado del tabaco (TEV)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF4(iso)E	Plantas resistentes	Lellis <i>et al.</i> , 2002
Virus Y de la patata (PVY)	<i>Capsicum spp.</i>	eIF4E	Plantas resistentes	Ruffel <i>et al.</i> 2002

Además, se ha visto que estos factores no sólo son importantes en el inicio del ciclo infeccioso de los potyvirus, sino que se cree que son necesarios para que estos puedan adquirir movimiento sistémico a través de sus huéspedes. Ruffel *et al.* (2002) vieron que al expresar en un cultivar de

pimiento resistente al virus Y de la patata (PVY) el eIF4E de un cultivar susceptible, el virus era capaz de saltarse la resistencia y además adquiriría la capacidad de moverse sistémicamente por la planta. Algo similar hicieron Nicaise *et al.* (2003), restaurando la infectividad y el movimiento sistémico del virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*, LMV) en plantas resistentes, al expresar el factor eIF4E de huéspedes susceptibles. Contreras-Paredes *et al.* (2012) propusieron también que el eIF(iso)4E de *A. thaliana* era el factor que permitía al virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) moverse sistémicamente por la planta.

Se han descrito interacciones de estos factores con diferentes proteínas de los potyvirus, como HC-Pro (Ala-Poikela *et al.*, 2011), CP (Contreras-Paredes *et al.*, 2012) y VPg (Leonard *et al.*, 2000; Duprat *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). Parece que estas interacciones son muy específicas, por lo que a la hora de estudiar el papel de los factores 4E en el movimiento sistémico del ZYMV es esencial ensayar el máximo número posible de estos factores, seleccionando especialmente los de los huéspedes naturales.

1.6. Familia de las cucurbitáceas

La familia de las cucurbitáceas engloba a 118 géneros y más de 820 especies, de entre estas, algunas de gran valor comercial, como son el calabacín, melón, sandía, pepino o calabaza. Estas plantas se distribuyen por las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Hay muy pocas especies capaces de crecer en zonas de clima templado, ya que todas las plantas de esta familia son sensibles al frío y las heladas.

Todas las especies cultivadas tienen tallo herbáceo, rastrero o trepador, y suelen presentar zarcillos. La gran mayoría son monoicas, aunque también hay dioicas o andromonoicas. Las plantas suelen tener raíces y brotes delgados. La gran mayoría de especies de cucurbitáceas abren sus flores durante el día y permiten así que las abejas, sus grandes polinizadoras, entran en contacto con los granos de polen, recubiertos normalmente por una gruesa capa de aceite de color amarillo o naranja. Hay especies perennes y anuales, aunque todas se cultivan como anuales, siendo el principal objetivo de su cultivo el de la producción de frutos, con morfología, colores y sabores muy variados, tal y como se observa en la Figura 8 (Schaefer y Renner, 2011).



Figura 8. Frutos de cucurbitáceas

La producción de cucurbitáceas es muy importante a nivel mundial. Según la FAO, en 2012 se cultivaron 1.339.006 hectáreas para la producción de melón, 1.788.773 para la producción de calabazas y calabacines, y 2.109.651 para pepinos y pepinillos, produciéndose un total de 31.925.787, 24.616.115 y 65.134.078 toneladas de productos, respectivamente. Estos datos ponen de relieve la importancia de las cucurbitáceas a nivel mundial. El problema es que hay muchas enfermedades causadas por hongos, nematodos, bacterias y virus, que provocan grandes pérdidas en su producción, sobre todo en zonas donde el acceso a los pesticidas es más complicado. Por esto, se está llevando a cabo numerosos proyectos de investigación con el objetivo de conocer cómo actúan estos agentes patógenos, y así, poder desarrollar variedades resistentes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Conocer como los virus se mueven por las plantas huésped resulta esencial para desarrollar estrategias de resistencia a las enfermedades que éstos causan. Se dispone de un clon infeccioso del ZYMV etiquetado con el gen reportero *Rosea1* (ZYMV-Ros1), el cual se replica muy eficientemente en *Nicotiana benthamiana*, pero se mueve a larga distancia de forma subóptima. Trabajos previos sugieren que los factores de inicio de la traducción eIF4E y su isoforma eIF(iso)4E podrían mediar en el movimiento a larga distancia de los potyvirus. En este proyecto de final de grado se pretende:

1. Clonar los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E de *Cucurbita pepo* (calabacín), *Cucumis melo* (melón), huéspedes naturales de ZYMV, y de *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv. Xanthi nc (no huésped) en un plásmido binario que permita su expresión transitoria en *N. benthamiana*.
2. Coexpresar estos factores de traducción junto al clon viral ZYMV-Ros1 en *N. benthamiana* y evaluar su contribución al movimiento sistémico del virus.
3. Insertar alguno de estos factores de traducción en el clon infeccioso ZYMV-Ros1 para que se exprese en el mismo contexto que el resto de proteínas virales.
4. Inocular plantas de *N. benthamiana* con los virus recombinantes que expresan factores de traducción y analizar su efecto sobre el movimiento sistémico del ZYMV-Ros1.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES

3.1. Material vegetal

Para la purificación de ARN mensajero y posterior clonación de los ADN de los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E se utilizaron 0.5 g de tejido foliar de calabacín (*Cucurbita pepo*), melón (*Cucumis melo*), *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc y *Nicotiana benthamiana*.

En los experimentos de infección viral se agroinocularon plantas de *N. benthamiana* de entre 23 y 26 días. Tras la inoculación, las plantas se crecieron en una cámara a 25°C con iluminación mediante tubos fluorescentes y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

3.2. Material bacteriano

Para la clonación y construcción de los plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, mientras que para las agroinoculaciones se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo el plásmido auxiliar pS48.

3.3. Plásmidos

El plásmido pBS Δ E se utilizó para clonar los ADNc de los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E. Se trata de un derivado de pBluescript II KS+ que contiene el gen que confiere resistencia a ampicilina y el fragmento α del gen de la β -galactosidasa interrumpido por un sitio de clonación múltiple. El plásmido pG53TVZ se utilizó para expresar los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E en *N. benthamiana*. Este plásmido permite expresar proteínas en planta bajo control de promotor y terminador 35S de CaMV y secuencias 5' y 3' UTR de TEV. Tiene un polylinker con dos sitios Eco31I y admite insertos flanqueados por 5'-AGCC-3' y 5'-TGAT-3'. El plásmido pBZYMV-F3R es un clon parcial del ZYMV-Ros1 en el que Rosea1 está entre Nib y CP. Este plásmido se utilizó para introducir, entre Rosea1 y CP, los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E en el genoma del ZYMV-Ros1. pGZYMV-Ros1 es el plásmido que contiene el clon completo del ZYMV-Ros1. A este plásmido se traspasaron fragmentos de las construcciones del pBZYMV-F3R, con los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E, y se utilizó para expresar el ZYMV-Ros1 junto con los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E en *N. benthamiana*.

4. MÉTODOS

4.1. Purificación de ARN total con columnas de gel de sílice.

Se trituraron 0.5 g de hojas jóvenes de calabacín, melón, *N. tabacum* cv. Xanthi nc y *N. benthamiana*, con nitrógeno líquido en un mortero. Tras triturar, se añadieron 5 volúmenes (2.5 ml) de tampón TEX (4 M tiocianato de guanidinio, 0.1 M acetato sódico pH 5.5, 10 mM EDTA, 0.1 M 2-mercaptoetanol). El extracto se traspasó a tubos Eppendorf y se mezcló vigorosamente con vortex. Hecho esto, se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el sobrenadante se traspasó a un tubo más grande, donde se añadieron 0.65 volúmenes de etanol al 96%. Se volvió a mezclar con vortex, para después transferir 0.75 ml de la mezcla a columnas de gel de sílice (Thermo Scientific), situadas sobre Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm, se descartó el filtrado y se repitió el proceso hasta pasar todo el extracto. Después, la columna se lavó con 0.5 ml de TLA (70% etanol, 10 mM acetato sódico pH 5.5), centrifugando 30 s. Se descartó el filtrado y se hizo otro lavado con 0.5 ml de TLA, ahora centrifugando 1 min. Tras el lavado, se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y el RNA se eluyó con 40 µl de TEL (10 mM Tris-HCl pH 8.5), incubando 1 min a temperatura ambiente y centrifugando 2 min a 13000 rpm. La elución se repitió dos veces, utilizando para la segunda elución el filtrado de la primera.

4.2. Transcripción inversa (RT)

Para amplificar los eIF4E y eIF(iso)4E de melón, calabacín, *N. Tabacum* cv. Xanthi nc y *N. benthamiana* se realizaron reacciones de RT seguidas de amplificación por PCR. La mezcla de los reactivos se realizó sobre hielo, en cabina de flujo y utilizando puntas con filtro para evitar contaminaciones. En un tubo Eppendorf de 0.2 ml se pipetearon 2 µl de ARN molde, 1 µl de cebador (5 pmol/µl) y 3.5 µl de agua miliQ. La mezcla se incubó en un termociclador (Techne TC-512) a 98°C durante 1.5 min y se dejó bajar la temperatura a 42 °C, momento en el que se añadió 2 µl de tampón RT (x5) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ y 50 mM DTT), 1 µl de 10 mM dNTPs, 0.25 µl de inhibidor de RNasas (40 U/µl) y 0.25 µl del enzima M-MuLV RT (200 U/µl, Thermo Scientific). La incubación continuó 45 min a 42°C, 10 min a 50°C y 5 min a 60°C.

4.3. Amplificación de ADN mediante PCR con la DNA polimerasa Phusion

Mediante la PCR se amplificaron los productos de la reacción de RT. De nuevo, los reactivos se mezclaron sobre hielo, en cabina de flujo y utilizando puntas con filtro. El volumen de reacción final fue de 20 µl y se utilizó el mismo termociclador. En tubos Eppendorf de 0.2 ml se mezcló 1 µl de producto de la RT, 4 µl de tampón HF (x5) (Thermo Scientific), 0.6 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), 0.4 µl de 10 mM dNTPs, 0.4 µl de cada cebador (25 pmol/µl), 0.2 µl del enzima DNA polimerasa Phusion (2U/µl) (Thermo Scientific) y la cantidad de agua miliQ necesaria para alcanzar el volumen final. La reacción se incubó 30 s a 98°C, seguidos de 30 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C para productos menores a 1kpb. Para productos mayores se aplicó la regla de 15 s/1 kpb. Tras los 30 ciclos, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C. En general, para cada PCR se ajustaron el tiempo de extensión y el número de ciclos en función del producto a amplificar.

4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis en gel de agarosa 1% se realizaron para separar y analizar los fragmentos de ADN. Para preparar la agarosa se añadieron 4 g de esta a 40 ml de tampón TAE (x10) (TAE x1 es 40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7.2) y 360 ml de agua. La mezcla se calentó hasta disolver la agarosa y se mantuvo a 60°C. Se utilizaron minigeles (8 x 6.5 x 0.5 cm) o geles más grandes (15 x 11 x 0.5 cm), dependiendo del número de muestras. Los geles se preparan vertiendo 25 ml o 75 ml, respectivamente, de agarosa 1% sobre el soporte donde estaba el peine con el número de pocillos requerido, y dejando enfriar al menos 15 min. A continuación, se retiró el peine y se colocó el gel con su soporte en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos con la cantidad correspondiente del tampón de carga LB (x10) (50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.0025% azul de bromofenol y 0.0025% xilencianol). En todas las electroforesis también se cargaron 10 µl del marcador de pesos molecular de 1 kpb de Thermo Scientific. Tras la carga, los minigeles se corrieron 75 min a 60 V y los geles más grandes a 75 V durante 90 min.

Para la detección del ADN, el gel se colocó en una cubeta con 200 ml de agua y 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Tras 15 min en agitación, el gel se lavó tres veces con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio. El ADN se visualizó mediante irradiación con luz ultravioleta (UVITEC).

4.5. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa

Para purificar ADN a partir de fragmentos de gel de agarosa se utilizó el kit DNA Clean & Concentration™-5 (Zymo Research). Los fragmentos del gel de agarosa que contenían el ADN de interés se cortaron, introdujeron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se pesaron. A continuación se añadieron 3 volúmenes del tampón de disolución de agarosa (ADB) y se incubó 5-10 min a 55°C hasta disolver el gel. La mezcla se traspasó a una columna de gel de sílice situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 10 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Después se lavó la columna añadiendo 200 µl del tampón de lavado (WB), centrifugando 10 s a 13000 rpm. Se retiró el filtrado y se volvió a lavar la columna con 200 µl de WB. La columna se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y el ADN se eluyó con el volumen adecuado (según el caso) de tampón TEL (10 mM Tris-HCl pH 8.5), incubando 1 min a temperatura ambiente y centrifugando otro minuto a 13000 rpm.

4.6. Fosforilación de ADN

Para poder ligar ADN con extremos romos, estos han de estar fosforilados en 5'. Se puede fosforilar bien los cebadores antes de realizar la PCR o bien el ADN a ligar antes de hacer la reacción de ligación. Las fosforilaciones de ADN se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl. Para ello se añadieron 2 µl del tampón PNK (x10) (50 mM Tris-HCl pH de 7.6, 10 mM de MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM espermidina y 0.1 mM EDTA), 0.8 µl de 10mM ATP, 0.4 µl (4U) del enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK; Thermo Scientific), la cantidad necesaria del ADN a fosforilar

(en el caso de cebadores 500 pmol), y agua hasta alcanzar el volumen final. Las reacciones se incubaron 30 min a 37°C.

4.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para digerir ADN con enzimas de restricción, se añadió a un tubo Eppendorf de 0.5 ml la cantidad adecuada de ADN, 10U (en general 1 µl) del enzima de restricción (la mayoría de veces en este trabajo Eco31I), el correspondiente volumen del tampón de reacción (2 µl tampón G x10 para Eco31I; Thermo Scientific), y se incubó 1 h a la temperatura correspondiente (37°C en el caso de Eco31I).

En las digestiones dobles con Mlul y Kpn2I, se mezclaron 2 µl (100ng) del plásmido a digerir, 4 µl de tampón Tango x10 (Thermo Scientific), 1 µl del enzima Mlul (10 U) y agua hasta llegar a los 19 µl. Esta mezcla se incubó 1 h a 37°C. A continuación se añadió 1 µl del enzima Kpn2I (10 U) y se incubó 1 h más a 55°C.

4.8. Ligación de ADN

Todas las reacciones de ligación se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Para ello se añadieron las cantidades de ADN a ligar convenientes, 2 µl del tampón de la DNA ligasa T4 (x10; Thermo Scientific), 1 µl del enzima T4 DNA ligase (5 U) y agua hasta llegar a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó 1 h a 22°C.

4.9. Ensamblaje Gibson

Para construir plásmidos mediante ensamblaje Gibson, se amplificaron por PCR los diferentes ADN con los cebadores calculados por el programa NEBuilder (New England Biolabs). Los ADNs se separaron por electroforesis y se purificaron del gel. Los ADNs se mezclaron en cantidades adecuadas en un volumen final de 5 µl, con un exceso molar de los insertos 2-3 veces superior al del plásmido. Se añadió un volumen de Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs) y se incubó 1 h a 50°C. Los productos de la reacción se purificaron mediante cromatografía en columnas de gel de sílice (Zymo Research) y se utilizaron para electroporar *E. coli* DH5α.

4.10. Purificación de ácidos nucleicos a partir de disolución

Se utilizó el kit DNA Clean & Concentration™-5 (Zymo Research). Se añadieron 100 µl del tampón de unión al ADN (DBB) a la disolución, y la mezcla se traspasó a una columna de gel de sílice, situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 10 s a velocidad máxima, se retiró el filtrado y la columna se lavó dos veces con 200 µl del tampón de lavado (WB), primero centrifugando 10 s y después 30 s. Cuando el ADN purificado se destinó a electroporar bacterias, se realizó un lavado adicional con 200 µl de etanol al 80%, centrifugando 30 s. Finalmente, la columna se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y, para eluir el ADN, se añadió el volumen deseado de TEL. En el caso de las electroporaciones, se añadió 8 µl de TEL diluido (x0.1). Se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se recogió el eluido.

4.11. Transformación de células competentes mediante electroporación

Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Para esto, se mezclan 8 μ l de los productos de las ligaciones o distintas cantidades de los plásmidos purificados con 40 μ l de células competentes (recogidas a densidad óptica a 600 nm [DO₆₀₀] de 0.6 y resuspendidas en 10% glicerol) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. La mezcla se traspasó a una cubeta de 0.1 cm enfriada en hielo y se procedió a electroporar, con un electroporador ECM399 (BTX) con una descarga de 5 ms a 1500 V. Rápidamente, se añadió 1 ml de SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa, pH 7.0). Las células se recogieron con una pipeta y se volvieron a traspasar al tubo Eppendorf, para dejarlas recuperando en agitación durante 1 h a 37°C.

En el caso de *A. tumefaciens* C58C1, se mezclaron 0.5 μ l del plásmido purificado con 40 μ l (DO₆₀₀ de 1.0 y resuspendidas en 10% glicerol) de las células competentes. Se siguió el mismo protocolo que con *E. coli*, pero dejando recuperar las células 2 h a 28°C.

4.12. Crecimiento de bacterias en medio de cultivo sólido

Para seleccionar clones de *E. coli* y *A. tumefaciens* que habían incorporado la construcción de interés se plaquearon 10 μ l y el resto del cultivo de las células recién transformadas en placas Petri y se incubó toda la noche a 37°C. Las placas contenían medio LB (10 g NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 15 g de agar por cada litro), suplementado con los antibióticos adecuados (ampicilina o kanamicina), a una concentración de 50 μ g/ml, dependiendo de las resistencias de las células en crecimiento. En el caso de que el plásmido introducido expresara el marcador lacZ se añadieron 30 μ l de X-gal (50 mg/ml) sobre la superficie del medio 15 min antes de plaquear las células. Tanto el plaqueo de células como la adición de X-gal se realizaron bajo la llama del mechero para evitar contaminaciones.

En el caso de *A. tumefaciens*, las células se plaquearon en medio LB con tetraciclina (7.5 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml), y rifampicina (50 μ g/ml). Dependiendo del tamaño del plásmido, los cultivos se dejaron crecer entre 2 y 5 días, antes de picar colonias para proseguir con la agroinoculación.

4.13. Crecimiento de colonias aisladas en medio de cultivo líquido

A partir de los cultivos en placa, se seleccionaron colonias aisladas con las características deseadas y se cultivaron en 3 ml de LB líquido (sin agar) con el antibiótico adecuado (ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 μ g/ml. En el caso de *E. coli*, las células se incubaron en agitación 24 h a 37°C y en el caso de *A. tumefaciens* durante 1 o 2 días a 28°C.

4.14. Extracción rápida de plásmidos para análisis electroforético

Para extraer plásmidos de las *E. coli* y realizar un análisis electroforético, se llenó un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 0.5 ml del cultivo saturado y se centrifugó 2 min a 13000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 30 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA),

agitando con el vortex. A continuación se añadieron 30 μ l de fenol:cloroformo (1:1, saturado en tampón Tris-HCl pH 8.0), se mezcló bien con vortex y se centrifugó 5 min a 13000 rpm. Finalmente, se tomaron 5 μ l de la fase acuosa, a los que se añaden 5 μ l de tampón de carga con RNasa A. La mezcla se cargó en un gel de agarosa para su análisis electroforético.

4.15. Miniprep de plásmidos

Para la purificación de plásmidos se utilizó el kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Se llenaron tubos Eppendorf de 2 ml con cultivos saturados de *E. coli*, se centrifugó 2 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. A continuación, el sedimento se resuspendió en 250 μ l de tampón CRA (solución de resuspensión celular) mezclando con vortex. Se añadieron 250 μ l de CLA (solución de lisis celular) y 10 μ l de APS (solución proteasa alcalina), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 350 μ l de NBS (solución de neutralización), se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 13000 rpm. Una vez centrifugado, el sobrenadante se transfirió a una columna de gel de sílice situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 30 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Seguidamente, la columna se lavó dos veces con 750 μ l y 250 μ l de CWA (solución de lavado) centrifugando 30 s y 1 min, respectivamente, a 13000 rpm. Finalmente, se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 80 μ l de agua libre de nucleasas y, tras incubar 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 2 min a 13000 rpm para recoger el eluido.

4.16. Cuantificación de ADN

La concentración de los ácidos nucleicos se determinó mediante medida espectrofotométrica utilizando un NanoDrop ND-1000.

4.17. Secuenciación

Se secuenciaron los ADNc correspondientes a los factores de traducción insertados en el plásmido pBS Δ E para comprobar que su secuencia era correcta y no se había introducido ningún error durante su amplificación. Para ello se utilizó el servicio de secuenciación del IBMCP que dispone de un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Las muestras se proporcionaron como alícuotas de 5 μ l a, al menos, 100 ng/ μ l. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las de la base de datos de secuencia del NCBI. Mediante el programa ClustalW, se alinearon las secuencias para detectar posibles mutaciones.

4.18. Agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*

Para agroinfiltrar *N. benthamiana*, se seleccionaron colonias aisladas de *A. tumefaciens* (normalmente se trabajó en paralelo con dos colonias independientes de la misma placa) y se inocularon en cultivos líquidos de 10 ml de LB con kanamicina (50 μ g/ml). Los cultivos se crecieron a 28°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 o más (sin sobrepasar 2.0). A continuación, se tomó la

cantidad de cultivo adecuada y las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 10ml de 10 mM de MES-NaOH pH 5.6, 10 mM de MgCl₂ y 150 μM acetosiringona a una DO₆₀₀ de 0.5. Los cultivos se incubaron 2 h a 28°C y se utilizaron para agroinocular las plantas. Para la agroinoculación, los cultivos se cargaron en una jeringa sin aguja y se infiltraron en el envés de la hoja. Para cada combinación de plásmidos se agroinfiltraron seis plantas con dos hojas por planta.

4.19. Inoculación mecánica de ZYMV-Ros1

Para inocular plantas con ZYMV-Ros1, se trituró tejido infectado por el virus (ZYMV-Ros1) en mortero con N₂ líquido y se añadieron 10 volúmenes del tampón TI (50 mM de fosfato potásico pH 8.0, 1% PVP-10, 1% PEG-6000, 10 mM 2-mercaptoetanol). La mezcla se mantuvo siempre en hielo. Se preparó carborundo al 10% en el mismo tampón. La inoculación se realizó pipeteando primero 5 μl de la solución de 10% carborundo sobre el haz de la hoja a inocular y, después, restregando suavemente sobre la hoja un bastoncillo higiénico empapado en el extracto sin clarificar. ZYMV-Ros1 se inoculó sobre las hojas previamente agroinfiltradas con los clones que expresan los distintos factores de inicio de traducción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Clonación de los eIF4E y eIF(iso)4E de melón, calabacín, *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc y *Nicotiana benthamiana*.

El objetivo inicial del trabajo fue clonar los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E de melón, calabacín, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc y *N. benthamiana*, primero en el vector de clonación pBSΔE y posteriormente en el vector de expresión en plantas pG53TVZ. Este último vector permite expresar proteínas bajo control del promotor y terminador 35S del CaMV, e incluye secuencias 5' y 3' UTR del TEV. En la base de datos de secuencias Uniprot, la primera entrada que aparece para el eIF4E de *N. tabacum* es D3UW24. A partir de esta secuencia, utilizando el programa BLAST, se identificaron las siguientes entradas:

```
>gi|290490829|emb|CBJ34332.1| translation initiation factor eIF4E [Nicotiana tabacum]
MVDEVEKSPASLEESKTNTRVEVEGAEVIESDDTMSSSLGNPCKAMKHPLEHSWTFWFDNPSGKSKQAAGSSIRPIYTFSTVEDFWSVYNNI
HHPSKLVAGADFHCFKNIEPKWEDPVCASGGKWTMSFSRGSKSDTCWLYTLAMIGEQFDCGDEICGAVINVRVRQEKIALWTRNAANETAQ
VSIQKQWKEFLDYNDVSGVFI FHDDAKKLDRAAKNRYSV
```

```
>gi|290490828|emb|FN666433.1| Nicotiana tabacum mRNA for translation initiation factor
eIF4E, allele b
ATGGTTGATGAAGTAGAGAAACCGGCGTCGTTAGAGGAATCGAAGACTAATACTCGTGAAGTGGAAAGAGGGAGCAGAGGAAGTTATAGAATC
GGATGATACGATGTCGTCTTTAGGGAACCCATGCAAGGCAATGAAACACCCGCTAGAACATTCATGGACATTTTGGTTCGATAACCCATCAG
GGAAATCAAAACAGGCTGCTTGGGGTAGTTCCATTCGACCCATTTACACCTTCTCCACTGTCGAAAGATTTTGGAGTGTGTACAACAACATC
CACCACCAAGCAAATTTGGCCGTGGGAGCAGACTTCTACTGTTTTAAGAATAAAAATTGAGCCAAAGTGGGAGGATCCTGTCTGCGCCAGCGG
AGGAAAGTGGACAATGAGCTTTTCGAGGGGTAATCTGATACCTGCTGGCTGTATACGCTGCTGGCTATGATTGGAGAACAATTTGACTGCG
GAGATGAAATTTGAGGCTGTTATTAATGTTTCGAGTTAGACAAGAAAAATAGCTTTTGTGGACCAGGAATGCTGCCAATGAAACAGCTCAG
GTGAGCATTTGGTAAACAGTGGAAAGGAATTTCTGGATTACAATGACTCGGTTGGCTTTATATTTTCATGATGATGCAAAGAAGCTAGACAGAG
TGCCAAGAATCGTTATTTCTGTGTGA
```

Igualmente, a partir de la secuencia D3UW24 de *N. tabacum* y mediante el programa BLAST se identificaron las secuencias correspondientes en *N. benthamiana* (entrada DQ393833.1) y melón (entrada DQ393831.1). Además, al realizar un BLAST con la secuencia de melón sobre el transcriptoma de calabacín se identificaron dos entradas para el eIF4E, nombradas TC01 y TC02 (ver Anexo 1). También se identificó la secuencia del eIF(iso)4E de melón con número de entrada EU232172.1, y gracias al artículo de Wang *et al.* (2013), se consiguió la secuencia del eIF(iso)4E de *N. tabacum*, con número de entrada AY699609.1.

Una vez identificadas todas las secuencias de los eIF4E y eIF(iso)4E que se quería clonar, se procedió a extraer y purificar ARN de hojas jóvenes de melón, calabacín, *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv. Xanthi nc. A continuación se realizaron reacciones de RT con 2 µl de los ARNs purificados y, después, para conseguir los ADNc de los factores de inicio de la traducción, se llevaron a cabo reacciones de PCR con 1 µl de los productos de la RT. Las reacciones de PCR se programaron con tiempos de extensión de 30 s, ya que se pretendía amplificar productos de aproximadamente 700 pb. Los cebadores utilizados para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR se muestran en la Tabla 4. Se diseñaron con el fin de introducir sitios de restricción de Eco31I en los extremos 5' y 3' de los productos, lo cual permitiría subclonar los ADNc en el vector de expresión pG53TVZ, después del clonaje inicial en pBSΔE.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar los ADnc de los eIF4E y eIF(iso)4E mediante RT-PCR. Los nucleótidos resaltados en azul son el sitio de reconocimiento de Eco31I. Nb = *N. benthamiana*, Nt = *N. tabacum*, Cm = melón, Ca= calabacín.

Fragmento amplificado	RT	PCR
Nb_eIF4E	D1647: ATTCTATTATAACGATAGAAC	D1645: GGTCTCGAGCCATGGTTGATGAAGTAGAGAAAC D1646: GGTCTCCATCACGCAGAATAACGATTCTTGGCAG
Nt_eIF4E	D1589: GTTACAATTCTATTGTAACG	D1578: GGCGGGTCTCGAGCCATGGTTGATGAAGTAGAGAAAC D1579: CCGCGGTCTCCATCACACAGAATAACGATTCTTGGCAGCTCTG
Nt_eIF(iso)4E	D1592: TGTCAATCCCACACAATAAAGG	D1590: GGCGGGTCTCGAGCCATGGCCACTGAAGCACCGATAG D1591: CCGCGGTCTCCATCACACAGTATATCGACTCTTAGCTG
Cm_eIF4E	D1583: TCACACCATATATTTATTCTTC	D1581: GGCGGGTCTCGAGCCATGGTAGTTGAAGATTCGATGA D1582: CCGCGGTCTCCATCACACCATATATTTATTCTTCGCAAGTCTA
Cm_eIF(iso)4E	D1597: CGACATGATGCAGTTAATGATC	D1595: GGCGGGTCTCGAGCCATGGCCGGTGAGGTAGCGGTGG D1596: CCGCGGTCTCCATCAAACACTGTATCGAGCTTTTGCTG
Ca_TC01	D1586: CCCATGATACGTGCTAGAAACC	D1584: GGCGGGTCTCGAGCCATGGTAGTGAAGAGACGATCA D1585: CCGCGGTCTCCATCACACCGTATATCGGTTCTTCGCA
Ca_TC02	D1588: TATCCTCTGCCGTACCCGATC	D1584: GGCGGGTCTCGAGCCATGGTAGTGAAGAGACGATCA D1587: CCGCGGTCTCCATCATACTGTATACCGGCTCTTCGCA

Los productos de RT-PCR (20 µl) se separaron por electroforesis y se tiñó el gel con bromuro de etidio para su visualización bajo luz ultravioleta (Figura 9).

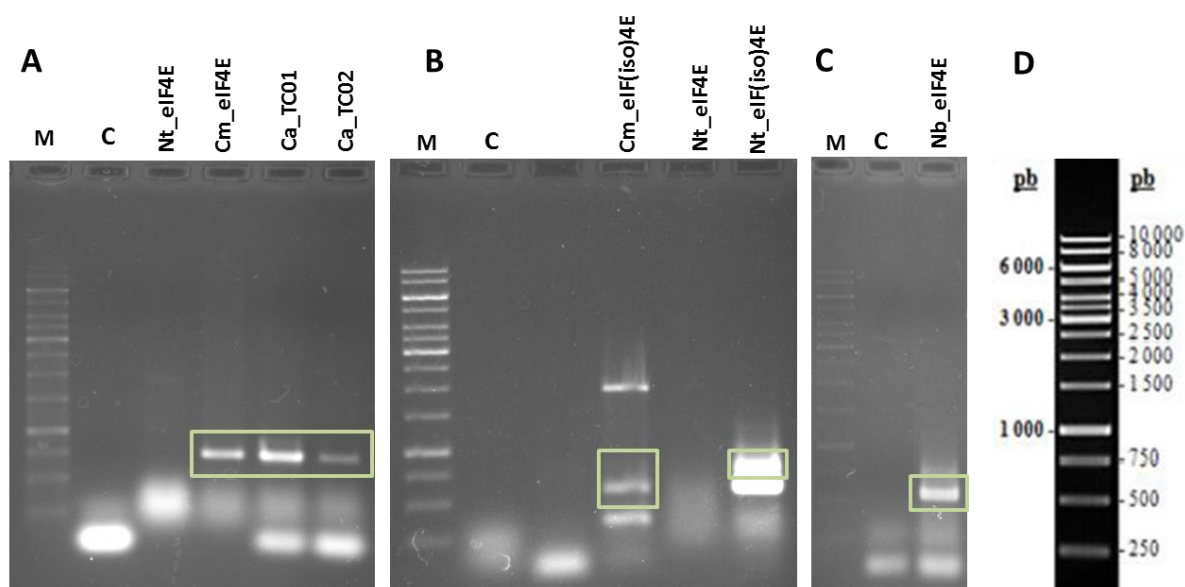


Figura 9. Análisis electroforético de los eIF4E y eIF(iso)4E amplificados por RT-PCR. (A) eIF4E de melón y TC01 y TC02 de calabacín. (B) eIF(iso)4E de melón y de *N. tabacum*. (C) eIF4E de *N. benthamiana*. (D) Marcador de pesos molecular de 1 kpb. En todos los paneles,, M marcador de pesos molecular de 1 kpb y C control de PCR sin molde. En verde se han resaltado los productos que se consideran buenos y que se purificaron para su clonación.

Se consiguieron amplificar todos los factores de traducción excepto el eIF4E de *N. tabacum*, que se intentó amplificar dos veces sin éxito (Figura 9A y B). Los productos correspondientes a los eIF4E y eIF(iso)4E, resaltados en verde en la Figura 9, se purificaron a partir de los geles de agarosa, se fosforilaron en 5' y se ligaron con el plásmido de clonación pBSΔE, abierto en el sitio EcoRV y desfosforilado. Los productos de las ligaciones se introdujeron en células competentes de *E. coli* DH5α mediante electroporación. Las bacterias transformadas se crecieron en placas Petri que contenían medio LB suplementado con X-gal y ampicilina. Tras dejar que crecieran durante 24 h a 37°C se seleccionaron 13 colonias blancas correspondientes al TC01 de calabacín, 12 al TC02 de calabacín, 10 al eIF(iso)4E de melón y 4 correspondientes a cada uno de los otros factores de traducción: eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana* y eIF(iso)4E de *N. tabacum*. Estas colonias se crecieron en medio líquido en presencia de ampicilina. Después se extrajo el ADN y, por electroforesis, se analizó si contenían el plásmido con el inserto, comparando la migración con el plásmido control sin inserto (Figura 10).

Se seleccionaron los cultivos de los que procedían los plásmidos resaltados en verde en la Figura 10. Estos plásmidos tenían tamaños coherentes con el plásmido pBSΔE al que se le había insertado el ADNc del factor de traducción. Los plásmidos de estos cultivos se purificaron mediante el protocolo de miniprep, se cuantificaron mediante medida espectrofotométrica con el NanoDrop ND-1000 y se secuenciaron en el servicio de secuenciación del IBMCP. Para la secuenciación se utilizaron dos cebadores que flanqueaban el sitio de inserción de los factores de traducción, con el fin de obtener la secuencia en las dos direcciones.

Las secuencias se analizaron informáticamente. Utilizando la herramienta “Reverse Complement” (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) se obtuvieron las secuencias complementarias. A continuación se alinearon las dos secuencias correspondientes a cada factor de traducción utilizando ClustalW y se obtuvo una secuencia consenso para cada uno de los insertos. Estas secuencias consenso se alinearon con las secuencias teóricas del correspondiente factor de inicio de la traducción, también mediante ClustalW. Todas las secuencias fueron correctas excepto la del eIF(iso)4E de melón, con la que se realizó un BLAST y se observó que correspondía a una proteína ribosómica, y no al factor eIF(iso)4E, por lo que se descartó para el trabajo subsiguiente.

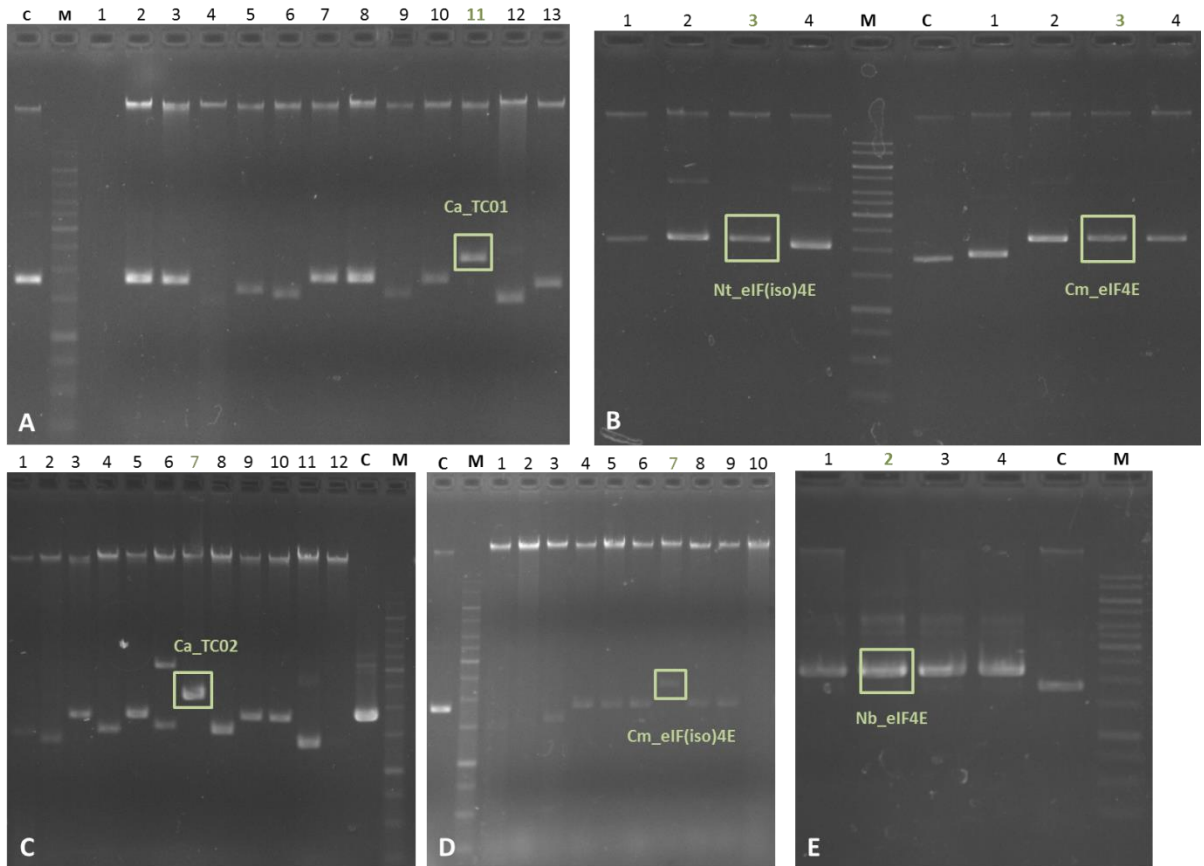


Figura 10. Análisis electroforético de los plásmidos que contienen los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E. Geles de agarosa cargados con ADN extraído de *E.coli* transformadas con los productos de la ligación del plásmido pBSΔE y los factores (A) TC01 de calabacín, (B) eIF(iso)4E de *N. tabacum* y eIF4E de melón, (C) TC02 de calabacín, (D) eIF(iso)4E de melón y (E) eIF4E de *N. benthamiana*. M, marcador de 1 kpb (ver Figura 9D); C, plásmido control, pBSΔE, sin inserto. Resultados en verde los plásmidos que se purificaron y se secuenciaron.

5.2. Inserción de los factores de traducción en el vector de expresión pG53TVZ.

A continuación se procedió a insertar los ADNs de los factores de inicio de la traducción TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana* y eIF(iso)4E de *N. tabacum*, clonados en pBSΔE, en el vector de expresión pG53TVZ. Para ello se aprovecharon los sitios de restricción de Eco31I flanqueando las secuencias de los factores de traducción. Los plásmidos se digirieron con Eco31I. También se digirió con esta enzima el plásmido pG53TVZ que tiene un polylinker con dos sitios de restricción para este enzima. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 11).

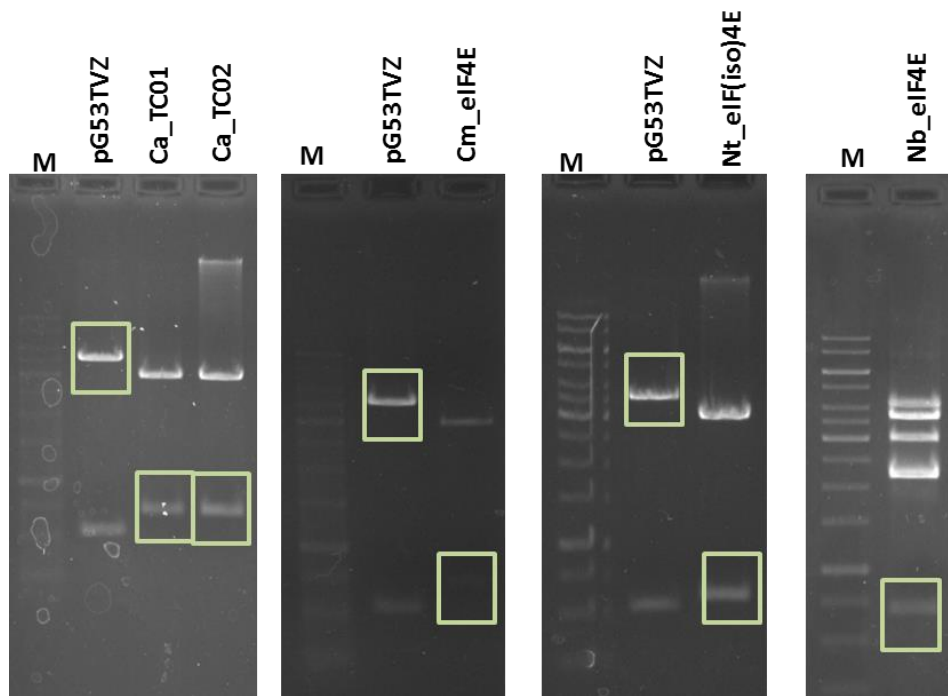


Figura 11. Separación electroforética de los ADNc de los factores de traducción tras la digestión de los plásmidos con Eco31I. En verde se resalta el plásmido pG53TVZ abierto y los fragmentos correspondientes a TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana* y eIF(iso)4E de *N. tabacum*. M, marcador de pesos molecular de 1 kpb (ver Figura 9D).

Los fragmentos correspondientes a TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana*, eIF(iso)4E de *N. tabacum* y al plásmido pG53TVZ, resaltados en verde en la Figura 11, se purificaron del gel de agarosa y se ligaron con el pG53TVZ a través de sus extremos cohesivos. Los productos de la ligación se electroporaron en *E. coli*. Las células transformadas se crecieron en medio LB en presencia de kanamicina. Se picaron colonias y, tras incubarse en cultivo líquido en presencia de kanamicina, los plásmidos purificados se analizaron por electroforesis, comparando su tamaño con el del plásmido control pG53TVZ que contenía, en lugar de los factores de traducción, el gen reportero lacZ (Figura 12).

El análisis electroforético mostró que la ligación se había producido correctamente. Se seleccionaron las preparaciones de los plásmidos resaltados en verde en la Figura 12 para, a continuación, transformar con ellos la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

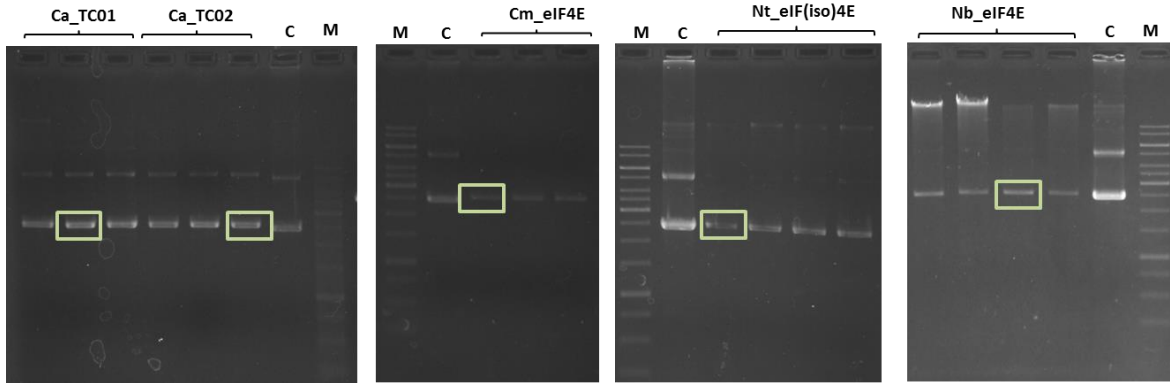


Figura 12. Análisis electroforético de las construcciones de los distintos factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E en el plásmido pG53TVZ. Geles de agarosa cargados con ADN extraído de *E. coli* transformadas con los productos de la ligación del plásmido pG53TVZ y los factores TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana* y eIF(iso)4E de *N. tabacum*. M, marcador de 1 kpb (ver Figura 9D); C, plásmido control pG53TVZ con lacZ en lugar de los factores de traducción. En verde se resaltan los plásmidos seleccionados.

5.3. Coexpresión de los factores de traducción junto al clon viral ZYMV-Ros1 en *N. benthamiana*.

Para estudiar el efecto de los distintos factores de traducción sobre el movimiento sistémico del ZYMV, se inoculó en hojas de *N. benthamiana* el clon infeccioso viral ZYMV-Ros1 que contiene el marcador visual Rosea1 (Ros1) junto con los *A. tumefaciens* que debían expresar los distintos factores. Los plásmidos derivados de pG53TVZ con los factores de traducción TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *N. benthamiana* y eIF(iso)4E de *N. tabacum* se electroporaron en células competentes de *A. tumefaciens*. Las células transformadas se crecieron en cultivo sólido con medio LB en presencia de kanamicina, tetraciclina y rifampicina. Una vez las colonias habían crecido, se seleccionaron dos por cada factor de traducción y se crecieron en cultivo líquido con medio LB y kanamicina. De cada uno de los cultivos ya crecidos se preparó un glicerinado y se almacenó a -80°C , asegurando la viabilidad de las bacterias transformadas para posteriores agroinfiltraciones.

Para expresar conjuntamente el ZYMV-Ros1 y los factores de traducción, se realizaron mezclas de los cultivos de *A. tumefaciens* transformados para expresar los distintos factores con el cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el plásmido pGZYMV-Ros1 que permite la expresión del clon infeccioso viral.

Se hicieron un total de tres experimentos, siempre inoculando, para cada combinación de plásmidos, 6 plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 25 días de edad, e infiltrando dos hojas por planta. Los experimentos fueron:

- A) Infiltración conjunta de los *A. tumefaciens* que contenían los plásmidos derivados de pG53TVZ con los factores de traducción y *A. tumefaciens* con el clon infeccioso ZYMV-Ros1. Las mezclas se hicieron a proporciones 9:1 (factor de traducción: virus) y además se utilizó como control el virus diluido 9:1 con tampón.
- B) Como en A, pero en proporción 99:1 (factor de traducción:virus).

- C) Infiltración con los *A. tumefaciens* que contenían los plásmidos derivados de pG53TVZ con los factores de traducción y posterior inoculación mecánica del ZYMV-Ros1 sobre las hojas previamente agroinfiltradas. Como control se inoculó mecánicamente el virus en plantas que no habían sido agroinfiltradas con anterioridad.

En el caso de los experimentos A y B, las hojas locales, es decir las hojas infiltradas, se volvieron completamente rojas al cabo de unos 10 días. La infección se expandió y el virus logró moverse por la planta, provocando la aparición de focos de infección en hojas sistémicas alejadas del punto de infiltración. Los focos de infección aparecieron como puntos rojos, debido a la acumulación de antocianinas inducida por el gen reportero *Rosea1*. Para analizar el efecto de los diferentes factores de traducción en el movimiento sistémico del ZYMV se contaron todos los focos sistémicos de cada planta, ya que una mayor capacidad del virus de moverse sistémicamente provocaría la aparición de un número mayor de focos en hoja sistémica. El recuento se realizó a los 15 días después de la agroinfiltración. Se sumaron los focos de todas las plantas agroinfiltradas con la misma combinación de plásmidos debido a la variabilidad existente entre plantas.

En el caso del experimento C, en las hojas sobre las que se había realizado la infiltración aparecieron focos de infección, en lugar de volverse completamente rojas. Esto probablemente es debido a que la inoculación mecánica es menos eficiente que la agroinoculación. Se hizo un primer recuento de los focos locales a los 10 días de la infiltración. A los 20 días se realizó un segundo recuento de los focos de infección, pero en hojas sistémicas (Figura 13). Estos datos permitieron obtener el ratio focos sistémicos/focos locales, lo cual medía la capacidad del virus de moverse a través de la planta. En este caso también se sumaron los focos de las seis plantas agroinfiltradas con el mismo factor de traducción.

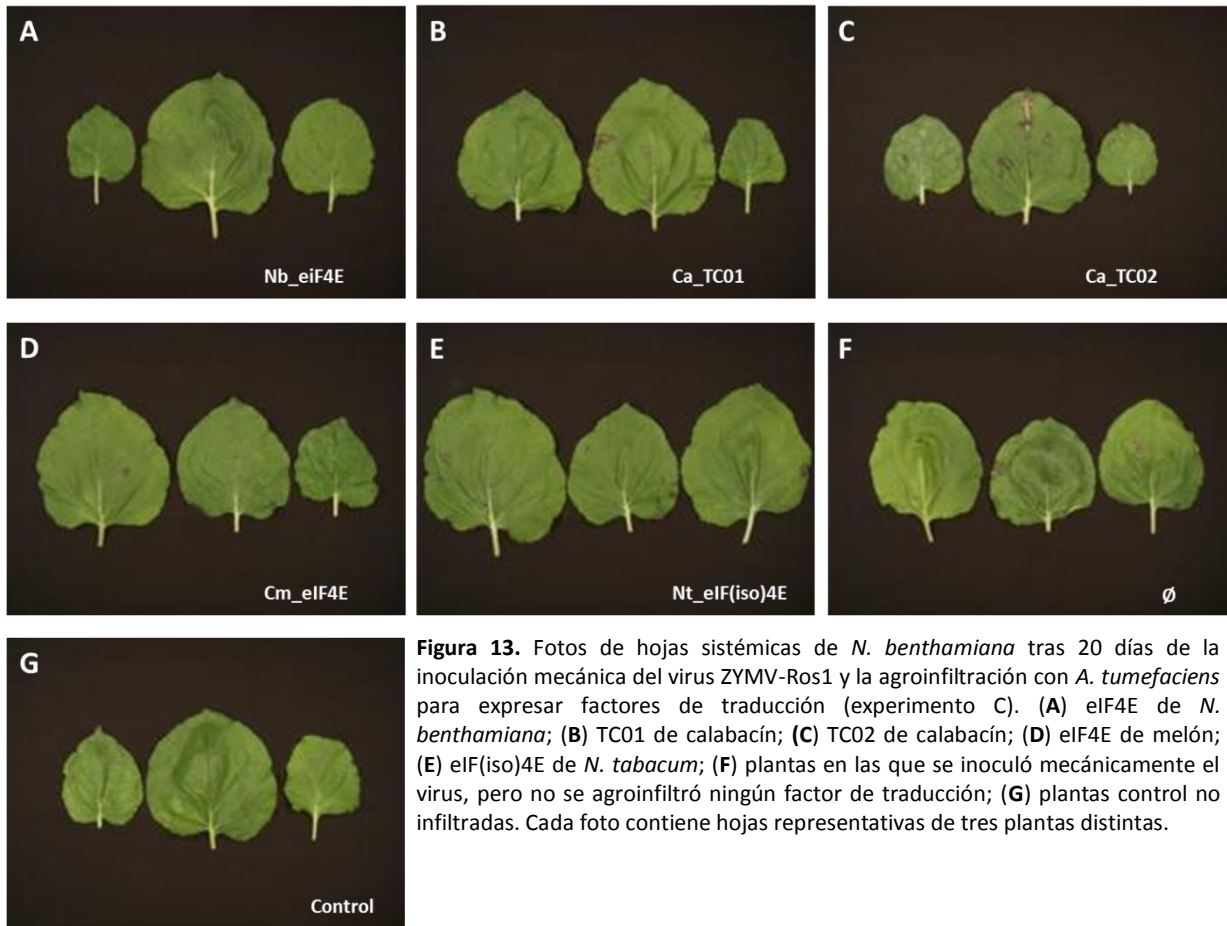


Figura 13. Fotos de hojas sistémicas de *N. benthamiana* tras 20 días de la inoculación mecánica del virus ZYMV-Ros1 y la agroinfiltración con *A. tumefaciens* para expresar factores de traducción (experimento C). (A) eIF4E de *N. benthamiana*; (B) TC01 de calabacín; (C) TC02 de calabacín; (D) eIF4E de melón; (E) eIF(iso)4E de *N. tabacum*; (F) plantas en las que se inoculó mecánicamente el virus, pero no se agroinfiltró ningún factor de traducción; (G) plantas control no infiltradas. Cada foto contiene hojas representativas de tres plantas distintas.

Tras sumar los focos y representarlos gráficamente (Figura 14) se pudo analizar la influencia de los diferentes factores de traducción en el movimiento sistémico del ZYMV. Las plantas en las que se infiltraron conjuntamente el virus ZYMV-Ros1 y el eIF4E de *N. benthamiana* se tomaron como control, ya que estas plantas ya expresan de forma natural esta proteína.

En los tres experimentos apareció un mayor número de focos en las plantas en las que el virus ZYMV-Ros1 había sido suplementado con los factores TC01 de calabacín, TC02 de calabacín y eIF(iso)4E de *N. tabacum*, lo que sugiere que estos tres factores favorecen el movimiento sistémico del ZYMV. Por otro lado, el número de focos de infección sistémicos en las plantas en las que se había suplementado al virus con el eIF4E de melón fue muy similar al de las plantas suplementadas con el eIF4E de *N. benthamiana*. Estos resultados solo coinciden en parte con las propiedades biológicas del virus, que es capaz de moverse sistémicamente en calabacín y melón, pero no en ninguna de las dos especies de tabaco. Es importante destacar que ambas isoformas del eIF4E de calabacín mostraron similar actividad estimulante del movimiento sistémico. Por otro lado, debido a problemas en la clonación, solo se ensayó el eIF4E de melón. Cabe la posibilidad que en esta especie el eIF(iso)4E sea la isoforma implicada en el movimiento sistémico del virus. Debe tenerse también en cuenta que el efecto del factor de inicio de la traducción podría no ser directo. Al estar implicado en traducción, el factor expresado podría estimular la traducción de un gen endógeno de la planta que podría ser el realmente implicado en el movimiento viral. Sin

embargo, si esta posibilidad fuese correcta, cabría esperar que el eIF4E de *N. benthamiana* tuviera el mejor efecto favorecedor del movimiento, lo cual no es así.

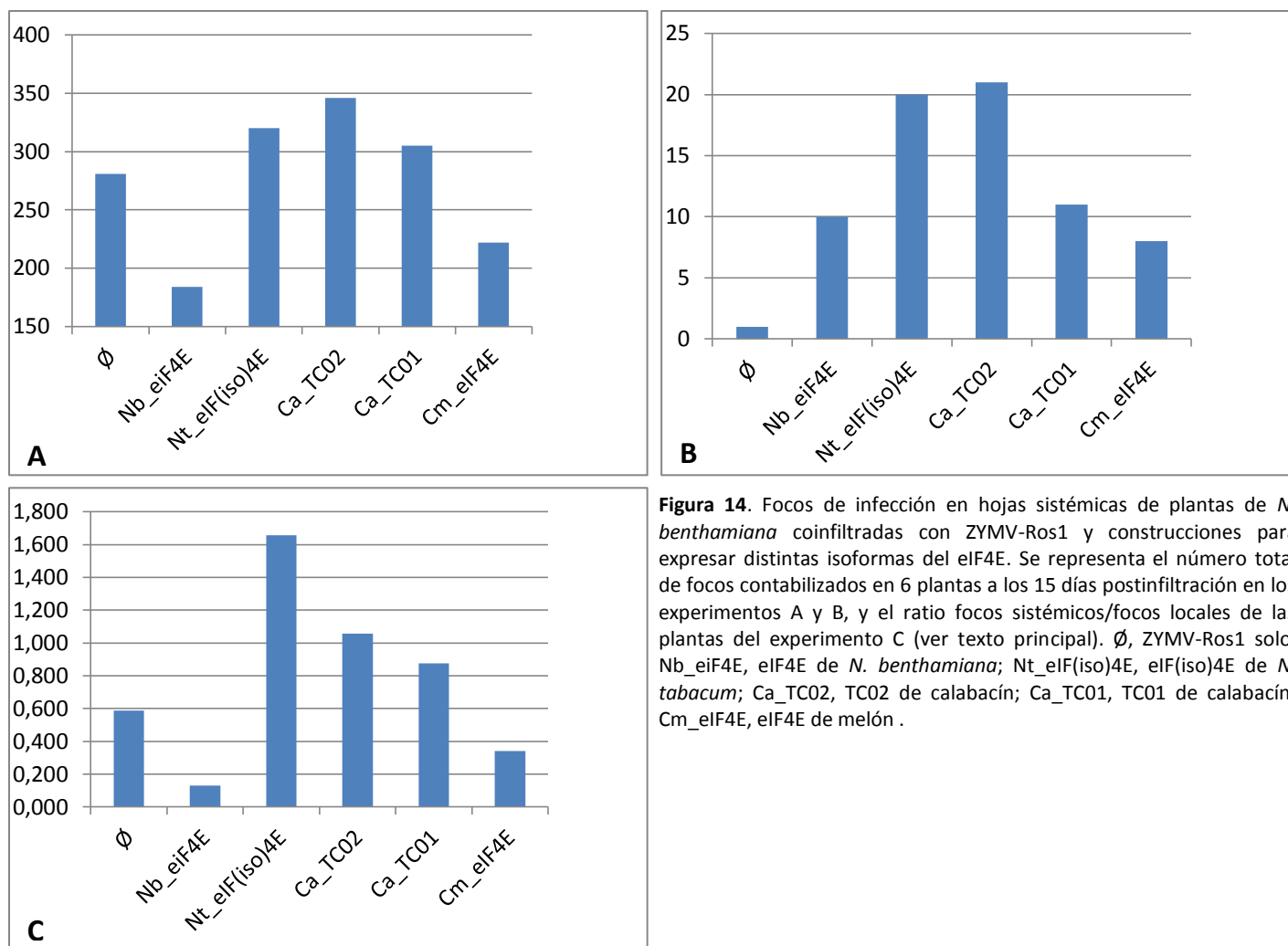


Figura 14. Focos de infección en hojas sistémicas de plantas de *N. benthamiana* coinfiltradas con ZYMV-Ros1 y construcciones para expresar distintas isoformas del eIF4E. Se representa el número total de focos contabilizados en 6 plantas a los 15 días postinfiltración en los experimentos A y B, y el ratio focos sistémicos/focos locales de las plantas del experimento C (ver texto principal). ∅, ZYMV-Ros1 solo; Nb_eIF4E, eIF4E de *N. benthamiana*; Nt_eIF(iso)4E, eIF(iso)4E de *N. tabacum*; Ca_TC02, TC02 de calabacín; Ca_TC01, TC01 de calabacín; Cm_eIF4E, eIF4E de melón .

5.4. Inserción de los factor de traducción TC01 de calabacín, eIF(iso)4E de *N. tabacum* y eIF4E de *N. benthamiana* en el clon infeccioso ZYMV-Ros1.

El efecto estimulante del movimiento sistémico por parte de algunos de los factores de inicio de la traducción no fue muy notable. Una posibilidad es que la coexpresión mediada por *A. tumefaciens* no fuera eficiente para suplementar esta función del virus. Para analizar este aspecto, se realizaron una serie de construcciones en las que los ADNc de una serie de factores seleccionados (TC01 de calabacín, eIF(iso)4E de *N. tabacum* y eIF4E de *N. benthamiana*) se insertaron en el clon infeccioso ZYMV-Ros1. Se pretendía con ello, coexpresar estos factores junto con el resto de proteínas virales, para analizar con mayor precisión su posible efecto en el movimiento sistémico viral.

Se planeó expresar estos factores de traducción entre Rosea1 y CP en la poliproteína del ZYMV-Ros1. En este virus recombinante, la proteína Rosea1 se libera de la poliproteína viral a través de la secuencia de un sitio de procesamiento artificial para la proteasa NlaPro de ZYMV (NlaPro-a1). Para liberar las nuevas proteínas, se diseñó un segundo sitio de procesamiento artificial para la NlaPro del ZYMV, al que se llamó NlaPro-a2. Ambos sitios artificiales, codifican las mismas secuencias de aminoácidos que el natural, que media la separación entre N1b y CP, pero con distintos codones, para no favorecer recombinaciones indeseadas durante la replicación del virus (Figura 15).

Q G D T V M L Q S G T
CAA GGA GAC ACT GTA ATG CTC CAA TCA GGC ACT: sitio natural ZYMV N1b/CP
CAG GGA GAT ACT GTG ATG CTT CAA TCT GGC ACA: sitio artificial ZYMV NlaPro-a1
CAA GGT GAC ACA GTT ATG TTG CAG TCT GGA ACT: sitio artificial ZYMV NlaPro-a2

Figura 15. Diseño del sitio de procesamiento artificial NlaPro-a2. En rojo se muestran los nucleótidos cambiados respecto de la secuencia natural.

Para realizar estas construcciones se partió del plásmido pBZYMV-F3R que contiene el tercio 3' del genoma del ZYMV-Ros1 en el vector de clonación pBSΔE. Se diseñaron cebadores para abrir por PCR el plásmido pBZYMV-F3R e insertar el sitio de procesamiento artificial NlaPro-a2 entre Rosea1 y CP (Figura 16). La inserción de los ADNc de los factores de traducción seleccionados se hizo mediante ensamblaje Gibson, calculando previamente con NEBuilder las secuencias para la recombinación y diseñando con este fin los cebadores que se utilizaron para amplificar los factores de traducción, por PCR, desde el vector de clonación pBSΔE (Tabla 5).

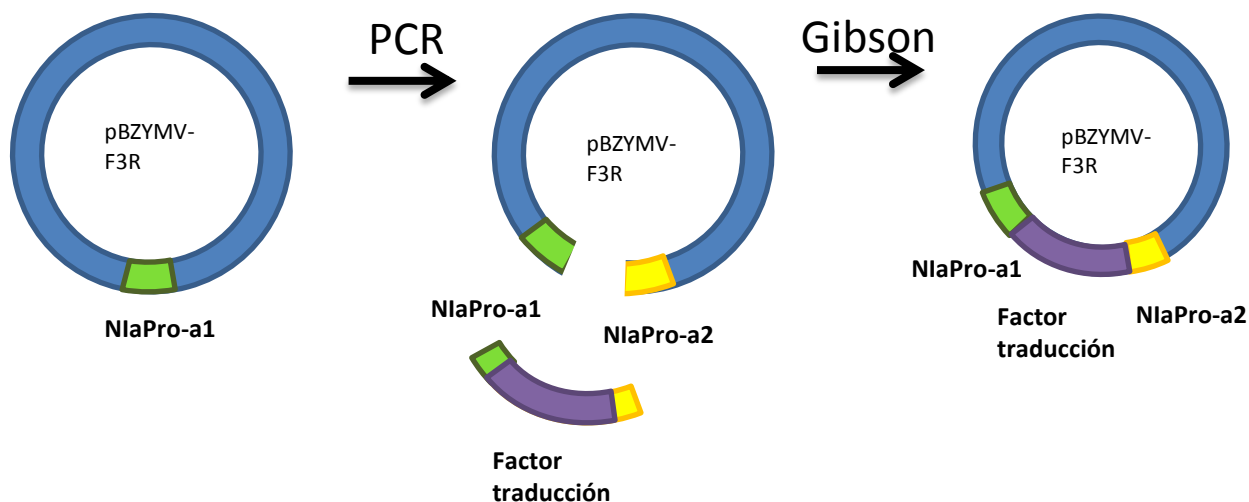


Figura 16. Proceso de amplificación por PCR y ensamblaje Gibson para construir los clones recombinantes del ZYMV que expresen factores de traducción. En la PCR se abrió el plásmido pBZYMV-F3R y se añadió el sitio de procesamiento artificial NlaPro-a2. Los ADNc de los factores de traducción se amplificaron con cebadores que permiten la recombinación propia del ensamblaje Gibson (regiones señaladas en verde y amarillo).

Tabla 5. Cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR del plásmido pBZYMV-F3R y los ADNc de los factores de traducción eIF4E de *N. benthamiana*, eIF(iso)4E de *N. tabacum* y TC01 de calabacín. En verde y amarillo las secuencias de recombinación para el ensamblaje Gibson. En verde se indica la ATG de inicio de los factores de traducción.

Fragmento amplificado	PCR
pBZYMV-F3R [Q40]	D1663: AGTTCCAGATTGAAGCA TCACAGTATCTCC D1664: CAAGGTGACACAGTTAT GTTGCAGTCAGGCACTCAGCCAAGTGTG
Nb_eIF4E	D1669: tgcttcaatctggaact ATGGTTGATGAAGTAGAGAA D1670: ataactgtgtcaccttg CGCAGAATAACGATTCTTGG
Nt_eIF(iso)4E	D1667: tgcttcaatctggaact ATGGCCACTGAAGCACCGAT D1668: ataactgtgtcaccttg CACAGTATATCGACTCTTAG
Ca_TC01	D1665: tgcttcaatctggaact ATGGTAGTCGAAGAGACGAT D1666: ataactgtgtcaccttg CACCGTATATCGGTTCTTCG

Los productos de las diferentes PCRs se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Figura 17A y B). Como se observa, se consiguió abrir el plásmido pBZYMV-F3R e insertar el sitio de procesamiento artificial NlaPro-a2 (Figura 17A). También se amplificaron los ADNc de los factores de traducción eIF(iso)4E de *N. tabacum*, TC01 calabacín y eIF4E de *N. benthamiana* añadiendo tanto en 5' como en 3' las secuencias de recombinación para el ensamblaje Gibson (Figura 17B). Los productos de las PCRs se purificaron del gel de agarosa y tras cuantificarlos mediante medida espectrofotométrica con el NanoDrop se realizó el ensamblaje Gibson. Tras transformar *E. coli* con los productos del ensamblaje Gibson se purificaron los plásmidos de algunas de las colonias. Los plásmidos se analizaron por electroforesis comparándolos con el pBZYMV-F3R original (Figura 17C).

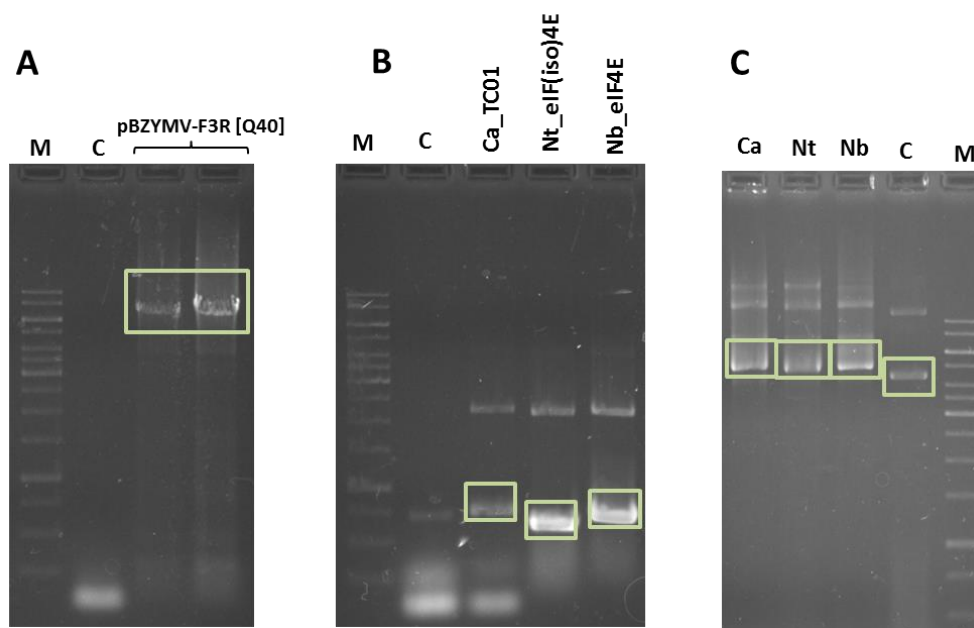


Figura 17. Análisis electroforético de las construcciones de virus recombinantes que expresan factores de traducción. **(A)** Amplificación del plásmido pBZYMV-F3R; C, PCR control sin molde. **(B)** Amplificación de los factores de traducción originalmente clonados en el plásmido pBSΔE; C, PCR control sin molde. **(C)** Plásmidos construidos mediante ensamblaje Gibson; C, control correspondiente al plásmido pBZYMV-F3R original. M, marcador de pesos de 1 kpb (ver Figura 9D).

De este manera se consiguieron construcciones con los factores de traducción eIF(iso)4E de *N. tabacum*, TC01 de calabacín y eIF4E de *N. benthamiana* en un clon parcial del virus ZYMV-Ros1, situados entre Ros1 y CP, y flanqueados por dos sitios de procesamiento artificiales, NIaPro-a1 y NIaPro-a2, para la NIaPro de ZYMV. Para subclonar los fragmentos de ADN de interés en el clon completo ZYMV-Ros1, se buscaron sobre la secuencia del ZYMV-Ros1 dos sitios de restricción flanqueantes y únicos en el plásmido. Utilizando la herramienta NEBcutter, se determinó que la mejor opción era hacer una doble digestión con los enzimas Kpn2I que tiene un sitio de reconocimiento T/CCGGA en 5' de la región de interés y MluI que tiene un sitio A/CGCGT en 3'. Se hizo la doble digestión de todos los plásmidos y se purificaron los fragmentos de ADN adecuados, tras separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 18). A continuación se ligaron los distintos insertos con los factores de traducción al fragmento derivado del pGZYMV-Ros1. Finalmente los productos de la ligación se electroporaron en *E. coli*. Se seleccionaron colonias bacterianas correspondientes a cada construcción y se analizaron sus plásmidos mediante extracción rápida y electroforesis (Figura 19)

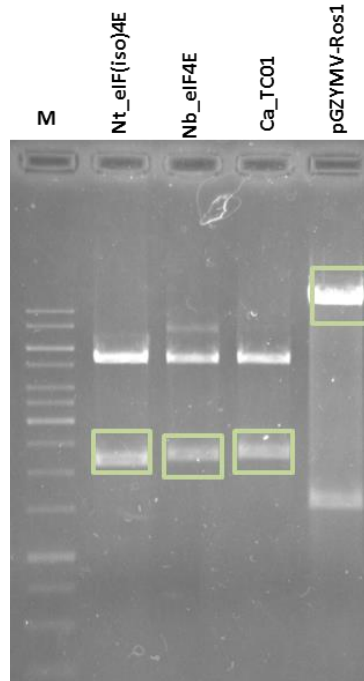


Figura 18. Separación electroforética de los productos de las digestiones con MluI y Kpn2I de los plásmidos intermedios con factores de traducción y del pGZYMV-Ros1. De izquierda a derecha, (M) marcador de 1 kpb (ver Figura 9D) y fragmentos de las digestiones de los plásmidos derivados de pBZYMV-F3R con eIF(iso)4E de *N. tabacum*, eIF4E de *N. benthamiana* y TC01 de calabacín, y de pGZYMV-Ros1. Con un rectángulo verde se resaltan los productos purificados para la posterior ligación.

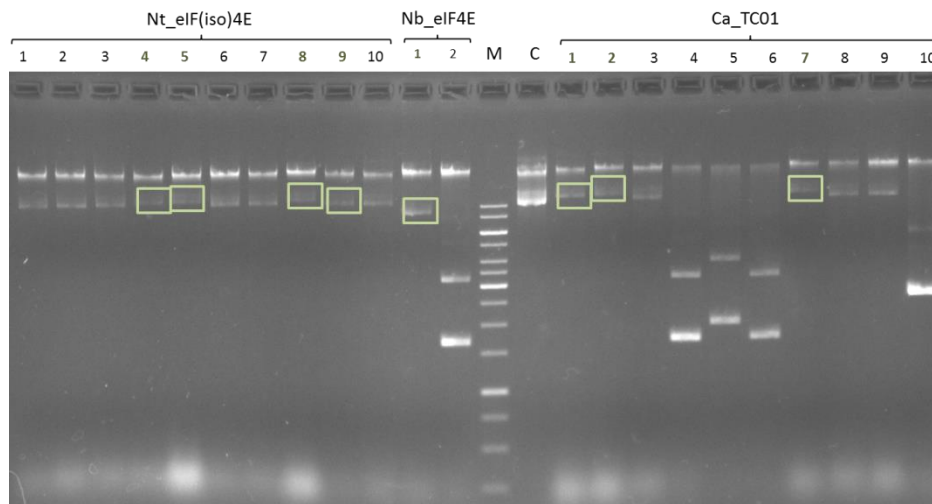


Figura 19. Análisis electroforético de los plásmidos con virus recombinantes que coexpresan Rosea1 y los factores de inicio de la traducción eIF(iso)4E de *N. tabacum*, eIF4E de *N. benthamiana* y TC01 de calabacín. C, plásmido pGZYMV-Ros1. M, marcador de 1 kpb (ver Figura 9D). En verde remarcados los plásmidos cuyos cultivos se eligieron para hacer miniprep.

Se seleccionaron clones cuyos plásmidos tenían el tamaño adecuado (Figura 19) y se hicieron preparaciones de plásmidos a partir de los cultivos correspondientes. Se seleccionaron los cultivos 4, 5, 8 y 9, que debían contener el eIF(iso)4E de *N. tabacum*, el cultivo 1 para el eIF4E de *N. benthamiana* y los cultivos 1, 2 y 7 para el TC01 de calabacín (Figura 19). Tras la miniprep, se corroboró el tamaño de los plásmidos seleccionados (Figura 20).

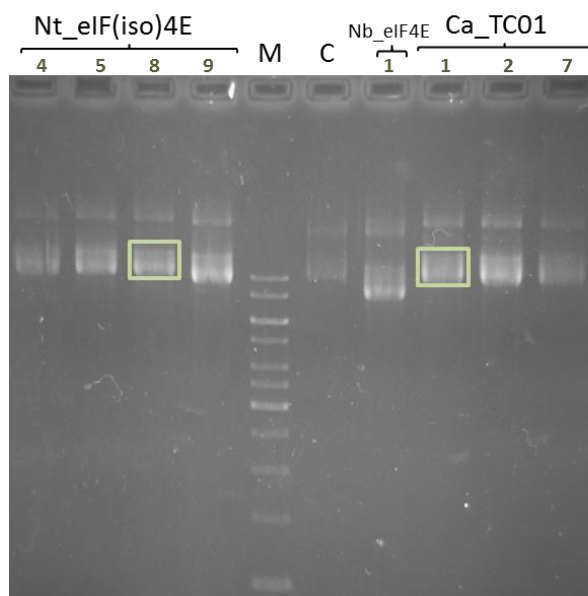


Figura 20. Análisis electroforético de los plásmidos para expresar distintos factores de traducción a partir de plásmidos derivados de pGZYMV-Ros1. C, pGZYMV-Ros1; M, marcador de 1kpb (ver Figura 9D); Nt_eIF(iso)4E, Nb_eIF4E y Ca_TC01, plásmidos con los distintos factores de traducción. En verde se resaltan los plásmidos seleccionados para transformar *A. tumefaciens*.

Los resultados indicaron que solo se consiguió clonar el eIF(iso)4E de *N. tabacum* y el TC01 de calabacín en el clon completo del ZYMV-Ros1. El único plásmido seleccionado que podía contener el eIF4E de *N. benthamiana* tenía menor tamaño que el del control, con lo cual no contenía la construcción de interés (Figura 20).

5.5. Agroinfiltración de los clones virales derivados de ZYMV-Ros1 que contienen el eIF(iso)4E de *N. tabacum* y el TC01 de calabacín.

Para ensayar el efecto de los factores de traducción eIF(iso)4E de *N. tabacum* y TC01 de calabacín sobre el movimiento del ZYMV-Ros1 en un contexto en el que estas proteínas se expresan junto a las proteínas virales, se transformó *A. tumefaciens* con los plásmidos recién construidos. Los *A. tumefaciens* transformados se seleccionaron en presencia de kanamicina, tetraciclina y rifampicina. Se eligieron dos colonias de cada transformación y se crecieron en cultivo líquido con medio LB y kanamicina.

Con las bacterias de estos cultivos se inocularon plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 25 días de edad, infiltrando dos hojas de cada planta. Se agroinfiltraron las construcciones

pGZYMV-Ros1 con el factor eIF(iso)4E de *N. tabacum* y el TC01 de calabacín y además, el mismo plásmido pGZYMV-Ros1 sin ningún factor. Con cada construcción se agroinfiltraron 6 plantas.

Los tejidos infiltrados se volvieron completamente rojos al cabo de 10 días. Posteriormente se observó la aparición de focos de infección en hojas sistémicas, que se contabilizaron transcurridos 15 días desde la agroinfiltración. De nuevo, se sumaron los focos de todas las plantas agroinoculadas con el mismo plásmido. Los resultados indican que ZYMV-Ros1 no mejora substancialmente su capacidad de movimiento sistémico al expresar los factores de traducción a partir del genoma viral.

Las sumas de los focos de infección sistémicos se representan gráficamente en la Figura 21. El gráfico muestra como el ZYMV-Ros1 que no expresa ningún factor de traducción es el virus que se mueve a larga distancia de forma más eficiente en *N. benthamiana*. Estos resultados descartan que el factor de traducción eIF4E sea un factor necesario y suficiente para que el ZYMV se mueva sistémicamente por la planta. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que quedaría por confirmar que las progenies de estos virus recombinantes mantienen el ADNc correspondiente a los dos factores de traducción y que estos no se han perdido al principio de la infección. Si los eIF4E no tienen un papel determinante en el movimiento, es lógico que el virus que no los contiene se mueva más eficientemente, puesto que su genoma es aproximadamente 800 nt menor y se replicará más eficientemente.

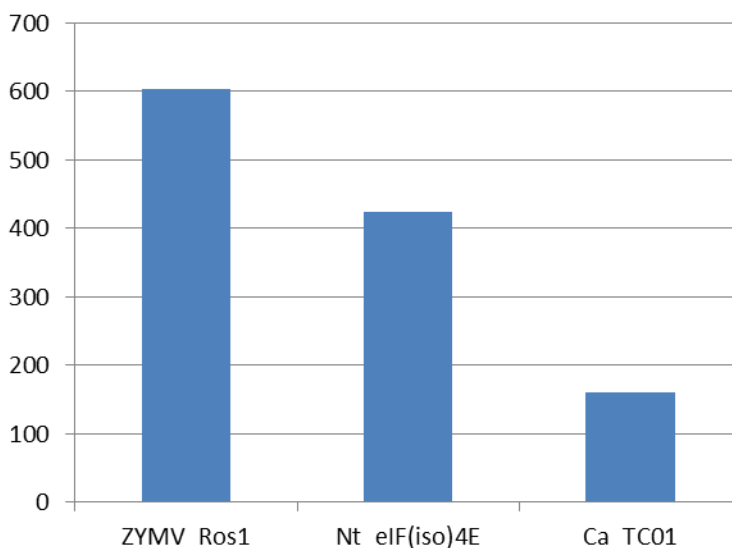


Figura 21. Focos de infección sistémicos en 6 plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con los virus recombinantes ZYMV-Ros1, ZYMV-Ros1-Nt_eIF(iso)4E y ZYMV-Ros1-Ca_TC01.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido clonar los factores de inicio de la traducción TC01 y TC02 de calabacín, eIF4E de melón, eIF4E de *Nicotiana benthamiana* y eIF(iso)4E de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc en un plásmido binario que permite su expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*.

2. La coexpresión de estos factores con un clon infeccioso del virus del mosaico amarillo del calabacín, etiquetado con el marcador visual Rosea1 (ZYMV-Ros1), en plantas de *N. benthamiana*, donde este virus se mueve subóptimamente, sugirió que TC01 y TC02 de calabacín y eIF(iso)4E de *N. tabacum* favorecen el movimiento sistémico del virus, mientras que eIF4E de melón no tiene ningún efecto.

3. Se ha conseguido insertar ADNc correspondientes a los factores de traducción TC01 de calabacín y eIF(iso)4E de *N. tabacum* en el genoma del clon infeccioso ZYMV-Ros1, sin embargo los clones virales recombinantes resultantes no mejoran su capacidad de moverse sistémicamente por la planta.

4. En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que algunas isoformas del eIF4E podrían estar directa o indirectamente implicadas en el movimiento sistémico del ZYMV, pero definitivamente no se trata de un factor suficiente para mediar el movimiento sistémico del virus.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams M.J.; Antoniw J.F. y Fauquet C.M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, 150(3): 459–79. doi:10.1007/s00705-004-0440-6. PMID 15592889

Beijerinck M.W. (1898). Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences*, 65: 3–21. (Translation published in English as *Phytopathological Classics No. 7* [1942], American Phytopathological Society, St. Paul, MN.)

Blua M.J. y Perring T.M. (1989). Effect of zucchini yellow mosaic-virus on development and yield of cantaloupe (*Cucumis-Melo*). *Plant Disease*, 73(4): 317–320

Clémence H.; Brault V.; Ziegler-Graff V. y Revers F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, 4. Artículo 154

Contreras-Paredes C.A.; Silva-Rosales L.; Daròs J.A.; Alejandri-Ramírez N.D. y Dinkova T.D. (2013). The Absence of Eukaryotic Initiation Factor eIF(iso)4E Affects the Systemic Spread of a Tobacco etch virus Isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(4): 461–470

Cronin S.; Verchot J.; Haldeman-Cahill R.; Schaad M. C. y Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, 7: 549–559

Dougherty W.G. y Carrington, J.C.(1998). Expression and Function of Potyviral Gene Products. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 123 -143

Duprat A.; Caranta C.; Revers F.; Menand B.; Browning K.S. y Robaglia C. (2002).The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal*, 32: 927–934

Gao Z.; Johansen E.; Eyers S.; Thomas C.L.; Ellis T.H.N. y Maule A.J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *The Plant Journal*, 40:376–385

Gergerich R.C. y Dolja V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01

Gilbertson R. L. y Lucas W. J.(1996). How do viruses traffic on the ‘vascular highway’? *Trends in Plant Science*, 1: 260–268

Glasa M. y Kollerová E. (2007). Two biologically distinct isolates of Zucchini yellow mosaic virus lack seed transmissibility in cucumber. *Acta Virologica*, 51: 131-133

- Horzinek, M.C.** (1997). The birth of virology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 15-20
- James C.K. y Perry K.L.** (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 5: 505–511
- Lecoq H. y Desbiez C.** (2008). Watermelon mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus. *Encyclopedia of Virology*, 5: 433-440. Oxford. UK: Elsevier
- Lejbkowitz F.; Goyer C.; Darveau A.; Neron S.; Lemieux R. y Sonenberg N.** (1992). A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 9612–9616
- Lellis A.D. et al.** (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology*, 12: 1046–1051
- Leonard S.; Plante D.; Wittmann S.; Daigneault N.; Fortin M.G. y Laliberté J. F.** (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, 74: 7730–7737. Doi: 10.1128/JVI.74.17.7730-7737.2000
- Lisa V.; Boccardo G.; D'Agostino G.; Dellavalle G y D'Aquila M.** (1981). Characterization of a potyvirus that cause zucchini yellow mosaic virus. *Phytopathology*, 71: 667-672
- López-Moya J.J. y García J.A.** (2008). Potyviruses. *Encyclopedia of Virology*, 3^a ed. 313-322. Elsevier, Oxford
- Milton Z.** (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic virus disease. In *Discoveries in Plant Biology*, Kung S.D., Yang S.F., eds. (Hong Kong: World Scientific Publishing Co. Ltd.). 105–110
- Nelson R. S. y van Bel A. J. E.** (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progress in Botany*, 59: 476–533
- Perring T. M.; Farrar C.A.; Mayberry K. y Blua M.J.** (1992). Research reveals pattern of cucurbit virus spread. *California Agriculture*, 46(2): 35–40
- Robaglia C. y Caranta C.** (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1): 40-45
- Roossinck M.J.** (2013). Plant virus ecology. *PLOS Pathogens*, 9(5): e1003304
- Schaefer H. y Renner S.S.** (2011). Cucurbitaceae. en: Kubitzki, K. (ed.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 10: 112-174. Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Berlin: Springer
- Schrijnwerkers C.; Huijberts N.; Bos L. y Neth L.** (1991). Zucchini yellow mosaic virus; two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *The Journal of Plant Pathology*, 97: 187–191

Séron K. y Haenni A. L. (1996). Vascular movement of plant viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 9: 435–442

Strange R. N. y Scott P. R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 83-116

Ueki S. y Citovsky V.(2007) Spread throughout the plant: systemic transport of viruses. In: *Viral Transport in Plants* (Waigmann, E. and Heinlein, M., eds). 86–117. Berlin: Springer

Vijayapalani P.; Maeshima M.; Nagasaki-Takekuchi N. y Miller W. A. (2012). Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLOS Pathogens*, 8(4): e1002639. doi:10.1371/journal.ppat.1002639

Wang S.; Browning K.S. y Miller W.A. (1997). A viral sequence in the 30-untranslated region mimics a 50-cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *The EMBO Journal*, 16: 4107–4116

Wang X.; Kohalmi S.E.; Svircev A.; Wang A. y Sanfaçon H. (2013). Silencing of the Host Factor eIF(iso)4E Gene Confers Plum Pox Virus Resistance in Plum. *PLOS ONE*, 8(1): e50627. doi: 10.1371/journal.pone.0050627

Xu P.; Chen F.; Mannas J.P.; Feldman T.; Sumner L.W. y Roossinck M.J. (2008). Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist*, 180: 911–921

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1: Secuencias de TC01 y TC02 de calabacín

>CUUC30099_TC01 Similar to Eukaryotic translation initiation factor 4E-1 OS=Arabidopsis thaliana
GN=EIF4E1 PE=2 SV=1 (uniprot_sprot:sp|O23252|IF4E1_ARATH)

```
ACGCAGAGTACATGGGGGGGAAGGGAATCCTACTGAAGGCTGATTCAAACGCCTAACAGAAAATTCGAGG
GCGGTGCCATTTTTTCGGTTTCTCCATTGATTGATTCTTCAGATACGCTCGATCCCACGAGTAGTCAACGA
AAAATGGTAGTGAAGAGACGATCAAAGCTACATCGATGGAAGATCTTTCTAATTCATCGCAAATCAAAA
CCCTAGGGGACGAGGCAATGAGGAAGATGAGGATCTTGAGGAAGGACAGATCGTCGGCGACGACGACTT
GGACTCCTCCAATTTATCGGCAGCGATAGTGCATCAGCCTCACCTCTGGAGCACCTTGGACTTTTTGGTTC
GATAACCCATCCGCCAAGTCCAAGCAAGCCACCTGGGGTGCCTATCCGACCGATATACCTTCTCTACC
GTGGAGGAGTTCTGGAGTGTTACAACAATTCATCATCCAAGCAAATTGGCGTTGAGGGCAGATTTGTA
CTGCTTTAAACATAAAAATTGAGCCTAAATGGGAGGATCCTGTCTGTGCGAATGGAGGGAAATGGACTGTAA
ACTTTTCAAGGGCAAATCTGATAATGGCTGGCTATACACGCTGCTTGCTATGATCGGAGAACAGTTTGATT
GTGGTGATGAAATTTGTGGAGCTGTTGTCAACGTTAGATCTGGGCAGGATAAAATATCGATTTGGACTAAG
AATGCTTCCAATGAAGCGGCGCAGGCGAGCATTGGGAAGCAGTGGAAGGAGTTTCTTGATTACAATGATA
GCATTGGCTTTATATTCCACGACGATGCAAAGAAGTTTGACAGGCATGCGAAGAACCGATATACGGTGTA
TATGGTTTCTAGCACGTATCATGGGAGGAGGATACTCATCTATTTGAGCAAAGCATGCCTGCCTCAGCATG
TAAAAGGTTGAGCTATGGCTTCTCCTTTAGTTTCAACTCCCCACTCCCCCAAAGCCAACCACGCCACCAAG
AGAAAAAGTGGTTTTATTCGGTAAACAATGTTTTGTGTGCGATTAGGAATTTTATGTGGAGCAGATTCTTGT
CCTGTACATGACGGCTTTAGTATGAGATGGATGGAACGGAATGCTTTTTCTATAATCAAATGATATTGGCT
TCGTATGAGTTTATTATATTTCTCTCTCATTGCAATTTCTTTGTGTTCAATTTCTAAACTAAATTTTTACAA
TTGGTTAGAAAAAAAATAAATACCAATGTCCATAGACAACATTTCTAAAAAGATTACCCCTTTTGAA
AGAAATACTATTAATTTTTGAATTTCTCCCTAAAAATTTGTAAGTAAAGTTATGAGTGGATAAGACGGGT
CCTGGAGCAAGGCCACCCCGAGGTTAGAGCTATGAACTTTCCCGCCATCTCCCTCTCGTCTCCAGAA
TCTCCGTCTCAAGACTGGTTTGGCTTCTGAAGCAAA
```

```
MVVEETIKATSMEDLSNSIANQNPRGRGNEEDEDLEEGQIVGDDDLSSNLSAAIVHQPHLEHPWTFWFDNP
SAKSKQATWVGASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHPKLLALRADLYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTNFSRKG
SDNGWLYTLLAMIGEQQFDCGDEICGAVVNVRSQDKISIWTKNASNEAAQASIGKQWKEFLDYND SIGFIFHD
DAKKFDRHAKNRYTV*
```

>CUUC30099_TC02 Similar to Eukaryotic translation initiation factor 4E-1 OS=Arabidopsis thaliana
GN=EIF4E1 PE=2 SV=1 (uniprot_sprot:sp|O23252|IF4E1_ARATH)

```
CAGTGGTATCAACGCAGAGAAAATACGAGGGCGGTGCCATTCTTCTCCCTTCGGTTCCCTTCCATTGATTC
CATTTCTCTGATTGCTCAATCCCACAACGAATTAGTGAAAGAAAAATGGTAGTGAAGAGACGATCAAGG
CTCCATCGGCGGAAGATCTCTCAATTCATTGGGAATCAAACCCTAGGGGACGAGGCGCTGAGGAAGAT
GAGGAACTTGAGGAAGGAGAGATCGTCGGCGCCGACGACCTCGACGCGTCCAATTTATCGGCGGCGATAG
TGCACCAGCCTCACCTCTGGAGCACTTTGGACCTTCTGGTTGATAACCCTTCTGCCAAATCTAAACAGGC
CACATGGGGTGCCTATCCGACCGATTTATACCTTCTCTACTGTTGAGGAGTTTTGGAGTGTTTACAACAAT
ATTCATCATCCAAGTAAATTGGCATTGAGGGCAGATTTGTAAGCTTTAAACATCACATTGAGCCTAAATGG
GAGGATCCTGTTTGTGCGAACGGAGGAAATGGACTGTGAATTTTCAAGGGCAAATCCGATAATGGCT
GGCTGTACACGCTGCTTGTATGATCGGAGAACAGTTTGATTGCGGCGACGAAATTTGTGGAGCAGTTGTT
```

AATGTCAGATCTGGGCAGGATAAAATATCGATTTGGACAAAGAATGCTTCTAATGAAGCTGCGCAGGCGAG
CATTGGAAAGCAGTGGAAGGAGTTCCTTGATTACAATGACAGCATTGGCTTTATATTCCATGACGATGCGA
AGAACTCGACAGACATGCGAAGAGCCGGTATACAGTATGATCGGGTACGGCAGGAGGATACTCGTCCGT
CCTAAACGTGCAAAGCATGCTCTGCATCAGCATGTTAATGTTAGTTTGAGTTGTGGCTTCTTCTTTCTTTAGT
TTCAACCCCTCCCCCTCAAGCAAACACACCACACACCACACACCACCTAGTGTTGAACAATGTTTTGTGCGAT
TTGATTTGGAATTTGTGTGGAAATCGCCATTGCTGCACATAACAAGCACCTGAATCTCAGATTCTTGTCTG
TACTTGACAGTTCTAGCATGAGATATGGAACAGGATGATGCTCCTCTACAATCAAATGATGTGTTTTAGCTT
GGTCCGAATCGATATTCATTTCTTTTTATTTAAATTTGAACTCAGGTGATAAATTATATGAAATAACATGACA
TTGAAGTCGATCTTTAACTAAAATCTCTTTT

MVVEETIKAPSAEDLSNSIGNQNPRGRGAEDEEELEEGEIVGADDLDASNLSAAIVHQPHLEHSWTFWFDNPS
AKSKQATWGASIRPIYTFSTVEEFWSVYNNIHHPSKLALRADLYCFKHHIEPKWEDPVCANGGKWTNFSRGKS
DNGWLYLLAMIGEQFDCGDEICGAVVNVRSQDKISIWTKNASNEAAQASIGKQWKEFLDYND SIGFIFHDD
AKKLD RHAKSRYTV*

Las letras en verde indican el inicio del gen, en rojo el final.