



ivia
instituto valenciano
de investigaciones agrarias

DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN DE VIRUS DE RNA DE CULTIVOS HORTÍCOLAS

Ezequiel Alonzo Rangel Aranguren

Tesis doctoral

Directores:

Luis Rubio

Antonio Olmos

Salvatore Davino

Valencia, España

2014

A mi hijo, a mis padres

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Esquema de la tesis	V
Resumen	IX
Abstract	XIII
Resum	XVII
Abreviaturas: nomenclatura de los virus	XXI
1 Introducción	1
1.1. Los virus en la agricultura.....	1
1.2. Emergencia de enfermedades virales	1
1.3. Evolución de los virus.....	2
1.4. Control de las virosis.....	4
1.4.1. Uso de material propagativo libre de virus.....	5
1.4.2. Programas de cuarentena.....	6
1.4.3. Eliminación o prevención de fuentes de infección.....	6
1.4.4. Prácticas agronómicas	7
1.4.5. Control de vectores o del proceso de transmisión.....	7
1.4.6. Protección cruzada.....	9
1.4.7. Utilización de satélites.....	10
1.4.8. Aplicación de químicos antivirales.....	10
1.4.9. Inducción de mecanismos de defensa de la planta.....	10
1.4.10. Obtención de plantas resistentes por mejora genética	11
1.4.11. Obtención de plantas resistentes por transformación genética.....	11
1.5. Detección y diagnóstico de virus	14
1.5.1. Caracterización biológica.....	14
1.5.2. Observación al microscopio.....	16
1.5.3. Análisis serológico.....	17
1.5.4. Análisis de RNA bicatenario	18
1.5.5. Hibridación molecular.....	18
1.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
1.5.7. Amplificación isotérmica.....	22
1.5.8. Diferenciación de variantes genéticas.....	23
1.5.9. Secuenciación nucleotídica.....	25
1.6. Virus utilizados en este estudio.....	27
1.6.1. Fabavirus.....	27
1.6.2. CMV.....	31

1.6.3. TSWV.....	34
1.6.4. ToMV.....	37
1.6.5. Crinivirus de tomate: ToCV y TICV.....	39
1.6.6. PepMV.....	42
1.6.7. ToTV.....	44
2 Justificación y objetivos.....	47
3 El género <i>Fabavirus</i>: caracterización molecular de LMMV.....	51
3.1. Introducción.....	51
3.2. Materiales y Métodos.....	53
3.2.1. Aislado viral.....	53
3.2.2. Extracción de RNA.....	53
3.2.2.1. Extracción de RNA total.....	53
3.2.2.2. Extracción de RNA bicatenario.....	54
3.2.2.3. Tratamiento con DNasa.....	54
3.2.3. Síntesis de cDNA del genoma de LMMV.....	55
3.2.3.1. Construcción de una genoteca aleatoria.....	55
3.2.3.2. RT-PCR con iniciadores específicos para LMMV.....	56
3.2.3.3. RT-PCR de los extremos 5' de los RNAs genómicos.....	57
3.2.3.4. RT-PCR de los extremos 3' de los RNAs genómicos.....	58
3.2.4. Clonaje y secuenciación.....	60
3.2.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	60
3.3. Resultados y discusión.....	61
3.3.1. Características del genoma de LMMV.....	61
3.3.2. Descubrimiento de un motivo conservado: seña de identidad del género <i>Fabavirus</i>	64
3.3.3. Comparación y clasificación taxonómica de LMMV.....	66
4 El género <i>Fabavirus</i>: detección simultánea de todos los fabavirus por RT-PCR.....	69
4.1. Introducción.....	69
4.2. Materiales y métodos.....	71
4.2.1. Aislados virales.....	71
4.2.2. Extracción de RNA.....	72
4.2.3. RT-PCR.....	72
4.2.4. Clonaje y secuenciación.....	72
4.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas.....	72
4.3. Resultados y discusión.....	73
4.3.1. Diseño de iniciadores.....	73
4.3.2. Detección de todos los fabavirus por RT-PCR con iniciadores conservados.....	75
4.3.3. Detección e identificación de cada fabavirus por RT-PCR múltiple.....	79

5 El género <i>Fabavirus</i>: detección simultánea de fabavirus por hibridación molecular.....	79
5.1. Introducción.....	79
5.2. Materiales y métodos.....	81
5.2.1. Aislados virales.....	81
5.2.2. Extracción de RNA.....	81
5.2.3. Síntesis de sondas.....	81
5.2.3.1. RT-PCR y clonaje.....	81
5.2.3.2. Transcripción <i>in vitro</i> : marcaje con digoxigenina.....	82
5.2.3.3. Evaluación de la sondas: concentración y marcaje.....	83
5.2.4. Hibridación de flujo.....	83
5.2.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	85
5.3. Resultados y discusión.....	85
5.3.1. Diseño de las sondas.....	85
5.3.2. Detección de todos los fabavirus por hibridación con una única sonda general.....	87
5.3.3. Detección e identificación de cada fabavirus por hibridación con sondas específicas	88
6 Ribovirus importantes en tomate: Caracterización molecular de ToMV	91
6.1. Introducción.....	91
6.2. Materiales y métodos.....	92
6.2.1. Aislados virales.....	92
6.2.2. Extracción de RNA.....	93
6.2.3. RT-PCR.....	93
6.2.4. Secuenciación.....	94
6.2.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	94
6.3. Resultados y discusión.....	96
6.3.1. Recombinación.....	96
6.3.2. Relaciones filogenéticas de los aislados de ToMV.....	97
6.3.3. Estructura genética y flujo genético entre subpoblaciones de ToMV.....	99
6.3.4. Selección natural.....	100
7 Ribovirus importantes de tomate: detección simultánea de siete virus por RT-PCR.....	103
7.1. Introducción.....	103
7.2. Materiales y métodos.....	104
7.2.1. Aislados virales.....	104
7.2.2. Extracción de RNA.....	104
7.2.3. RT-PCR y PCR.....	105
7.2.4. Clonaje y secuenciación.....	105
7.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas.....	105

7.3. Resultados y discusión.....	105
7.3.1. Diseño de iniciadores.....	105
7.3.2. Desarrollo de la RT-PCR múltiple.....	107
7.3.3. Análisis de muestras de campo mediante RT-PCR múltiple.....	108
8 Conclusiones.....	111
Bibliografía.....	113
Agradecimientos.....	141

ESQUEMA DE LA TESIS

Esta tesis, realizada por Ezequiel A. Rangel, forma parte de una colaboración entre los Dr. Salvatore Davino (Universidad de Palermo), Dr. Antonio Olmos (Instituto Valenciano de investigaciones Agrarias, IVIA) y Dr. Luis Rubio (IVIA) cuyo objetivo general ha sido el desarrollo de métodos moleculares para la detección de virus en cultivos agrícolas. Ezequiel Rangel es un investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de Venezuela que ha disfrutado de una beca predoctoral durante cuatro años para realizar la tesis en el IVIA. Así mismo, el doctorando Stefano Panno, de la Universidad de Palermo, ha realizado varias estancias en el IVIA. Ambos estudiantes realizaron parte de su formación de la tesis doctoral bajo el marco de la colaboración establecida para el desarrollo de métodos moleculares para la detección de virus en especies vegetales teniendo los mismos directores de tesis (Dr. Salvatore Davino, Dr. Antonio Olmos y Dr. Luis Rubio) y compartiendo la autoría de varias publicaciones. En relación a este punto indicar que Stefano Panno presentó en la Universidad de Palermo su tesis doctoral compuesta por un compendio de seis artículos. En la tesis de Ezequiel Rangel se presenta un total cinco de capítulos que corresponden a sendas publicaciones. Puesto que Stefano y Ezequiel han compartido periodo de formación y trabajo, existen un total de cuatro publicaciones que presentan ambos autores. Para que la tesis doctoral presente coherencia, no siendo únicamente un conjunto de artículos en el que el doctorando ha participado, ha habido trabajos que han presentado en ambas tesis. Indicar en este punto que ambos doctorandos acabaron su trabajo experimental al mismo tiempo, pero la elaboración de la tesis de Ezequiel Rangel en capítulos (no incluyendo directamente los artículos publicados) y problemas administrativos han causado la diferencia en la fecha de presentación de ambas tesis doctorales.

A continuación se muestran los trabajos presentados en la tesis doctoral de Ezequiel Rangel, detallando su participación.

Capítulo 1. Introducción. Realizada íntegramente por Ezequiel Rangel.

Capítulo 2. Justificación y Objetivos. Realizada íntegramente por Ezequiel Rangel.

Capítulo 3. El género *Fabavirus*: caracterización molecular de LMMV. El trabajo de laboratorio duró aproximadamente doce meses, siendo realizado mayoritariamente por el doctorando Ezequiel Rangel (90%). Su trabajo consistió en el diseño de los iniciadores, RT-PCR de los distintos fragmentos del genoma del virus, secuenciación mediante Sanger, y los análisis de las secuencias nucleotídicas con diferentes programas bioinformáticos. En el trabajo experimental también han participado Inmaculada Ferriol (5%) y Stefano Pano (5%) con la realización de RT-PCR de algunos fragmentos del genoma del virus. Además, Ezequiel Rangel participó activamente en la discusión de los resultados y sus implicaciones. Esto se refleja en la publicación en la que Ezequiel Rangel es el primer autor: Rangel EA, Ferriol I, Panno S, Davino S, Olmos A, Rubio L. 2013. The complete genome sequence of *Lamium mild mosaic virus* a member of the genus *Fabavirus*. Arch Virol 158:2405-2408.

Capítulo 4. El género *Fabavirus*: detección simultánea de todos los fabavirus por RT-PCR. El trabajo de laboratorio se llevó a cabo durante siete meses principalmente por Stefano Panno (60 %) que se encargó del diseño de los iniciadores y la puesta a punto de las RT-PCRs sencillas y múltiples. Ezequiel Rangel (20%) e Inmaculada Ferriol (20%) participaron con la obtención y caracterización de los aislados de BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV que pertenecen al género *Fabavirus*, así como algunas RT-PCRs. Además, todos ellos contribuyeron en la discusión de resultados. Dado que la implicación en el trabajo de Ezequiel Rangel e Inmaculada Ferriol fue la misma, se siguió el orden alfabético para la inclusión de los autores en el trabajo. Por este motivo, el doctorando Ezequiel Rangel es el tercer autor en la publicación: Panno S, Ferriol I, Rangel EA, Olmos A, Han CG, Martinelli F, Rubio L, Davino S. 2014. Detection and discrimination of fabaviruses by single-step RT-PCR and multiplex RT-PCR. J Virol Meth 197: 77-82.

Capítulo 5. El género *Fabavirus*: detección simultánea de fabavirus por hibridación molecular. El trabajo de laboratorio realizado por Ezequiel duró aproximadamente 24 meses y fue una continuación del trabajo que realizó Inmaculada Ferriol. La contribución en la parte experimental fue del 50 y 45%, respectivamente. Inmaculada Ferriol diseñó y probó las sondas de BBWV-1 y BBWV-2 con algunos aislados de estos dos virus, mientras que Ezequiel Rangel diseñó las sondas para los otros virus del género *Fabavirus*:

GeMV, LMMV, CuMMV, y otro virus relacionado: TRSV y probó las seis sondas con todos los aislados del género *Fabavirus*. Stefano Panno confirmó los resultados obtenidos por las hibridaciones mediante RT-PCR (5% del trabajo). Todo el trabajo se publicó, compartiendo la primera autoría Ezequiel Rangel e Inmaculada Ferriol (para la inclusión de los autores se utilizó el orden alfabético): (Ferriol I & Rangel EA), Panno S, Davino S, Han C.G., Olmos A, Rubio L. 2015. Rapid detection and discrimination of fabaviruses by flow-through hybridization with genus- and species-specific riboprobes. *Ann Appl Biol* 167:26-35.

Capítulo 6. Ribovirus importantes en tomate: Caracterización molecular de ToMV. Todo el trabajo experimental, que incluye diseño de los iniciadores, RT-PCR, secuenciación de fragmentos y análisis de las secuencias nucleotídicas, así como la discusión de resultados ha sido realizado por Ezequiel Rangel (duración 14 meses). Este capítulo aparece únicamente en la tesis de Ezequiel Rangel, y es el primer autor en la publicación. Artículo: Rangel EA, Alfaro-Fernández A, Font I, Luis-Arteaga M, Rubio L. 2011. Genetic variability and evolutionary analyses of *Tomato mosaic virus*. *Virus Genes* 43:435-438.

Capítulo 7. Ribovirus importantes de tomate: detección simultánea de siete virus por RT-PCR. Stefano Panno realizó la mayor parte del trabajo experimental (80%): diseño de los iniciadores, puesta a punto de las técnicas de RT-PCR, clonaje y Ezequiel Rangel (20%) realizó la RT-PCR de las muestras de campo y participó en la discusión de los resultados. Artículo: Panno S, Davino S, Rubio L, Rangel E, Davino M, García-Hernández J, Olmos A. 2012. Simultaneous detection of seven tomato-infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reactions. *J Virol Meth* 186:152-156.

Capítulo 8. Conclusiones. Realizadas íntegramente por Ezequiel Rangel.

RESUMEN

Uno de los problemas a los que se enfrenta la agricultura son los daños producidos por los virus que causan cada año considerables pérdidas económicas en diversos cultivos de todo el mundo. El control de las enfermedades virales es difícil debido a su compleja y dinámica epidemiología, con casos frecuentes de emergencia y rápida dispersión a escala global, así como por su gran capacidad evolutiva que les permite superar distintas estrategias de control, como por ejemplo el cultivo de variedades resistentes obtenidas por mejora genética.

El primer paso para evaluar el estado sanitario de un cultivo y poder aplicar un programa de manejo integrado es disponer de métodos de diagnóstico y detección de los principales virus que sean específicos, fiables, rápidos y sensibles. Dada la situación dinámica de las virosis, en la que continuamente están apareciendo nuevos virus o variantes, es recomendable que los métodos de diagnóstico puedan desarrollarse rápidamente para responder a la demanda, y que sean flexibles de manera que se pueda ajustar al nivel de especificidad requerido (no solamente para la especie viral sino también para categorías taxonómicas superiores, como género y familia; o inferiores, como cepa o grupo de aislados virales). En este respecto, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) y la hibridación molecular de ácidos nucleicos, cumplen estos criterios. Los métodos de PCR tienen la ventaja de ser muy sensibles mientras que los basados en la hibridación permiten analizar simultáneamente un elevado número de muestras. Una modalidad, la hibridación de flujo de improntas vegetales (flow-through hybridization of tissue prints), recientemente desarrollada, supone una importante reducción del tiempo necesario para el análisis al obviar el procesamiento de las muestras y acelerar el proceso de hibridación. En el desarrollo, tanto de la PCR como de la hibridación, es necesario conocer la secuencia nucleotídica de al menos una porción del genoma del virus que se quiere detectar, pero si se quiere sacar el máximo provecho; por una parte, hay que estimar la variabilidad genética entre los distintos aislados del virus, para así evitar o minimizar los falsos negativos (ej. reacción negativa con algunos aislados genéticamente divergentes), y por otra parte, hay que considerar la relación

genética del virus objeto con respecto a otros virus, para evitar falsos positivos (ej. reacción positiva con aislados pertenecientes a otra especie viral).

En esta tesis doctoral se abordaron dos retos relacionados con el desarrollo de métodos moleculares de detección de ribovirus (con genoma de RNA) que afectan a cultivos hortícolas. El primero corresponde a la detección del género *Fabavirus*, que está compuesto por cinco especies virales: virus 1 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1), virus 2 del marchitamiento del haba (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2), virus del mosaico de la genciana (*Gentian mosaic virus*, GeMV), virus del mosaico suave de cucurbitáceas (*Curcubit mild mosaic virus*, CuMMV) y virus del mosaico suave de la ortiga blanca (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV). En primer lugar se secuenció el genoma completo del único aislado disponible de LMMV, ya que era la única especie viral de este género de la que no se disponía ninguna secuencia nucleotídica. La comparación de esta secuencia con la del genoma completo de los otros fabavirus confirmó que LMMV es una especie viral *per se*, al ajustarse a los criterios actualmente aceptados de demarcación entre géneros y especies virales. Se encontró varias repeticiones de un motivo de diez nucleótidos en las zonas no traducibles del extremo 5' de todos los miembros del género *Fabavirus* que se puede considerar como una señal de identidad y serviría para asignar nuevos virus a este género viral. En segundo lugar, a partir de todas las secuencias nucleotídicas disponibles de todos los virus del género *Fabavirus* se diseñó una pareja de iniciadores conservados para poder detectar por retrotranscripción (reverse transcription, RT) y PCR (RT-PCR) todos los fabavirus en una única reacción. También se diseñaron cinco parejas de iniciadores, cada una específica para una especie viral, para poder detectar e identificar cualquiera de estos virus en una única reacción mediante RT-PCR múltiple (multiplex RT-PCR). La combinación de ambos procedimientos de RT-PCR permite detectar e identificar cada una de las cinco especies conocidas del género *Fabavirus*, así como descubrir nuevas especies dentro de este género. En tercer lugar, se diseñó una sonda molecular correspondiente a la región del genoma que contenía las repeticiones del motivo de diez nucleótidos, con la que se pudo detectar las cinco especies del género *Fabavirus* mediante hibridación molecular de flujo. Esta es la primera vez que se consigue una sonda conservada para un género viral. También se diseñaron cinco sondas, cada una específica para cada una de las cinco especies conocidas del género. De manera que mediante hibridación

de flujo con las seis sondas se pueden identificar BBWV-1, BBWV-2, LMMV, GeMV y CuMMV y descubrir nuevas especies dentro del género *Fabavirus*. Para comprobar la especificidad de las técnicas de RT-PCR e hibridación desarrolladas aquí, ambas se probaron con distintos aislados de una misma especie viral que eran genéticamente muy divergentes (identidad ~80%) y no se produjeron falsos negativos. Así mismo se constató *in silico* o *in vitro* que estas técnicas no producían falsos positivos al no detectar otros virus relacionados fuera del género *Fabavirus*, como son aquellos que pertenecen a los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*, que junto el género *Fabavirus* forman la subfamilia *Comovirinae*.

El otro reto que se planteó fue la detección e identificación de los siete ribovirus más importantes en los cultivos de tomate del área mediterránea y otras áreas subtropicales: virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), virus de la clorosis infecciosa del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV), virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV), y virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV). Primero se caracterizó la variabilidad genética de ToMV puesto que era el único de estos virus en la que no se había estudiado este atributo. Se encontró tres grupos de aislados que tenían entre ellos identidades nucleotídicas menores al 90%. Sin embargo, solamente uno de estos grupos se había dispersado por el mundo y se caracterizaba por una gran estabilidad y muy baja variabilidad genética (identidades mayores del 98%). A partir del análisis de todas las secuencias disponibles de estos siete virus se diseñaron siete parejas de iniciadores específicos para cada virus. Se tuvo en cuenta la variabilidad genética dentro de cada uno de los siete virus para evitar o minimizar los falsos negativos. Mediante dos RT-PCR múltiples (una para CMV, ToMV y TICV y la otra para TSWV, ToCV, ToTV y PepMV) se pudo detectar e identificar cada especie viral tanto en infecciones únicas como múltiples en muestras de campo de Sicilia con una prevalencia variable según el virus y el área geográfica.

Los métodos moleculares de detección desarrollados en esta tesis permiten llevar a cabo prospecciones rutinarias en grandes áreas de cultivo, recabando información epidemiológica muy valiosa para el manejo de

enfermedades a diferentes escalas geográficas, y constituyen una primera línea de defensa frente a la ocurrencia de brotes de las enfermedades virales. El desarrollo y adopción de esta metodología supone un aporte que contribuiría a mejorar la gestión de la calidad por parte de empresas productoras y distribuidoras de semillas o propágulos asexuales, y a las agencias gubernamentales reguladoras del comercio internacional de estos productos con la finalidad de disminuir los riesgos y reducir el enorme impacto económico, valorado en decenas de millones de euros anuales, en pérdidas directas e indirectas, que implica la emergencia y dispersión de los virus en las economías de los países afectados.

ABSTRACT

Viruses cause considerable economical losses in diverse agricultural crops worldwide every year. Disease control is difficult because of the complex and dynamic epidemiology of viruses (with frequent emergence cases and outbreaks), as well as the great ability of viruses to evolve and overcome disease control strategies, such as breeding resistant cultivars. Development of tools for rapid, sensitive and specific detection and identification of viruses is pivotal to monitor crop health status and for disease management programs. These tools should be of rapid design to keep pace with the continuous appearance of new viruses or virus variants, and flexible to adjust the level of specificity to different taxonomic categories, i.e. family, genus, species, strain or group of isolates. For this purpose, the molecular techniques based on polymerase chain reaction (PCR) and molecular hybridization are well suited. The main advantage of PCR is a very high sensitivity whereas molecular hybridization is more appropriate for large scale analysis. Design of both PCR and hybridization require information on: nucleotide sequences, genetic variability among viral isolates to avoid or minimize false negatives, and genetic relationships with other viruses to avoid or minimize false positives.

This doctoral thesis addressed two challenges related to development of molecular techniques for detection of riboviruses (those with RNA genomes) affecting horticultural crops. The first challenge was on detection of the genus *Fabavirus*, which is composed of five viral species: *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), BBWV-2, *Gentian mosaic virus* (GeMV), *Cucurbit mild mosaic virus* (CuMMV) and *Lamium mild mosaic virus* (LMMV). First, the complete genome of the only available LMMV isolate was sequenced since it was the only member in the genus with no sequence data available. Comparison with other fabaviruses confirmed that LMMV is a species and delimited the nucleotide and amino acidic identities between genera, species and viral isolates. Also, a motif of ten nucleotides was found to be repeated in the 5' untranslated regions (5'-UTR) of both genomic RNAs of all fabaviruses and was considered as hallmark for the genus *Fabavirus* which can be used to assign new viruses to this genus. Second, this information was used to design a procedure based on reverse transcription (RT) and PCR with a primer pair conserved for all

members of the genus *Fabavirus* and a multiplex RT-PCR procedure with five primer pairs specific for BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV and LMMV. This procedure can be used to detect simultaneously the five known species of the genus *Fabavirus* and to discover new species within this genus. Third, another procedure was designed based on flow-through hybridization enabling a very rapid analysis of many samples to detect all members of the genus *Fabavirus* with a general probe containing the 10-nt motif and the five known species of this genus with specific probes. This is the first probe conserved for a viral genus and enables discovery of new species of the genus *Fabavirus*. To evaluate specificity, both RT-PCR and hybridization were assayed with genetically divergent isolates of BBWV-1 and BBWV-2 (nucleotide identity ~ 80.0 %) which gave no false negatives. Also *in silico* and *in vitro* analyses showed no false positives with other related viruses from the genera *Comovirus* and *Nepovirus* which, together the genus *Fabavirus*, are part of the subfamily *Comovirinae*.

The other challenge was the detection and identification of the most important riboviruses in tomato crops from the Mediterranean Basin and other subtropical areas: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Pepino mosaic virus* (PepMV), and *Tomato torrado virus* (ToTV). First, the genetic variability and evolution of the world population of ToMV was studied since this was the only of these viruses with no study in this topic. ToMV isolates were classified in three divergent groups (nucleotide identity lower than 90% between groups). One of these groups was composed of genetically similar isolates (identity greater than 98%) which were spread worldwide. This genetic stability makes easier to design detection and disease control procedures, but caution should be taken on the risk of dispersion of divergent ToMV isolates. The information on genetic variability of the seven viruses enabled the development of two multiplex RT-PCR procedures for simultaneous and specific detection of these seven viruses. They were used for a survey in tomato crops in Sicily and revealed that virus prevalence varied according to viruses and geographic areas, as well as that mix infections with several of these viruses are frequent.

The molecular methods for simultaneous detection of multiple viruses developed here enable routine surveys in large areas providing information on

virus epidemiology and are valuable tools for integrated disease management based on prophylactic measures to avoid virus dispersion and breeding for resistant cultivars. The development and implementation of this methodology constitute an added-value to improve quality-management for farmers, seed companies, governmental agencies and international trade regulations, which can contribute to reduce risks and the colossal economical losses (estimated in tens of millions of euros every year) caused by viruses in agriculture worldwide.

RESUM

Un dels problemes als quals s'enfronta l'agricultura són els danys produïts pels virus que causen cada any considerables pèrdues econòmiques en diversos cultius arreu del món. El control de les malalties virals és difícil a causa de la seva complexa i dinàmica epidemiologia, amb casos freqüents d'emergència i ràpida dispersió a escala global, així com per la seva gran capacitat evolutiva que els permet superar diferents estratègies de control, com per exemple el cultiu de varietats resistents obtingudes per millora genètica.

El primer pas per avaluar l'estat sanitari d'un cultiu i poder aplicar un programa de maneig integrat és disposar de mètodes de diagnòstic i detecció dels principals virus que siguin específics, fiables, ràpids i sensibles. Donada la situació dinàmica de les virosis, en la qual contínuament estan apareixent nous virus o variants, és recomanable que els mètodes de diagnòstic puguin desenvolupar-se ràpidament per respondre a la demanda i que siguin flexibles de manera que es pugui ajustar al nivell d'especificitat requerit (no solament per a l'espècie viral sinó també per a categories taxonòmiques superiors, com a gènere i família o inferiors com a soca o grup d'aïllats virals). A aquest respecte, els mètodes moleculars basats en la reacció en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) i la hibridació molecular d'àcids nucleics compleixen aquests criteris. Els mètodes de PCR tenen l'avantatge de ser molt sensibles mentre que els basats en la hibridació permeten analitzar simultàniament un elevat nombre de mostres. Una modalitat, la hibridació de flux d'empremtes vegetals (flow-through hybridization of tissue prints), recentment desenvolupada, suposa una reducció dràstica del temps necessari per a l'anàlisi en evitar el processament de les mostres i accelerar el procés d'hibridació. En el desenvolupament, tant de la PCR com de la hibridació, és necessari conèixer la seqüència nucleotídica d'almenys una porció del genoma del virus que es vol detectar, però si es vol treure el màxim partit, d'una banda, cal estimar la variabilitat genètica entre els diferents aïllats del virus, per a evitar o minimitzar els falsos negatius (ex. reacció negativa amb alguns aïllats genèticament divergents), i d'altra banda, cal considerar la relació genètica del virus objecte en relació a altres virus, per evitar falsos positius (ex. reacció positiva amb aïllats pertanyents a altres virus).

En aquesta tesi doctoral es van abordar dos reptes relacionats amb el desenvolupament de mètodes moleculars de detecció de ribovirus (amb genoma de RNA) que afecten cultius hortícoles. El primer correspon a la detecció del gènere *Fabavirus*, que està compost per cinc espècies virals: virus 1 del pansiment de la fava (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1), virus 2 del pansiment de la fava (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2), virus del mosaic de la genciana (*Gentian mosaic virus*, GeMV) i virus del mosaic suau de les cucurbitàcies (*Curcubit mild mosaic virus*, CuMMV) i virus del mosaic suau de l'ortiga blanca (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV). En primer lloc es va seqüenciar el genoma complet de l'únic aïllat disponible de LMMV, ja que era l'única espècie viral d'aquest gènere de la qual no es disposava cap seqüència nucleotídica. La comparació d'aquesta seqüència amb la del genoma complet dels altres fabavirus va confirmar que LMMV era una espècie viral i va permetre delimitar la identitat nucleotídica i aminoacídica que hi ha entre gèneres, espècies i aïllats virals. Es va trobar diverses repeticions d'un motiu de deu nucleòtids a les zones no traduïbles de l'extrem 5' de tots els membres del gènere *Fabavirus*, fet que es pot considerar com un signe d'identitat i que pot servir per assignar nous virus a aquest gènere viral. En segon lloc, a partir de totes les seqüències nucleotídiques disponibles de tots els virus del gènere *Fabavirus* es va dissenyar una parella d'encebadors conservats per poder detectar per retrotranscripció (reverse transcription, RT) i PCR (RT-PCR) tots els fabavirus en una única reacció. També es van dissenyar cinc parelles d'encebadors, cadascuna específica per a una espècie viral, per poder detectar i identificar qualsevol d'aquests virus en una única reacció mitjançant RT-PCR múltiple (multiplex RT-PCR). La combinació de tots dos procediments de RT-PCR permet detectar i identificar cadascuna de les cinc espècies conegudes del gènere *Fabavirus*, així com descobrir noves espècies dins d'aquest gènere. En tercer lloc, es va dissenyar una sonda molecular corresponent a la regió del genoma que contenia les repeticions del motiu de deu nucleòtids, amb la qual es va poder detectar les cinc espècies del gènere *Fabavirus* mitjançant hibridació molecular de flux. Aquesta és la primera vegada que s'aconsegueix una sonda conservada per a un gènere viral. També es van dissenyar cinc sondes, cadascuna específica per a cadascuna de les cinc espècies conegudes del gènere. De manera que mitjançant hibridació de flux amb les sis sondes es poden identificar BBWV-1, BBWV-2, LMMV, GeMV i CuMMV i descobrir noves espècies dins del gènere *Fabavirus*. Per comprovar l'especificitat de les

tècniques de RT-PCR i hibridació desenvolupades aquí, ambdues es van provar amb diferents aïllats d'una mateixa espècie viral que eren genèticament molt divergents (identitat ~80%) i no es van produir falsos negatius. Així mateix es va constatar *in silico* o *in vitro* que aquestes tècniques no produïen falsos positius al no detectar altres virus relacionats fora del gènere *Fabavirus*, com són aquells que pertanyen als gèneres *Comovirus* i *Nepovirus*, que al costat del gènere *Fabavirus* formen la subfamília *Comovirinae*.

L'altre repte que es va plantejar va ser la detecció i identificació dels set ribovirus més importants en els cultius de tomàquet de l'àrea mediterrània i altres àrees subtropicals: virus del mosaic del cogombre (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus del bronzejat del tomàquet (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), virus del mosaic del tomàquet (*Tomato mosaic virus*, ToMV), virus de la clorosi del tomàquet (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), virus de la clorosi infecciosa del tomàquet (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV), virus del mosaic del cogombre dolç (*Cogombre mosaic virus*, PepMV), i virus del torrat del tomàquet (*Tomato torrado virus*, ToTV). Primer es va caracteritzar la variabilitat genètica de ToMV puix que era l'únic d'aquests virus en la qual no s'havia estudiat aquest atribut. Es va trobar tres grups d'aïllats que tenien entre ells identitats nucleotídiques menors al 90%. Malgrat tot, solament un d'aquests grups s'havia dispersat pel món i es caracteritzava per una gran estabilitat i molt baixa variabilitat genètica (identitats majors del 98%). A partir de l'anàlisi de totes les seqüències disponibles d'aquests set virus es van dissenyar set parelles d'encebadors específics per a cada virus. Es va tenir en compte la variabilitat genètica dins de cadascun dels set virus per evitar o minimitzar els falsos negatius. Mitjançant dos RT-PCR múltiples (una per CMV, ToMV i TICV i l'altra per TSWV, ToCV, ToTV i PepMV) es va poder detectar i identificar cada espècie viral tant en infeccions úniques com a múltiples en mostres de camp de Sicília amb una prevalença variable segons el virus i l'àrea geogràfica.

Els mètodes moleculars de detecció desenvolupats en aquesta tesi permeten dur a terme prospeccions rutinàries en grans àrees de cultiu, recaptant informació epidemiològica molt valuosa per al maneig de malalties a diferents escales geogràfiques, i constitueixen una primera línia de defensa enfront de l'ocurrència de brots de les malalties virals. El desenvolupament i adopció d'aquesta metodologia suposa una aportació que contribuiria a

millorar la gestió de la qualitat per part d'empreses productores i distribuïdores de llavors o propàguls asexuals, i a les agències governamentals reguladores del comerç internacional d'aquests productes amb la finalitat de disminuir els riscos i reduir l'enorme impacte econòmic, valorat en desenes de milions d'euros anuals, en pèrdues directes i indirectes, que implica l'emergència i dispersió dels virus en les economies dels països afectats.

ABREVIATURAS

VIRUS

ArMV: *Arabidopsis mosaic virus*, virus del mosaico del arabis.

BBWV-1: *Broad bean wilt virus 1*, virus 1 del marchitamiento del haba.

BBWV-2: *Broad bean wilt virus 2*, virus 2 del marchitamiento del haba.

BPMV: *Bean pod mottle virus*, virus del moteado de la vaina de la judía.

CMV: *Cucumber mosaic virus*, virus del mosaico del pepino.

CuMMV: *Cucurbit mild mosaic virus*, virus del mosaico suave de las cucurbitáceas.

CPMV: *Cowpea mosaic virus*, del virus del mosaico del caupí.

CPSMV: *Cowpea severe mosaic virus*, virus del mosaico severo del caupí.

GeMV: *Gentian mosaic virus*, virus del mosaico de la genciana.

LMMV: *Lamium mild mosaic virus*, virus del mosaico suave de la hortiga blanca.

PepMV: *Pepino mosaic virus*, virus del mosaico del pepino dulce.

Ribovirus: Virus con genoma de RNA.

SqMV: *Squash mosaic virus*, virus del mosaico de la calabaza.

TBRV: *Tomato black ring virus*, virus del anillado negro del tomate.

TICV: *Tomato infectious chlorosis virus*, virus de la clorosis infecciosa del tomate.

TMV: *Tobacco mosaic virus*, virus del mosaico del tabaco.

ToCV: *Tomato chlorosis virus*, virus de la clorosis del tomate.

ToMV: *Tomato mosaic virus*, virus del mosaico del tomate.

ToRSV: *Tomato ringspot virus*, virus de la mancha anular del tomate.

TSWV: *Tomato spotted wilt virus*, virus del bronceado del tomate.

ToTV: *Tomato torrado virus*, virus del torrado del tomate.

OTRAS

aa: aminoácidos.

ATCC: American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo.

BTH: benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotioico éster S-metilo

CAP: caperuza, un nucleótido modificado de guanina, la 7-metilguanosina trifosfato, que se añade al extremo 5' de la cadena del RNA mensajero

mediante un enlace 5'-fosfato → 5'-fosfato, en lugar del enlace 3',5'-fosfodiéster habitual.

cDNA: complementary DNA, DNA copia o complementario.

CP: coat protein, proteína capsídica.

DNA: desoxyribonucleic acid, ácido desoxiribonucleico.

DEPC: dietil pirocarbonato.

DdNTP: dideoxinucleótido trifosfato.

dNTP: deoxinucleótido trifosfato.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares.

DTT: dithiothreitol, ditiotreitól.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético.

HEL: Helycase, helicasa.

INA: ácido 2,6-dicloro-isonicotínico.

ISR: induced systemic resistance, resistencia sistémica inducida.

LB: Luria-Bertani.

MP: movement protein, proteína del movimiento.

NIAS: National Institute of Agrobiological Sciences of Japan, Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas de Japón.

nt: nucleótidos.

RNA: ribonucleic acid, ácido ribonucleico.

RNA_m: RNA mensajero.

RNA_t: RNA transferente.

RFLP: restriction fragment length polymorphism, polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

RT: reverse transcription, retrotranscripción.

PBS: Phosphate buffered saline, tampón fosfato salino.

PCR: polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

POL: RNA polymerase RNA dependent, polimerasa de RNA dependiente de RNA.

PRO: protease, proteasa.

RdRp: RNA polymerase RNA dependent, polimerasa de RNA dependiente de RNA.

SAR: systemic acquired resistance, resistencia sistémica adquirida.

SDS: sodium dodecyl sulfate, dodecilsulfato sódico.

SSCP: single-stranded conformation polymorphism, polimorfismo de DNA monocatenario.

STE: sodium chloride-Tris-EDTA buffer, tampón cloruro sódico-Tris-EDTA.

TAE: Tris-acetate-EDTA buffer, tampón tris-acetato-EDTA.

UTR: untranslated region, region no traducida.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS VIRUS EN LA AGRICULTURA.

La producción agrícola está constantemente amenazada por plagas y enfermedades de variada etiología (hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides) que causan grandes pérdidas económicas. Dentro de estos microorganismos, los virus tienen un gran impacto negativo ocasionando daños de diversa magnitud en numerosos cultivos agrícolas, en los cuales pueden reducir el rendimiento, vigor, calidad, valor de mercado, o su rentabilidad, limitando algunos cultivos y en ocasiones llega a causar la pérdida total de las cosechas (Hull. 2001). Además de las pérdidas económicas por los daños directos, hay que sumarle el incremento de los costes que suponen las medidas específicas que se tienen que aplicar para intentar proteger los cultivos.

El control de las enfermedades virales es difícil debido a su compleja y dinámica epidemiología, con frecuentes casos de emergencia de nuevas virosis (o reemergencia de virosis ya conocidas) y rápida dispersión, así como por la gran capacidad evolutiva de los virus que les permite superar las medidas de control frente a virosis conocidas.

Para llevar a cabo cualquier estrategia de lucha contra las virosis es importante disponer de técnicas adecuadas de diagnóstico y detección. En primera instancia, éstas se utilizan para estudiar la biología, epidemiología y evolución de los virus para diseñar estrategias de control más efectivas y duraderas; y en segunda instancia, se utilizan en la aplicación de estas estrategias para evaluar su efectividad monitorizando el efecto sobre la acumulación, incidencia, prevalencia y dispersión viral.

El carácter tan dinámico de la problemática de las virosis, con la continua aparición de nuevos virus o cepas virales, obliga al rediseño de las estrategias de control así como al desarrollo continuo de técnicas de diagnóstico o detección específicas.

1.2. EMERGENCIA DE ENFERMEDADES VIRALES.

La emergencia se define como un incremento repentino y drástico de la población de un patógeno, y ocurre por lo general de manera inesperada y con

efectos devastadores (Vurro y col. 2010). Casi la mitad de las enfermedades emergentes están causadas por virus.

Los principales factores que favorecen la emergencia de enfermedades virales son:

A) Transporte a larga distancia de virus o sus insectos vectores a nuevos agroecosistemas a través del comercio de material vegetal a escala global (Anderson y col. 2004). En algunos casos se ha postulado que ciertas enfermedades virales podrían estar asociadas al movimiento de vectores a grandes distancias por corrientes de aire (Thresh y col. 1983).

B) Cambios del área de distribución de plantas hospederas e insectos vectores como consecuencia del calentamiento global (Chakraborty y Newton. 2011).

C) El auge de grandes superficies con monocultivos en la agricultura moderna para una producción intensiva, lo que constituye un agroecosistema muy vulnerable a los patógenos por su baja diversidad genética. Cuando se sustituye la vegetación natural por especies cultivadas, se altera el equilibrio inicial y se crean nuevas interacciones complejas entre los virus, sus nuevos hospederos (una o pocas especies cultivadas, con baja diversidad genética) y sus potenciales vectores (Jones 2009, Prendeville y col. 2012). Actualmente se está llegando a la conclusión de que la agricultura moderna intensiva se enfrenta a una crisis ambiental en la que está comprometida la sostenibilidad de la producción alimentaria y que es necesario cambiar el paradigma agrario e integrar los conceptos agroecológicos (Tilman y col. 2002).

D) La gran capacidad evolutiva de los virus, que les permite adaptarse a nuevos hospederos, desarrollar nuevos factores de virulencia y superar muchas veces las distintas estrategias de control utilizadas (Elena. 2011).

1.3. EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS.

La estructura y composición genética de las poblaciones virales y su evolución tienen efecto en la epidemiología y emergencia de las virosis y hay que tenerlas en cuenta tanto en el diagnóstico como en el manejo de la enfermedad (Acosta-Leal y col. 2011, Elena y col. 2011, Moya y col. 2004).

Los cinco principales mecanismos evolutivos son:

A) La mutación, es la fuente primaria por la cual se genera la variabilidad genética. La mayoría de los virus que infectan plantas tienen el genoma de RNA (ribovirus). Los ribovirus tienen un gran potencial para generar variación genética y evolucionar debido a su rápida replicación, generación de grandes poblaciones, y a una elevada tasa de mutación (10^{-3} a 10^{-5} cambios por posición nucleotídica y ciclo de replicación), causada por la ausencia de actividad de corrección de lectura de las RNA polimerasas (Drake y col. 1998). La rápida evolución de los virus hace que los procesos evolutivos y epidemiológicos ocurran en una misma escala temporal e interaccionen entre sí para condicionar el patrón espacio-temporal de la incidencia y de la estructura genética de las poblaciones virales (Davino y col. 2013, Grenfell y col. 2004, Pybus y col. 2012).

B) La recombinación del genoma y el reordenamiento de segmentos genómicos (pseudorecombinación) entre distintos virus o aislados virales divergentes aumenta la variabilidad genética al generar nuevos genotipos. La recombinación tiene como efecto una aceleración de la adaptación del virus a nuevas situaciones y puede servir para eliminar mutaciones deletéreas en poblaciones finitas al regenerar genomas funcionales (Chare y Holmes. 2006, Nagy. 2008).

C) La selección natural limita la variabilidad genética generada por los anteriores procesos. Es un proceso direccional en el que las variantes, generadas por mutación y recombinación, que tengan una mayor eficacia (fitness), en la acumulación (replicación + movimiento entre células) en el hospedero y en la transmisión entre plantas, aumentarán su frecuencia en la población (selección positiva) mientras aquellas que tengan una menor eficacia disminuirán su frecuencia pudiendo desaparecer (selección negativa). La selección puede estar determinada por las interacciones de los virus con sus hospederos (Schneider y Roossinck. 2001) y con sus vectores (Chare y Holmes. 2004). La selección positiva posibilita la adaptación del virus a nuevos hospederos y la superación de medidas de control como el cultivo de variedades resistentes obtenidas por mejora genética (López y col. 2011).

D) La deriva genética es otro factor limitante de la variabilidad genética. Consiste en cambios estocásticos en las frecuencias de las variantes genéticas en poblaciones finitas como consecuencia del muestreo aleatorio durante la reproducción y la pérdida de algunas variantes por azar. Como el error de

muestreo es mayor en poblaciones pequeñas, la magnitud de la deriva genética es mayor cuando ocurre una reducción drástica del tamaño poblacional (cuello de botella) o por la formación de una nueva población a partir de unos pocos individuos (efecto fundador). Esto puede ocurrir en diferentes procesos del ciclo vital del virus, como el movimiento entre células vegetales (Li y Roossinck. 2004, Sacristan y col. 2003), transmisión entre plantas por vectores (Ali y col. 2006, Sacristan y col. 2011) y competición entre distintos virus que coinfectan una misma planta (Fraile y col. 1997).

E) El flujo genético o migración es la transferencia de variantes genéticas de una población a otra. La migración puede ocurrir entre distintas áreas geográficas, entre plantas y entre distintas partes de la planta. El flujo genético disminuye la diferenciación genética entre poblaciones, lo que conlleva una reducción de la variabilidad genética global, aunque a nivel local la inmigración puede suponer una fuente de variación genética (Slatkin. 1987).

1.4. CONTROL DE LAS VIROSIS.

A diferencia de otros patógenos (ej. bacterias y hongos) y las plagas, no existe ningún tratamiento químico para su control, ni se puede curar una planta una vez infectada. Actualmente, el control de las virosis se basa en prevenir o disminuir su dispersión y en conseguir plantas resistentes o tolerantes a virus. En el primer caso, se emplean métodos como: a) el uso de material vegetal propagativo (semillas y esquejes) libre de virus controlados por programas de certificación, b) cuarentena para evitar la introducción de patógenos exóticos en un área, c) eliminación o prevención de fuentes de infección, d) cambios en las prácticas agronómicas y e) el control de vectores transmisores de virus. En el segundo caso se contemplan estrategias como: a) la protección cruzada mediante preinoculación de las plantas con aislados virales avirulentos o RNA satélites que protejan de una infección con aislados virulentos, b) el tratamiento con agentes antivirales, c) inducción de mecanismos de defensa de la planta, y d) obtención de variedades resistentes o tolerantes por mejora genética o ingeniería genética.

Debido a que el uso de medidas aisladas para el control de las enfermedades virales es poco eficaz, se recomienda llevar a cabo un programa de manejo integrado en el que las medidas se apliquen de forma coordinada, en el marco de una legislación adecuada y con la participación de productores

organizados, y entidades públicas con competencias en sanidad vegetal con capacidad para la gestión fitosanitaria a escala regional y nacional (Green 1991, Lee y col. 1999, Navarro. 1993).

A continuación se describen las diversas estrategias de control de enfermedades virales.

1.4.1. Uso de material propagativo libre de virus y certificación.

La transmisión de virus por semilla tiene una gran impacto ya que estos aparecen en los cultivos en etapas muy tempranas de crecimiento, cuando son más vulnerables y constituyen focos primarios de dispersión (sobre todo si está presente una población de vectores eficientes) por lo que la obtención de semillas sanas, libres de virus, tiene una gran importancia económica (Hull. 2001). La semilla (sexual o cualquier órgano de propagación vegetativa), también es el principal medio de dispersión de virus a grandes distancias a través del comercio de semilla, por lo cual también contribuye con el fenómeno de emergencia viral (Anderson y col. 2004).

La evaluación de la transmisión de virus a través de la semilla sexual o asexual constituye parte de un método de control de calidad fitosanitaria, en el cual se establecen criterios de tolerancia (máximo porcentaje de semillas con virus permitido para su comercialización o cultivo) dependiendo del virus involucrado, así como de sus relaciones con vectores específicos, (No. 2005, Sastry. 2013, Wisler y Duffus. 2000). Para el control de calidad de lotes de semilla y la eliminación de plantas con síntomas antes de la recolección de las semillas se utiliza la inspección visual y técnicas de detección que deben ser muy sensibles dada la importancia de las virosis en este estadio (Maury y col. 1998, Morrison. 1999, Wisler y Duffus. 2000).

En el caso que el virus se sitúe en la cubierta seminal o albúmen y no afecte al embrión, se pueden realizar tratamientos químicos (ej. HCl, Na₃PO₄) para la desinfección externa de la semilla (Córdoba Sellés. 2010, Green y col. 1987, Micó y col. 2012).

En cultivos cuyo medio de propagación comercial es la semilla asexual o material clonal, se debe obtener el material parental libre de virus y establecer un bloque de fundación resguardado de vectores como repositorio, y bloques de propagación comercial que deben evaluarse periódicamente para la presencia de virus (Frost y col. 2013). La obtención de material clonal libre de

virus puede realizarse por selección de plantas sanas y si esto no es posible, se debe recurrir al saneamiento por termoterapia y cultivo *in vitro* de ápices caulinares o tejidos (Kaiser. 1980, Lee y col. 1999, Verchot-Lubicz y col. 2012).

Para que estas medidas tengan efectividad es necesario establecer un programa de certificación. La certificación se lleva a cabo por personal especializado, generalmente adscrito a un organismo oficial, que establece un conjunto de normas legales para medir la calidad del producto y da fe de que los productores han cumplido con las normas y que el producto reúne las características especificadas. En casi todos los países se establecen normas y reglamentos que regulan la producción de las semillas en general, aunque en muchos países en vías de desarrollo no se aplican eficazmente por carecer de las condiciones operacionales y equipamiento apropiado.

1.4.2. Programas de cuarentena.

La cuarentena consiste en un grupo de medidas legales para impedir la introducción y dispersión de enfermedades en regiones donde no se encuentran. Es una de las estrategias de mayor relevancia debido a que fallos en su aplicación puede conducir a fenómenos de emergencia viral con consecuencias devastadoras para la economía de dichas regiones. La efectividad de los sistemas de cuarentena se basa en una fuerte organización institucional, el manejo de información específica sobre los virus que permita controlar las posibles vías de entrada y la disponibilidad de una plataforma tecnológica capaz de detectar los virus sujetos a la regulación bajo cualquier circunstancia.

1.4.3. Eliminación o prevención de fuentes de infección.

La eliminación de hospederos alternos dentro de la plantación y sus alrededores (malas hierbas) contribuye a disminuir la cantidad de inóculo presente en el campo para minimizar su posterior dispersión.

El raleo o erradicación de plantas enfermas del cultivo es justificable cuando la velocidad de dispersión de la enfermedad es alta, cuando la infección ha ocurrido en etapas tempranas de crecimiento del cultivo y la incidencia es baja.

La eliminación de restos de cosechas, la desinfección de utensilios de labranza y de la vestimenta, así como la sistemática higiene de los operadores

en el contexto laboral es esencial para el control de virus con partículas estables que permanecen en el entorno por largos periodos de tiempo.

1.4.4. Prácticas agronómicas

Una de las prácticas agronómicas consiste en cambiar las fechas de cultivo para evadir el ciclo biológico del vector y minimizar las probabilidades de que la población de vectores potenciales transmita el virus de un campo de mayor edad a otro sembrado más recientemente. Esta medida se aconseja específicamente en cultivos anuales en situaciones en las que el virus tiene un eficiente vector aéreo y la enfermedad se disemina con rapidez.

Otra práctica es el aumento de la densidad de siembra para el manejo de virus transmitidos por pulgones, se presume que afecta el comportamiento de vuelo de la población de alados. El umbral de beneficio de esta práctica está condicionado a que el efecto de la competición entre plantas no sea superior al umbral económico de daño del vector y a la susceptibilidad del cultivo a virus de transmisión mecánica ya que una mayor densidad de siembra favorecería su diseminación.

La destrucción de partes aéreas de la planta durante la cosecha se utiliza para evitar la dispersión tardía de virus entre diferentes cultivos (via vectores alados), ya sea para la producción de semilla o cultivo comercial. Esto evita que los restos de cultivo cosechado que permanecen en el campo se conviertan en foco de dispersión a campos vecinos con cultivos susceptibles que se han plantado posteriormente.

El aislamiento geográfico suele ser otra práctica apropiada para reducir la incidencia de vectores en un cultivo con fines de producción de semilla y que es afectado por vectores aéreos. A tal efecto se establecen recomendaciones o normativas estipulando las distancias mínimas de aislamiento entre campos para uso como fuentes de semilla, y los criterios son más laxos cuando el mismo cultivo se destina al consumo.

1.4.5. Control de vectores o del proceso de transmisión.

Es un conjunto de prácticas, para reducir las poblaciones del vector o modificar factores que inciden en la transmisión de los virus. Éstas deben ajustarse a las características del tipo de vector, su forma de dispersión: aéreo o subterráneo, y la duración de la capacidad de transmisión del virus tras ser

adquirido: no persistente (durante unos minutos) y persistente (durante la vida del vector).

La aplicación de insecticidas resulta ineficaz para controlar la dispersión de virus por vectores aéreos (ej. pulgones) con transmisión no persistente, aunque el uso periódico de aceites minerales ha tenido un cierto éxito en la inhibición de la transmisión (Ferreles. 2000). Los virus de transmisión persistente se pueden controlar con insecticidas sistémicos o de rápida acción letal, pero estos tienen grandes desventajas por su efecto negativo e indiscriminado sobre el ecosistema (fauna benéfica) y la salud humana, así como por el surgimiento a largo plazo de poblaciones de vectores resistentes a los insecticidas.

Una estrategia con impacto ambiental reducido es el uso de barreras vivas formadas por plantas tratadas con insecticidas, aceites minerales o plantas inmunes a virus de transmisión no persistente, de modo que los vectores mueren o descargan el virus en esas plantas y no son capaces de transmitirlos a los cultivos (Ferreles. 2000).

Las trampas adhesivas de colores atractivos son un medio efectivo para reducir la incidencia de virosis transmitidas por pulgones, trips, moscas blancas y otros vectores aéreos. Las trampas permiten evaluar la fluctuación poblacional en cualquier ambiente y reducen la población efectiva cuando se colocan en cultivos protegidos. El umbral poblacional como vectores es mucho más bajo que su correspondiente umbral como plaga directa (Satapathy. 1998), así que el análisis de esta información es útil para decidir la puesta en práctica de medidas complementarias de manejo cuando ocurren vectores eficientes.

El control biológico con depredadores o parásitos se ha utilizado fundamentalmente para el control de insectos considerados como plagas, pero su aplicación al control de insectos vectores no ha sido todavía muy estudiada.

Para los virus que se transmiten por nematodos existen diversas estrategias de control (Verchot-Lubicz y col. 2012): Cuarentena para prevenir el ingreso de nematodos vectores en áreas donde no están presentes; certificación de plantas; esterilización química o térmica del suelo o del sustrato, aunque algunos productos han sido prohibidos en muchos países

debido a su toxicidad; prácticas agronómicas como la rotación de cultivos con especies no hospederas del vector, la eliminación de malezas hospederas, la siembra de especies de plantas con efecto antagonista sobre los nematodos, y el uso de variedades resistentes a nematodos.

Para los virus transmitidos por hongos y otros microorganismos que son parásitos intracelulares obligados y producen zoosporangios de resistencia no es aconsejable el uso de productos químicos (ej. fungicidas), ya que es poco efectivo y produce un impacto ambiental negativo. Para su control se emplean: cuarentena y certificación de plantas y semillas, prácticas agronómicas basadas en el cultivo de especies no hospederas durante varios años y volver al cultivo anterior cuando haya disminuido la viabilidad de las estructuras de resistencia de estos microorganismos vectores, y el cultivo de variedades resistentes a hongos obtenidas por mejora genética. En casos donde no hay disponibilidad de semilla certificada y el hongo vector se ubica en el exterior de la semilla, se debe desinfectar por tratamiento térmico o químico (Micó y col. 2012).

1.4.6. Protección cruzada.

Ésta consiste en la inoculación de un aislado viral avirulento o poco virulento para proteger contra la infección posterior de aislados virulentos del mismo virus. Se ha postulado que es necesario una cierta similitud de secuencia entre el aislado protector y aquel que se desea proteger y que el mecanismo se basa en la inducción del silenciamiento génico por el aislado avirulento, que es un sistema de defensa de la planta basado en el reconocimiento y degradación del RNA viral (Voinnet. 2005, Wang y Metzloff. 2005).

La protección cruzada puede conllevar algunos problemas tales como que los aislados protectores sean virulentos en otras variedades, que se produzca emergencia de nuevos aislados virales por recombinación, o que la protección falle por interacciones sinérgicas con otros virus o patógenos. Para manejar apropiadamente esta estrategia es necesario disponer de métodos de detección y diferenciación molecular específicos que permitan monitorear la población viral dentro de las plantas.

1.4.7. Utilización de satélites.

Los satélites son entidades subvirales de RNA que carecen de los genes requeridos para la síntesis de proteínas implicadas en su replicación, para lo cual dependen de manera específica de un virus, denominado virus auxiliar. Si el RNA depende del virus auxiliar para la síntesis de la cápsida se denomina RNA satélite y en el caso de que el RNA codifique para la síntesis de su propia cápsida se denomina virus satélite. La protección mediada por satélites se basa en su capacidad para interferir con la replicación del virus o de afectar la expresión de síntomas. Es una interacción compleja y muy específica que depende de la especie hospedera, del aislado viral y de la secuencia nucleotídica del satélite (Hull. 2001).

1.4.8. Aplicación de químicos antivirales.

Se basa en la aplicación de compuestos análogos o precursores de purinas y pirimidinas que inhiben la replicación y expresión del virus. Sin embargo, no se ha encontrado una aplicación satisfactoria en cultivos a escala comercial, ya que estos compuestos afectan el metabolismo del hospedero y suponen un riesgo de bioseguridad, aunque se ha usado en ocasiones en programas de saneamiento de material vegetal para mejorar la eficiencia de la producción de ápices meristemáticos libres de virus.

1.4.9. Inducción de mecanismos de defensa de la planta.

Se basan en la resistencia sistémica adquirida (systemic acquired resistance, SAR) y la resistencia sistémica inducida (induced systemic resistance, ISR). La SAR puede ser activada mediante la inoculación de microbios avirulentos o el uso de productos químicos tales como el ácido salicílico, el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) o el benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotioico éster S-metilo (BTH) (Sticher y col. 1997), que da como resultado la resistencia (o tolerancia) contra una amplia gama de patógenos y parásitos tales como hongos, bacterias, nematodos, virus, plantas parasíticas, e incluso insectos (Vallad y Goodman. 2004, Van Loon y col. 1998). La ISR se induce mediante la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y actúa también contra un amplio espectro de organismos, pero solamente es efectiva en ciertas especies y genotipos de plantas (Van Wees y col. 1997, Yan y col. 2002). Su aplicación en la agricultura no está extendida pero hay

grandes expectativas debido a su bajo impacto ambiental (Vallad y Goodman. 2004).

1.4.10. Obtención de plantas resistentes por mejora genética.

La mejora genética consiste en incorporar genes que confieran una resistencia específica contra ciertos virus o genotipos virales en variedades vegetales de interés agronómico, procedentes de otras variedades o especies relacionadas, mediante hibridación, retrocruzamientos y selección. Los genes de resistencia incorporados pueden seguir el patrón de segregación mendeliano (resistencia oligogénica), o del tipo cuantitativo, que es determinado por la existencia de numerosos genes de efecto aditivo e independiente (Fernández y col. 2008).

Esta es la estrategia de control más extendida y va asociada a una actividad económica muy importante ya que existen numerosas empresas que producen y comercializan semillas de híbridos o variedades de diferentes cultivos. Sin embargo, uno de los efectos adversos de esta metodología es la pérdida de diversidad genética en las especies de interés, que dificulta cada vez mas el hallazgo de genes de resistencia en el patrimonio genético natural de la especie, y que limita por tanto, la sostenibilidad del uso de esta estrategia a menos que se reestablezca o resguarde la diversidad genética en colecciones de germoplasma.

1.4.11. Obtención de plantas resistentes por transformación genética.

Consiste en la producción de plantas transgénicas mediante la introducción de DNA foráneo en el genoma de la planta, mediante ingeniería genética para conferirle una resistencia específica contra ciertos virus o genotipos virales.

Se han desarrollado varias modalidades:

A) Introducción de un gen de resistencia de otra especie vegetal. Tiene la ventaja de superar barreras de incompatibilidad genética entre las especies donadora y receptora, y ahorra mucho tiempo con respecto a la mejora genética clásica.

B) La expresión de anticuerpos *in planta* (plantibodies) contra los virus. Ha permitido la obtención de plantas resistentes a patógenos. Esta tecnología se presenta como una alternativa biotecnológica para la mejora genética de plantas, al incorporar resistencia a patógenos frente a los cuales no existe en

la naturaleza germoplasma con genes de resistencia. Se prevee que los anticuerpos producidos por plantas se convertirán en una de las estrategias predominantes para la protección de cultivos frente a patógenos a largo plazo (Liao y col. 2006). Sin embargo, no se han llevado a la práctica comercial debido a riesgos de impacto negativo para el ambiente por efectos no previstos en los estudios de seguridad para el ecosistema donde se introducirían (Prins y col. 2008).

C) Inducción de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP, ribosome-inactivating proteins). Son proteínas aisladas de plantas venenosas (*Phytolacca americana*), también denominadas PAP (acrónimo de Pokeweed Antiviral Protein), que inhiben la traducción de proteínas mediante la inactivación de los ribosomas. Estas proteínas también presentan una potente actividad antiviral contra muchos virus de animales y plantas, aunque son intrínsecamente tóxicas. Se han obtenido mutantes de estas proteínas que mantienen la actividad antiviral y han perdido fitotoxicidad, por lo que esta mejora ampliaría las aplicaciones de las proteínas inactivadoras de ribosomas en la agricultura y medicina (Tumer y col. 1997). Sin embargo, las reservas acerca del uso de organismos transgénicos para la producción de alimentos permanece como la principal limitación para su uso comercial en la agricultura (Fuchs y Gonsalves. 2007).

D) Resistencia derivada del patógeno (Baulcombe. 1996). Esta consiste en la introducción en la especie a mejorar, de partes del genoma viral: para producir la sobreexpresión de genes virales que codifican la proteína de la cápsida viral o la replicasa viral con el propósito de bloquear un paso específico del ciclo viral (Goldbach y col. 2003, Morrioni y col. 2008). Otra modalidad es introducir construcciones que produzcan RNA con secuencias virales de cadena negativa o doble cadena para desencadenar el mecanismo de defensa de la planta basado en el silenciamiento génico (Qu y col. 2007, Wang y Waterhouse. 2002).

Actualmente existe presión social en contra del uso de plantas transgénicas por sus posibles efectos negativos en los ecosistemas y en la salud humana (alergias). La evaluación de varios factores de riesgo como la ocurrencia de heteroencapsidación, recombinación, flujo genético, sinergismo y alergenicidad en distintas especies de plantas transgénicas liberadas en campo con registros de más de 20 años, ha mostrado en la práctica que no

suponen una amenaza significativa, pese a haberse constatado la ocurrencia de varios de estos eventos que implican riesgo probable de daño al ambiente (Fuchs y Gonsalves. 2007).

La heteroencapsidación (encapsidación del genoma de un virus por la proteína, transgénica o no, de la cápsida de otro virus), podría conferir transmisibilidad por vectores, o patogenicidad a nuevos hospedantes, a virus que previamente no presentaban estas características, conduciendo a la posible ocurrencia de nuevas epidemias (Callaway y col. 2001a).

La recombinación (intercambio de material genético entre dos moléculas distintas de RNA durante la replicación viral) puede ocurrir entre transcritos de un transgen viral y el genoma de un virus invasor durante la replicación en una planta transgénica. Esto podría conferir a la progenie recombinante (bajo condiciones de elevada presión de selección), propiedades biológicas que podrían afectar negativamente al ambiente, tales como cambios en la transmisión por vectores o un aumento en la patogenicidad. El impacto de la recombinación entre transgenes y virus es aparentemente escaso, a pesar de la diversidad de sistemas biológicos en que se ha empleado la resistencia derivada del patógeno usando el gen de la proteína del cápside, y del tiempo transcurrido desde sus primeras aplicaciones (Fuchs y Gonsalves. 2007).

El flujo genético de transgenes de plantas cultivadas a plantas silvestres relacionadas, ocurre mediante la polinización, así, la progenie de las plantas silvestres puede expresar el transgen, de tal forma que la resistencia al virus le puede conferir ventajas selectivas a las plantas silvestres. Los estudios de persistencia de transgenes en poblaciones silvestres transformadas, aportan evidencia que sugiere que los transgenes no confieren ventajas selectivas superiores a las suministradas por la obtención de plantas mejoradas por vías convencionales en variados escenarios (Fuchs y Gonsalves. 2007, Stewart y col. 2003).

El sinergismo se refiere a la interacción del producto de un transgen con un virus silvestre que puede resultar en un aumento en la severidad de síntomas, o aumento en la acumulación viral que el virus silvestre no podría alcanzar en ausencia del transgen. En una planta transgénica, la expresión de genes virales puede proteger contra la infección de un virus relacionado al transgen, pero también puede aumentar la susceptibilidad a un virus sinérgico no relacionado y así afectar la tasa de dispersión de la

enfermedad. El sinergismo puede ser consecuencia de la inhibición de la respuesta de silenciamiento génico postranscripcional de la planta frente a la infección viral (Fuchs y Gonsalves. 2007).

La alergenicidad e inocuidad se refiere a las potenciales propiedades alergénicas en humanos, de proteínas codificadas por secuencias virales que son expresadas en plantas transgénicas (Fuchs y Gonsalves. 2007). Para evaluar este potencial se emplean criterios tales como la existencia de una mínima relación de secuencias aminoacídicas de 35%, y un trozo continuo de secuencias de ocho aminoácidos idénticos a alérgenos conocidos (Hileman y col. 2002). Otros criterios se refieren en sentido práctico, al hecho de que las proteínas transgénicas son idénticas a las de virus silvestres que infectan cultivos que son consumidos en grandes cantidades de manera común junto con los alimentos infectados y no se registran casos de alergias derivados de este consumo (Fuchs y Gonsalves. 2007).

La tecnología de mayor aceptación es la basada en la inducción del silenciamiento génico ya que no implica la producción de genes o proteínas funcionales, ni de RNA transgénico que podría recombinar (Goldbach y col. 2003).

1.5. DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE VIRUS.

La aplicación de métodos de detección y diagnóstico específicos y sensibles es imprescindible para el control de las virosis en todas sus fases, ya sea en cribado de bancos de germoplasma, en programas de mejora genética para introducción de resistencia en nuevos cultivares (de Castro y col. 2007), en muestreos de rutina para la evaluación del estado sanitario del cultivo y vigilancia epidemiológica, en control de calidad en programas de certificación, o en vigilancia cuarentenaria para la regulación del movimiento de material vegetal en el comercio entre países (López y col. 2003, Olmos y col. 2007a). Por estas razones, la disponibilidad de métodos de detección y diagnóstico es crucial para darle factibilidad a toda la plataforma de control calidad fitosanitaria en el cultivo.

Los principales métodos de diagnóstico o detección son:

1.5.1. Caracterización biológica.

Es una de las primeras fases que se llevan a cabo en el estudio de un virus recientemente descubierto, y es importante para establecer su

importancia relativa como patógeno. En los inicios de la virología como disciplina era el único método de diagnóstico.

La observación de ciertos síntomas directamente en plantas en campo (amarilleo, mosaico, manchas cloróticas, manchas en anillo, necrosis, deformaciones foliares, raquitismo, marchitez, etc.) proporciona la primera información orientadora sobre la identidad del virus. Sin embargo, éstos no suelen ser suficientemente específicos ya que por una parte distintos virus u otros patógenos, e incluso factores abióticos, pueden causar síntomas similares, y por otra parte distintos aislados de una especie viral pueden inducir distinta sintomatología.

Una identificación más precisa requiere bioensayos:

A) Indización con plantas indicadoras. Para una caracterización precisa de las propiedades biológicas de un virus, se realiza la inoculación y observación de los síntomas en una batería de especies de plantas indicadoras cultivadas en invernadero bajo condiciones controladas (Luis-Arteaga. 1989), que pueden mostrar síntomas característicos, ausencia de síntomas o inmunidad y que son consistentes entre distintos ensayos bajo las mismas condiciones ambientales. La batería de plantas inoculadas se pueden ampliar para caracterizar la gama de hospederos; aspecto que es importante para estudios epidemiológicos. Sin embargo, este método es costoso ya que requiere espacio e instalaciones en invernadero y personal con experiencia dedicado al mantenimiento y observación de las plantas. La duración de estos ensayos es variable ya que para la expresión de síntomas, se requieren desde algunos días, hasta alrededor de un año, dependiendo del patógeno y la especie de planta que se evalúa. Aún así, es un paso necesario en el caso de nuevas virosis, para demostrar que se trata de un agente infeccioso, aplicando una variación de los postulados de Koch, puesto que los virus, al ser parásitos intracelulares obligados, no se pueden cultivar en medios artificiales y las plantas indicadoras se convierten en el medio de aislamiento y cultivo.

B) Inoculación con vectores. Las relaciones de los virus con vectores se caracterizan por diferentes niveles de especificidad. Esto quiere decir que en algunos casos, la relación de transmisión por un vector es suficiente para orientar en la identificación del virus o ubicarlo taxonómicamente. La mayoría de los virus de plantas se transmiten por vectores, y una buena proporción de ellos por una sola especie de vector (Power y Flecker 2008). Los vectores

pueden ser artrópodos, mayoritariamente insectos, nemátodos y hongos (o protozoarios). Los ensayos de transmisión por vectores también aportan datos tales como longevidad del virus en restos de tejido del vector (p. ej. para el caso de un vector fúngico), eficiencia (tasa de transmisión individual) y tipo de transmisión, vale decir: (no persistente, semi-persistente y persistente), el tiempo de adquisición (tiempo de alimentación hasta que el vector adquiere el virus), tiempo de latencia (incubación), es decir, el tiempo que transcurre a continuación hasta que los virus pueden ser transmitidos, y tiempo de retención, o el tiempo que el vector es capaz de transmitir el virus. Esta información es útil para estudiar la epidemiología de la enfermedad, y junto con información recopilada de otros ensayos e información de campo específica del cultivo permitiría estructurar modelos de predicción de desarrollo de la enfermedad o estrategias de control integrado (López-Moya y Abella. 2000).

C) Transmisión por semilla. Alrededor del 15% de los virus de plantas conocidos se transmiten por semilla en al menos una de sus especies hospederas. Como se ha indicado anteriormente, la identificación de virus transmitidos por semilla tiene una gran importancia en los programas de certificación y cuarentena.

1.5.2. Observación al microscopio.

Existen dos modalidades:

A) La citopatología, que consiste en observar mediante microscopía (óptica o electrónica) alteraciones subcelulares a causa de la infección viral (lisis de membranas, desorganización de organelos, inclusiones cristalinas formadas por agregados de partículas virales o proteínas virales no estructurales, entre otras). Las alteraciones inducidas pueden ser características de ciertos grupos virales y con ello se puede orientar el diagnóstico (Edwardson y Christie. 1978).

B) La observación de las partículas virales (viriones) mediante el microscopio electrónico de transmisión. La morfología y dimensiones de los viriones o inclusiones inducidas por virus pueden permitir asignar el virus a un grupo taxonómico.

Ambos métodos son lentos y poco específicos (no permite identificar especies virales), se requiere personal experimentado, y en el caso de la microscopía electrónica, el equipo es muy costoso.

1.5.3. Análisis serológico.

Actualmente, la técnica serológica ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es la más utilizada para el diagnóstico rutinario de virus (Hu y col. 1995, Martín y col. 2004) ya que su diseño permite el procesamiento de muchas muestras simultáneamente. Esta técnica se basa en la inmovilización de la proteína viral y su posterior detección mediante anticuerpos conjugados con una enzima, que hidroliza un sustrato dando lugar a un producto coloreado cuya acumulación es proporcional a la de la proteína viral.

La técnica de ELISA ha dado lugar a una gran cantidad de variantes que han sido desarrolladas para mejorar la sensibilidad o facilitar su aplicación. Si el sustrato de la enzima rinde un producto soluble (como inicialmente fue desarrollada), la reacción se lleva a cabo en una placa de microtitulación y puede ser detectada visualmente o mediante la lectura de la placa con un espectrofotómetro, permitirá la evaluación semi-cuantitativa del virus. En caso de que la hidrólisis enzimática rinda un producto insoluble, la reacción se lleve a cabo sobre una membrana y la detección sea cromogénica, se observará una mancha coloreada del sustrato que precipita sobre el punto de aplicación de la muestra, apreciable a simple vista o con lupa. Esta variante permite analizar improntas de un corte de tejido vegetal evitando el procesamiento de las muestras y ahorrando costes y tiempo (Garnsey y col. 1993, Lin y col. 1990, Martín y col. 2002).

La técnica de ELISA puede emplear anticuerpos policlonales o monoclonales. Los primeros tienen un mayor espectro de detección porque constituyen una población de anticuerpos que reaccionan contra todos los epítomos de la proteína viral, aunque también pueden reaccionar inespecíficamente contra proteínas de la planta. Los anticuerpos policlonales presentan variabilidad según el animal donador, lo cual representa una desventaja relativa para uniformizar criterios de detección. Los anticuerpos monoclonales representan un linaje seleccionado de anticuerpos que reaccionan contra un solo epítomo de la proteína (por lo tanto no reaccionan contra las proteínas de la planta) y son cultivados al hibridar un linfocito B con una célula tumoral. El producto de esta fusión (hibridoma) crece

indefinidamente y produce un solo tipo de anticuerpos, por lo cual, es una fuente inagotable y uniforme de anticuerpos altamente específicos (Harlow y col. 1988, Hull. 2001). El grado de especificidad puede variar dependiendo de si el epítipo se encuentra presente en distintas especies virales, en todos los aislados de un virus o en sólo algunos aislados (Cambra y col. 1990). Si se requiere un amplio espectro de detección, se pueden usar mezclas de anticuerpos monoclonales para abarcan la diversidad genética del virus para el que se han producido.

1.5.4. Análisis de RNA bicatenario.

Uno de los primeros métodos de detección molecular empleado es la purificación y análisis de RNA bicatenario (dsRNA: double-stranded RNA), que es un intermediario en el ciclo de replicación de los ribovirus. El método se basa en la afinidad de la celulosa por los ácidos nucleicos en presencia de tampón a concentraciones específicas de etanol, en el cual el dsRNA se purifica mediante cromatografía en celulosa no iónica en presencia de etanol al 16%. El extracto purificado se analiza por electroforesis (Dodds y Bar-Joseph. 1983, Guerri y col. 1991). El número y tamaño de los segmentos genómicos observados en el perfil electroforético da una idea aproximada del grupo viral presente en la muestra infectada. Su mayor inconveniente es su poca especificidad, pero puede ser valiosa en el caso de nuevos virus para los cuales no hayan desarrollado otros métodos de diagnóstico. Por otra parte, los extractos purificados de dsRNA pueden utilizarse para determinar la secuencia nucleotídica del genoma viral a partir de una una genoteca aleatoria o las técnicas de secuenciación masiva (Véase el apartado 1.5.9, en la página 25).

1.5.5. Hibridación molecular.

Esta técnica molecular se basa en la capacidad de apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de RNA, DNA o RNA – DNA que tengan secuencias complementarias formando una estructura de doble cadena más estable. La síntesis de una molécula de DNA o RNA monocatenario complementaria al genoma del virus (sonda) marcada con isótopos radioactivos (como el ^{32}P) o con marcajes no-radioactivos (como la digoxigenina o fluoróforos) y su posterior hibridación con ácidos nucleicos (dot-blot) de la planta fijados en un soporte sólido (generalmente una membrana) permite detectar la presencia del virus (Dietzgen y col. 1994,

Galipienso y col. 2004, Harper y Creamer. 1995, James y col. 1999, Liu y col. 2007, Más y col. 1993). Una modalidad consiste en fijar improntas de cortes transversales de tejido vegetal, que evitan el procesamiento de las muestras y suponen un ahorro de tiempo y dinero (Narváez y col. 2000, Rubio y col. 2003).

Este método tiene la ventaja de ser rápido, sencillo, semicuantitativo y con capacidad de analizar simultáneamente un gran número de muestras, presentando generalmente una mayor sensibilidad que la técnica ELISA. Otras ventajas adicionales con respecto a las técnicas serológicas son: A) su versatilidad, ya que se pueden obtener diferentes grados de especificidad modificando las condiciones de hibridación o bien sintetizando las sondas a partir de zonas distintas del genoma con diferentes grados de diversidad genética; y B) se puede preparar una sonda en muy corto tiempo, con alta reproducibilidad partiendo de material almacenado, frente a los meses que tradicionalmente demora producir anticuerpos específicos, además de la diferencia entre lotes debido a la variabilidad en la respuesta inmunitaria individual en animales de laboratorio.

Como los cultivos presentan con frecuencia infecciones mixtas en el campo (Gallitelli y col. 1995, Rodríguez y col. 2004), interesa la detección simultánea de distintos virus (James y col. 2006). Para ello se han utilizado diferentes estrategias:

A) Mezclas de sondas para detectar varios virus en tomate (Saldarelli y col. 1996), ornamentales (Sánchez-Navarro y col. 1999), frutales de hueso (Saade y col. 2000) y cultivos de geranio (Ivars y col. 2004).

B) Polisondas sintéticas. Se basa en la clonación en tándem de secuencias parciales de ácidos nucleicos de diferentes virus, para permitir la síntesis de una sola sonda que detecta tantos virus como fragmentos han sido incorporados en el tándem. Se han diseñado polisondas marcadas con digoxigenina para detectar diferentes virus en tomate (Aparicio y col. 2009, Herranz y col. 2005).

C) Chips de DNA (micromatrices y macromatrices). El diseño típico de una micromatriz consiste en fragmentos de cDNA correspondientes a distintos virus, fijados a un soporte sólido y organizados espacialmente mediante coordenadas asignadas (sondas de captura), a las cuales se hibrida las

muestras (extractos de material vegetal) marcadas con un fluoróforo. La identidad de las muestras se determina a partir de la fluorescencia detectada sobre el soporte y de sus coordenadas en la matriz (Boonham y col. 2007b). Los soportes sólidos posibilitan que las sondas de captura se puedan aplicar en muy pequeños volúmenes, permitiendo el cribado de muchas potenciales dianas diferentes de manera simultánea, (Schena y Davis. 1999). Se han desarrollado micromatrices de cDNA para la detección de siete virus en patata (Boonham y col. 2003, Bystricka y col. 2003, Bystricka y col. 2005) y para la detección simultánea de 37 virus pertenecientes a 13 familias y seis Pospiviroides (Tiberini y Barba. 2012). A pesar de su potencial, algunas de las desventajas de esta tecnología para su aplicación en análisis rutinarios en patología vegetal, consisten en la dificultad de adaptarla para el cribado de gran cantidad de muestras de manera simultánea manteniendo amplio el espectro de virus a detectar, los costes para la creación de las micromatrices y la adquisición de los equipos para el análisis e interpretación de los resultados aún son elevados (Tiberini y Barba. 2012), y aunque esta técnica detecta ácidos nucleicos, su sensibilidad es inferior a la de la técnica de hibridación y la de PCR, si bien, es comparable a la de la técnica de ELISA (Boonham y col. 2007a).

1.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), es una técnica molecular que permite amplificar *in vitro* de manera exponencial el número de moléculas de un determinado fragmento de DNA de modo selectivo en unas pocas horas mediante el uso de pequeñas secuencias flanqueantes de 15 a 40 nt (iniciadores) y el uso de una DNA polimerasa termoestable (Hull 2001, Saiki y col. 1988). Una modalidad que permite detectar virus con genoma de RNA es la retrotranscripción del RNA (RT) a cDNA y posterior PCR (RT-PCR) (Kawasaki 1990, Veres y col. 1987). La mayor ventaja de la PCR o RT-PCR es su gran sensibilidad, aunque esto también la hace propensa a la obtención de falsos positivos debidos a uniones inespecíficas de los iniciadores o a la contaminación del DNA. En algunos casos, también pueden producirse falsos negativos debido a la presencia de inhibidores en los extractos vegetales (Singh y col. 2002). Esta técnica presenta una gran versatilidad ya que permite el control del grado de especificidad mediante el diseño de iniciadores correspondientes a zonas

genómicas ya sean más o menos conservadas, o variables. Los productos de PCR o RT-PCR se detectan generalmente por electroforesis, aunque en ocasiones se ha utilizado hibridación molecular.

Se han desarrollado diversas modalidades de PCR:

A) PCR anidada, que permite una mayor sensibilidad y especificidad al realizar una segunda reacción con iniciadores internos, contenidos en el fragmento amplificado inicialmente (Helguera y col. 2001, Morris y col. 2001).

B) La PCR o RT-PCR múltiple (multiplex) permite detectar simultáneamente varios virus o aislados de un virus en una misma reacción con distintos pares de iniciadores específicos para cada virus (Bariana y col. 1994, Dovas y col. 2002).

C) PCR-cooperacional (Co-PCR), que se basa en la amplificación simultánea de dos diferentes fragmentos de la misma molécula, uno de ellos conteniendo al otro, y el uso de cuatro cebadores, un par externo al otro; esta reacción genera cuatro amplicones. Debido a la acción cooperadora de los cebadores, su sensibilidad es superior a la de la RT-PCR convencional y comparable con la de la RT-PCR anidada (Olmos y col. 2002).

D) PCR cuantitativa a tiempo real, es la técnica de detección más sensible y de cuantificación más precisa. Se basa en la detección de fluorescencia emitida por un fluoroforo incorporado en las moléculas amplificadas (ej. SYBR green), o por una sonda, que por lo general incorpora un fluorocromo y un extinguidor (quencher). La sonda hibrida con la molécula diana, siendo degradada posteriormente durante la amplificación, y la fluorescencia emitida por el fluorocromo es medida sin la interferencia del quencher. En ambos casos, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando posibilitando su cuantificación (Mumford y col. 2006, Phillips 2004). La automatización del proceso ha facilitado su uso progresivo en la detección cuantitativa de virus en plantas con elevada sensibilidad, en el marco de programas de certificación de plantas para establecer su estado fitosanitario, o en vigilancia con fines de cuarentena. El uso de SYBR green presenta la desventaja de que es inespecífico y puede unirse a cualquier molécula de DNA contaminante o productos de amplificación inespecífica, aumentando la probabilidad de producir falsos positivos. El empleo de sondas Taqman hace la técnica mucho más específica,

pero pueden ocurrir falsos negativos si no se ha tenido en cuenta la diversidad genética del virus (Olmos y col. 2007b). Su principal ventaja es su elevada sensibilidad (puede detectar hasta 100 moléculas de RNA viral por 10 ng de RNA total), y sus desventajas son el elevado coste del equipo y su gran susceptibilidad a falsos positivos por contaminaciones debido a su extrema sensibilidad.

1.5.7. Amplificación isotérmica.

Existen dos modalidades:

A) Amplificación de ácidos nucleicos basada en secuencia (NASBA: Nucleic acid sequence-based amplification). Es un método en el que no se requiere la desnaturalización por calor e implica el uso de tres enzimas (retrotranscriptasa, RNasa H y T7 RNA polimerasa) y un par de iniciadores específicos, uno de los cuales, incorpora la secuencia del promotor T7. El proceso se inicia con una retrotranscripción cuyo producto es un híbrido DNA:RNA, en el cual la cadena de RNA se degrada por la RNasa H. El segundo cebador anilla con la cadena de cDNA y se produce DNA bicatenario. Posteriormente, la T7 RNA polimerasa reconoce la secuencia del promotor e inicia la transcripción de la cadena de RNA diana. Debido a los requerimientos de las enzimas involucradas, la reacción transcurre a una temperatura constante optimizada de aproximadamente 40 °C, y en 90-120 minutos puede alcanzar niveles de amplificación del orden de 10^9 , (Compton 1991, Malek y col. 1994). Los productos de amplificación se suelen detectar mediante hibridación molecular. Entre sus ventajas destacan su gran sensibilidad, comparable a la de la PCR cuantitativa (Olmos y col. 2007c) y que requiere un equipamiento barato (un incubador) en lugar de un termociclador. Sin embargo se ha señalado que la baja temperatura de reacción puede afectar su especificidad (Notomi y col. 2000).

B) Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP: Loop-mediated isothermal amplification). Es un método que amplifica DNA con alta especificidad, eficiencia y rapidez, pudiendo alcanzar niveles de amplificación del orden de 10^9 en aproximadamente una hora (Notomi y col. 2000). Emplea DNA polimerasa y un juego de cuatro iniciadores con un diseño complejo que reconocen seis secuencias distintas en el DNA diana: dos iniciadores internos, que contienen secuencias de las cadenas sentido y antisentido del DNA, uno a cada flanco de la molécula diana. Dos iniciadores externos que al anillar y

amplificar una nueva cadena desplazan la cadena amplificada inicialmente. Los bucles se forman a partir del fragmento externo de cada iniciador interno, ya que la secuencia es complementaria a una porción interna y cercana a la cadena que se está elongando. La reacción se ha adaptado también para RNA (RT-LAMP) (Fukuta y col. 2003). Los productos de amplificación se pueden detectar por electroforesis o por hibridación. Su principal dificultad es el complicado diseño de los cuatro cebadores para que produzca el resultado esperado, pero su alta sensibilidad, especificidad, y el hecho de que puede realizarse en incubadores que son accesibles para cualquier laboratorio, lo hacen una alternativa apreciable cuando se dispone de personal preparado.

1.5.8. Diferenciación de variantes genéticas.

Algunas de las técnicas descritas previamente pueden usarse con distintos grados de especificidad para distintas categorías taxonómicas: familia, género, especie y cepas (Arteaga y Paz. 1989, Bystricka y col. 2005). Sin embargo, existen técnicas más adecuadas para la diferenciación de aislados virales o genotipos, que pueden ser necesarias para la caracterización biológica y/o molecular, estudios de epidemiología y evolución molecular y para tomar medidas apropiadas de control, dado que diferentes aislados virales pueden tener características y comportamientos distintos.

Las técnicas más comunes son:

A) Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Se basa en la capacidad de las endonucleasas de restricción de reconocer secuencias específicas de unos pocos nucleótidos en el DNA bicatenario y producir cortes en los lugares en que estén esas secuencias. Para este análisis, se amplifica por PCR una zona genómica del virus y se digiere el DNA amplificado con enzimas de restricción capaces de generar fragmentos de diferente tamaño que son separados por electroforesis. Cada variante de secuencia da lugar a un patrón de bandas único. Este método es altamente específico, sensible y sencillo y permite diferenciar variantes de secuencia dentro de un mismo aislado viral (Font y col. 2007).

B) Análisis del polimorfismo de conformación de DNA monocatenario (SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism). Consiste en la electroforesis en condiciones nativas de un producto de PCR desnaturalizado,

de manera que cada una de las dos hebras del DNA adquiere una conformación (estructura autocomplementaria) que dependerá de su secuencia nucleotídica, y como consecuencia afectará a su migración en el gel. De esta manera productos de PCR con distinta secuencia nucleotídica presentarán un patrón de electroforesis distinto (Goszczyński y Jooste. 2002, Rubio y col. 1996, Xu y col. 2006). Las principales ventajas de esta técnica son: su gran especificidad, ya que puede detectar diferencias de uno a tres nt en fragmentos de unos 500 nt, así como su idoneidad para identificar un gran número de variantes dentro de un aislado. Por ello es una técnica valiosa para caracterizar la población de variantes dentro de una planta y monitorizar ensayos de protección cruzada (Sambade y col. 2002).

C) Análisis de la protección frente a RNAsas. En esta técnica el RNA viral se hibrida con una sonda complementaria y a continuación se somete a digestión con las ribonucleasas, RNasa T1 y RNasa A (que cortan en el extremo 3' de los residuos G no apareados). El patrón de fragmentos protegidos permite diferenciar variantes de secuencia del virus (Rodríguez-Cerezo y col. 1989).

D) Análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP: Single nucleotide polymorphism). El polimorfismo de un solo nucleótido es una variación en la secuencia de DNA o RNA que afecta a un solo nucleótido de una secuencia del genoma). El análisis se basa en la capacidad de detectar pequeñas diferencias entre aislados muy similares en secuencia, con poder de resolución hasta de un solo nucleótido en el fragmento del genoma analizado. Algunas técnicas para la detección de SNPs se basan en la hibridación con dos sondas específicas para un haplotipo viral, en el cual sólo una de ellas hibrida perfectamente bajo condiciones de reacción optimizadas, mientras que la sonda que no hibrida es eliminada de la reacción mediante lavado. La reacción de hibridación con las sondas marcadas diferencialmente, es detectada midiendo uno de los dos resultados esperados a partir del cual se infiere el genotipo de la muestra (Syvänen. 2001).

La RT-PCR cuantitativa empleando sondas Taqman también permite detectar SNPs. En esta modalidad, se diseña una sonda con una secuencia específica sobre la región polimórfica, en la cual un fluoróforo se acopla a un extremo de la sonda, y al otro se acopla un “quencher” o extinguidor de fluorescencia. En la sonda intacta no hay emisión de fluorescencia ya que el

“quencher” la absorbe debido al principio de transferencia de energía por resonancia o “Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET”. La hibridación de la sonda sobre la región polimórfica indica que hay identidad perfecta con la muestra. Posteriormente, la actividad 3'-5' exonucleasa de la DNA polimerasa degrada la sonda hibridada liberando el fluoroforo y el quencher, de tal forma que la absorción de fluorescencia por el quencher es interrumpida y permite que la fluorescencia sea detectada (Syvänen 2001).

Las balizas moleculares (molecular beacons), consisten en sondas que forman una estructura en forma de horquilla en cuyos extremos se encuentran el fluoroforo y el quencher, esta proximidad determina que el quencher absorba la fluorescencia emitida por el fluoroforo, pero al ocurrir la hibridación con la secuencia complementaria con coincidencia perfecta, la sonda y el quencher se separan (interrumpiendo la transferencia y absorción de energía), permitiendo que la fluorescencia sea detectada (Giulietti y col. 2001).

Otra estrategia para la discriminación de aislados es mediante ensayos de extensión de cebadores (Primer extension). Se basa fundamentalmente en la capacidad de la DNA polimerasa para incorporar nucleótidos específicos complementarios a la secuencia del molde y el aspecto clave consiste en el conocimiento de las secuencias de los polimorfismos y en el diseño apropiado de los cebadores. La extensión del cebador ocurre sólo si hay coincidencia perfecta en el extremo 3' de la zona de anillamiento y es verificada directamente por espectrometría de masa o por secuenciación (Kwok. 2001). Esta técnica también se puede emplear para detectar diferencias en un solo nucleótido en las muestras analizadas (Rogers y col. 2012).

El inconveniente de estas técnicas es que no permiten una estimación precisa de la distancia genética entre variantes, por lo que se suelen utilizar en combinación con la secuenciación de las variantes identificadas (Rubio y col. 2001a).

1.5.9. Secuenciación nucleotídica.

La determinación de la secuencia nucleotídica es la técnica más precisa y específica, ya que trata directamente con el código genético de los organismos y es la base de la caracterización molecular. La secuencia nucleotídica obtenida de una muestra y su comparación con aquellas

depositadas en las bases de datos, permite la identificación y asignación de una muestra a un grupo viral y estimar el grado de similitud con otros virus o aislados virales.

Las secuencias nucleotídicas se pueden obtener a partir de productos de PCR o RT-PCR y de clones de cDNA obtenido a partir de ellos. Si en la (RT)-PCR se han usado iniciadores conservados para un grupo viral (ej. género) se puede llegar al descubrimiento de nuevos miembros (ej. especie) de ese grupo viral. En cualquiera de estos casos, se requiere disponer previamente de secuencias nucleotídicas de algunos virus o aislados virales relacionados.

Para la determinación de secuencias de un organismo del que no se dispone ninguna información y no se ha podido detectar por ninguno de los métodos anteriores (nuevos virus) se necesita la purificación del DNA o RNA genómico viral. Hay dos modalidades:

A) Construcción de una genoteca mediante clonaje de productos de RT-PCR o PCR con iniciadores aleatorios a partir de ácidos nucleicos virales purificados, que pueden ser DNA o RNA purificado de extractos de viriones, o RNA bicatenario (apartado 1.5.4, página 18). El método de secuenciación empleado se basa en el uso de la DNA polimerasa para sintetizar cadenas de DNA incorporando dideoxinucleótidos (ddNTP) que carecen de un grupo hidroxilo en su extremo 3'. Los ddNTP inhiben la actividad de la DNA polimerasa terminando la elongación de la cadena. Como la incorporación de los ddNTPs es al azar, se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico (Sanger. 1977). Se diseñan cuatro reacciones diferentes de síntesis de DNA, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia.

B) Secuenciación masiva (pirosecuenciación). También se le conoce como secuenciación por síntesis. Es una técnica basada en una cascada de reacciones enzimáticas para la detección de grupos pirofosfato que se liberan durante la incorporación de nucleótidos por actividad de una DNA polimerasa. La ATP sulfúrilasa convierte el pirofosfato en ATP, que a su vez provee la energía a la luciferasa para oxidar la luciferina emitiendo luz a 560 nm

(Hyman. 1988, Ronaghi. 2001). Puesto que se conoce el orden en que los nucleótidos son suministrados a la reacción, la emisión de luz (o no) en un instante dado, permite determinar la secuencia en que los dNTP son finalmente incorporados. La limitación en el tamaño de las cadenas producidas (de 20 a 200 nucleótidos), es compensada por el uso de programas de ensamblaje de secuencia y manejo de bases de datos (Huson y col. 2007). La purificación del genoma viral puede realizarse por RNA bicatenario, a partir de viriones y a partir de los RNA pequeños interferentes (siRNAs, small interfering RNAs) que son un subproducto de la degradación del genoma viral por el mecanismo de silenciamiento génico de la planta. La pirosecuenciación ofrece las ventajas de la exactitud, flexibilidad, automatización y capacidad de generar simultáneamente miles de secuencias nucleotídicas.

Las desventajas de las técnicas de secuenciación es que todavía son muy costosas y lentas para aplicarlas a los análisis rutinarios. Sin embargo, esta situación puede cambiar en unos pocos años como consecuencia del rápido desarrollo de estas tecnologías.

1.6. VIRUS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.

Los cultivos hortícolas son afectados por una gran cantidad de virus que en su mayoría poseen genoma de RNA (ribovirus), los cuales presentan una gran diversidad en la naturaleza, establecen complejas relaciones con sus hospederos, vectores, y otros virus. La gran magnitud económica de los daños ocasionados por estos virus justifican su caracterización biológica y molecular para el desarrollo de métodos de detección y diagnóstico como un primer paso para la puesta en práctica de estrategias de control.

En este trabajo hemos caracterizado y desarrollado métodos para la detección simultánea de dos grupos de ribovirus que afectan a cultivos hortícolas: A) los virus del género *Fabavirus*: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV; y B) los siete virus más importantes de tomate en el área mediterránea: CMV, TSWV, ToMV, ToCV, TICV, PepMV y ToTV.

1.6.1. Fabavirus.

El género *Fabavirus*, subfamilia *Comovirinae*, familia *Secoviridae*, orden *Picornavirales* (Sanfaçon y col 2012), está compuesto por cinco especies: el virus 1 de la marchitez del haba (*Broad bean wilt virus 1*, BBWV-1), el virus 2 de la marchitez del haba (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV-2), el virus del

mosaico de la genciana (*Gentian mosaic virus*, GeMV), el virus del mosaico suave de las cucurbitáceas (*Cucurbit mild mosaic virus*, CuMMV), y el virus del mosaico suave de la hortiga blanca (*Lamium mild mosaic virus*, LMMV).

BBWV-1 y BBWV-2 infectan más de 400 especies vegetales y producen daños en cultivos hortícolas como tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*), haba (*Vicia faba*) y judía (*Phaseolus vulgaris*), y ornamentales como petunia (*Petunia hybrida*) y pachulí (*Pogestemon cablin*), ésta última de gran importancia económica en la industria cosmética (Daviet y Schalk. 2010). Ambas especies producen síntomas de mosaico y deformación foliar, manchas en anillo en hojas y frutos, y son difíciles de distinguir considerando sólo la gama de hospedantes (Lisa y Boccardo. 1996). Producen marchitamiento en haba y espinaca (*Spinacea oleraceae*); cuando la infección es temprana en haba, se produce una necrosis sistémica de las hojas del brote. En guisante (*Pisum sativum*) causa estrías; en pimiento, mosaico de intensidad variable en brotes, en forma de manchas de color verde oscuro. Los síntomas en frutos son variables, incluye áreas necróticas depresivas, manchas necróticas, dibujos irregulares y anillos cloróticos, acompañados de una reducción del desarrollo. GeMV infecta genciana (*Gentiana scabra*) y otras especies del género en condiciones naturales, en las cuales induce síntomas de mosaico. Experimentalmente infecta varias especies en las familias *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae* y *Solanaceae* (Kobayashi y col. 2005). CuMMV aparentemente tiene una gama de hospedantes restringida a plantas en la familia *Cucurbitaceae*, produciendo síntomas de mosaico suave en calabaza (*Cucurbita moschata*) y pepino chino (*Trichosanthes kirilowii*) (Dong y col. 2012, Yarwood. 1979). LMMV infecta en condiciones naturales plantas en la familia *Labiatae*, en las cuales ocasiona síntomas de mosaico suave o infección asintomática (Lovisoló. 1958). LMMV produce en hospedantes experimentales como *Nicotiana clevelandii*, *N. megalosiphon* y *N. rustica*, síntomas de mosaico y manchas en anillo, así como lesiones locales cloróticas en quinoa (*Chenopodium quinoa*). Algunos de estos síntomas se ilustran en la Fig 1.1.

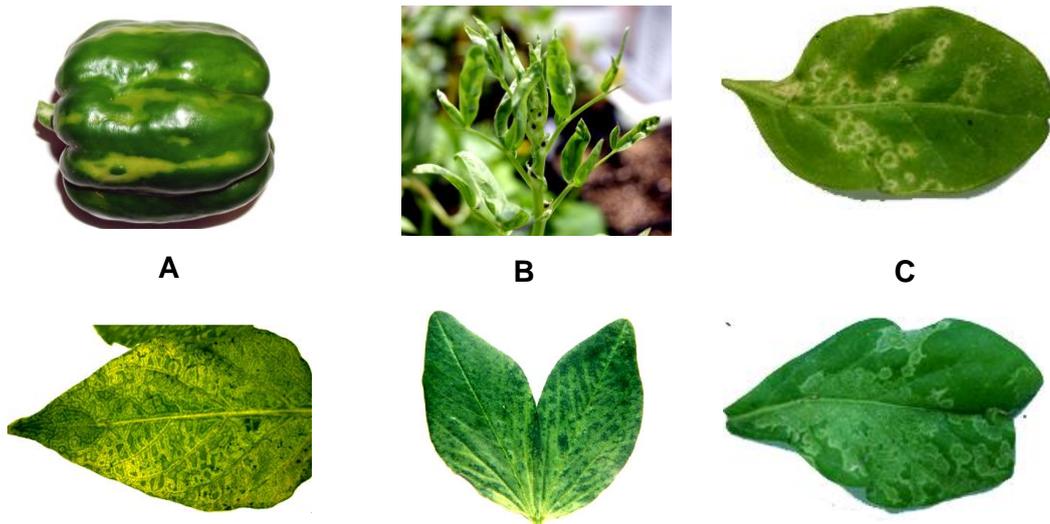


Figura 1.1. Síntomas causados por fabavirus: A) BBWV-1 en pimiento, B) BBWV-2 en haba, y C) LMMV en *Nicotiana megalosiphon* y *N. rustica*.

Los fabavirus se transmiten por al menos 20 especies de pulgones (Fig. 1.2) de una manera no persistente (Belliere y col. 2009, Ferriol y col. 2013, Lisa y Boccardo. 1996, Stubbs 1960).



Figura 1.2. *Aphis gossypii*, una de las especies de pulgones que transmiten fabavirus (imagen procedente de Moreno 2005).

BBWV-1 y BBWV-2 se encuentran distribuidos por todo el mundo, mientras que solamente se ha encontrado unos pocos aislados de GeMV en Japón y China, un aislado de CuMMV en China y un aislado de LMMV en Reino Unido (Fig. 1.3).

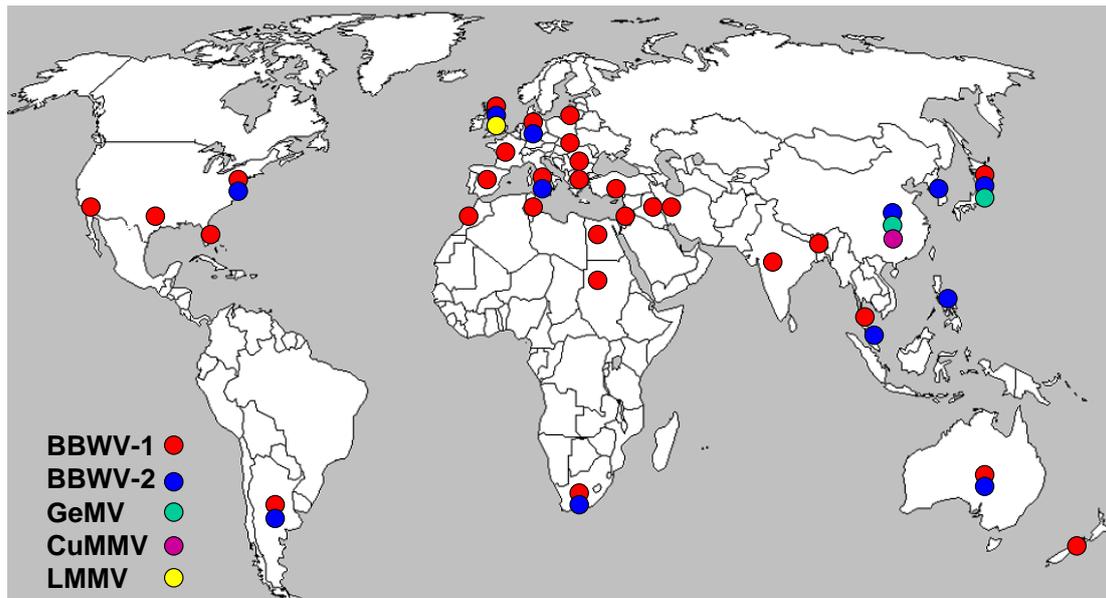


Figura 1.3. Distribución de las cinco especies virales del género *Fabavirus*: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV.

Los viriones son icosaédricos, sin envoltura lipídica, de aproximadamente 30 nm de diámetro, y están compuestos por dos moléculas de RNA y por dos proteínas capsídicas: grande (LCP) y pequeña (SCP)(Fig. 1.4).

El genoma está formado por dos RNAs monocatenarios, lineales y de polaridad positiva: RNA 1 (~6,0 kb) y RNA 2 (~3,5 kb) que se encapsidan separadamente. Los RNAs están poliadenilados en su extremo 3' y unidos covalentemente a la proteína viral VPg en el extremo 5'. El RNA 1 codifica para una poliproteína que es procesada en cinco proteínas implicadas en la replicación y expresión: el cofactor de la proteasa (PRO-CO), la helicasa (HEL), la proteína unida al genoma viral (VPg), la proteasa (PRO) y la polimerasa de RNA dependiente de RNA (POL). El RNA 2 codifica para una poliproteína que es procesada en la proteína del movimiento (MP), que hace que el virus pueda moverse entre las células de la planta, y las proteínas capsídicas grande (LCP) y pequeña (SCP) (Fig. 1.4).

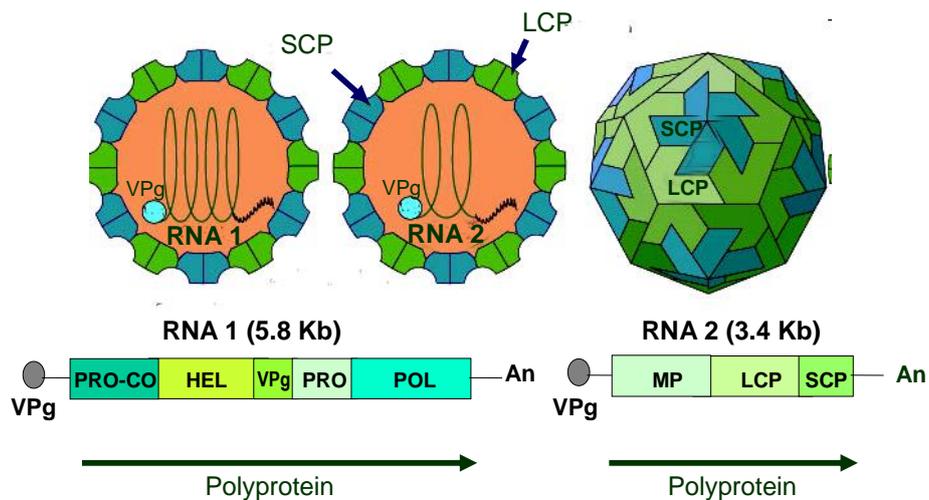


Figura 1.4. Representación de los viriones y el genoma de los fabavirus (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.2. CMV.

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) es la especie tipo del género *Cucumovirus* de la familia *Bromoviridae*.

CMV posee la gama de hospederos más amplia entre los virus de plantas, con más de 1200 especies de plantas en alrededor de 100 familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Scholthof y col. 2011). Los síntomas causados por CMV son muy variables debido a la gran cantidad de aislados genéticamente diversos y a la presencia de RNA satélites que modulan la replicación viral y la expresión de síntomas (Hull. 2001, Montasser y col. 1998). CMV causa mosaico en pepino (*Cucumis sativus*), melón (*Cucumis melo*) y otras cucurbitáceas; marchitez en espinaca, mosaico, hojas filiformes y necrosis sistémica en tomate, mosaico y manchas anulares en pimienta (*Piper nigrum*), mosaico y retraso del crecimiento en trébol (*Trifolium spp*) y alfalfa (*Medicago sativa*); retraso en el crecimiento en la soja (*Glycine max*); mosaico, clorosis infecciosa y pudrición del pseudotallo en banano (*Musa sp*), los síntomas mas frecuentes son mosaico y enanismo en muchas especies de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Palukaitis y García-Arenal 2003). En la Fig. 1.5 se muestran algunos de estos síntomas en tomate.



©A. Ragozzino

Figura 1.5. Síntomas causados por CMV en tomate (<http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu>).

Se transmite por semilla y por más de 80 especies de pulgones de manera no persistente (Fig. 1.6) (Bujarski y col. 2012).



Figura 1.6. *Macrosiphum euphorbiae*, una de las especies de pulgones que transmiten CMV (imagen procedente de Moreno 2005).

Se encuentra distribuido por todo el mundo (Fig. 1.7)

Los viriones son icosaédricos, de aproximadamente 29 nm de diámetro, sin envoltura lipídica, compuestos por tres moléculas de RNA y una proteína capsídica (Fig. 1.8).



Figura 1.7. Distribución de CMV (EPPO, 2013)

El genoma está formado por tres RNAs monocatenarios, lineales y de polaridad positiva (Fig. 1.8): RNA 1 (3,4 kb), RNA 2 (3,1 kb) y RNA 3 (2,2 kb). Cada segmento de RNA tiene una estructura similar a la del RNA transferente (RNA_t) en el extremo 3' y una estructura de caperuza o casquete (CAP), que es un nucleótido modificado de guanina, la 7-metilguanósina trifosfato, que se añade al extremo 5' mediante un enlace 5'-fosfato en vez del enlace 3',5'-fosfodiéster habitual. El RNA 1 codifica directamente para la proteína 1a, que está implicada en la replicación viral con funciones de metil transferasa y helicasa. El RNA 2 codifica directamente la proteína 2a que es una polimerasa de RNA dependiente de RNA, y la proteína 2b a partir de un RNA subgenómico, que es un supresor del silenciamiento génico. El RNA 3 codifica directamente la proteína 3a que es una proteína de movimiento (MP), y a partir de un RNA subgenómico la proteína de la cápsida (CP), que también está implicada en el movimiento (Bujarski y col. 2012, Palukaitis y García-Arenal 2003, Scholthof y col. 2011).

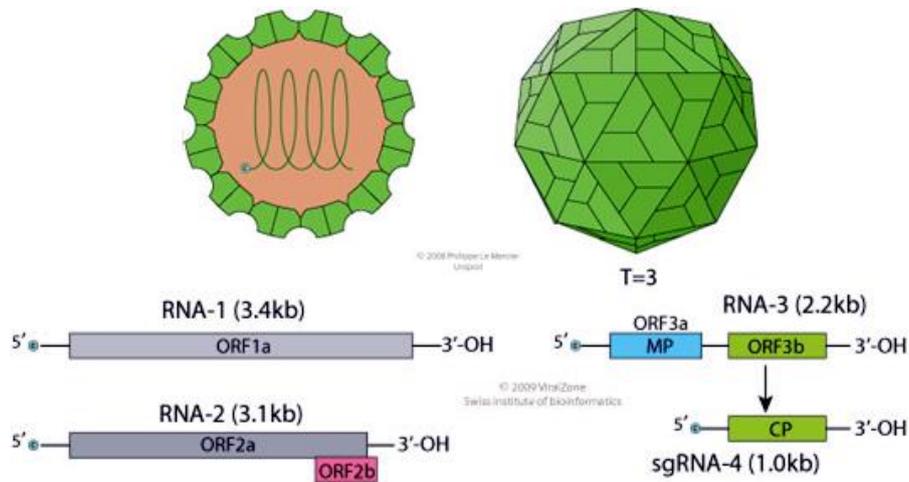


Figura 1.8. Representación de los viriones y el genoma de CMV (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.3. TSWV

El virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) es la especie tipo del género *Tospovirus* de la familia *Bunyaviridae*.

Este virus exhibe una amplia gama de hospederos, con más de 925 especies en 70 familias de plantas (Plyusnin y col. 2012). Causa principalmente daños en cultivos hortícolas como tomate, pimiento, lechuga (*Lactuca sativa*) y tabaco (*Nicotina tabacum*) y en cultivos ornamentales como petunia (*Petunia x híbrida*), y begonia (*Begonia sp.*). TSWV puede inducir diversos síntomas, que pueden variar en la misma especie hospedante dependiendo del cultivar, la edad, las condiciones nutricionales y ambientales alrededor de la planta. Los principales síntomas consisten en manchas anulares cloróticas o necróticas, marchitez y necrosis. En infecciones tempranas puede ocasionar la muerte de la planta por necrosis severa. En tomate, las plantas muestran bronceado, rizado, rayas necróticas y manchas en las hojas, pecíolos, tallos y brotes en crecimiento. Las plantas presentan poco crecimiento. Frutos maduros muestran áreas más pálidas o amarillas en la epidermis. En pimiento, los síntomas consisten principalmente en poco crecimiento y amarilleo de la planta entera. Las hojas pueden mostrar patrones de líneas cloróticas o mosaico con manchas necróticas. También aparecen rayas necróticas en las ramas que se extienden a los brotes terminales. En frutos maduros, se han observado manchas de color amarillo con anillos concéntricos o rayas necróticas EPPO (2013) (Fig. 1.9)



Figura 1.9. Síntomas causados por TSWV en tomate (Aramburu y col., 2014): A) hojas, B) fruto de una variedad susceptible y C) fruto de una variedad resistente con picaduras de trips infectivos.

Se transmite por varias especies de thrips de manera persistente (Fig. 1.10). Solamente los trips adultos y larvas del segundo estadio pueden transmitir el virus y para ello han tenido que adquirir el virus durante su fase larvaria de primer estadio, ya que el virus necesita un período de incubación durante el cual alcanza las glándulas salivales y se replica (Wijkamp y col. 1993).



Figura 1.10. *Frankliniella occidentalis*, la especie de trips que es el principal vector de TSWV (imagen procedente de <http://nfrec.ifas.ufl.edu>)

Se encuentra distribuido por todo el mundo (Fig. 1.11).



Figura 1.11. Distribución de TSWV (EPPO, 2013)

Los viriones son partículas casi esféricas con diámetro que va de 80 a 110 nm, con una envoltura lipídica derivada del hospedero que lleva incrustadas dos glicoproteínas (Gn y Gc) codificadas por el virus, y posee además tres moléculas de RNA (Fig. 1.12).

El genoma de TSWV está compuesto por tres moléculas de RNA de cadena simple, de polaridad negativa o ambisentido, denominadas: L (8,9 Kb), M (4,8 Kb), y S (2,9 Kb). Ambos extremos de cada segmento genómico son parcialmente complementarios y forman una estructura pseudocircular. Los tres RNAs están en el interior de la envoltura lipídica y cada una esta cubierta por una proteína (N: nucleocápsida). El segmento L codifica la polimerasa de RNA dependiente de RNA (POL) (de Haan y col. 1991). El segmento M codifica la proteína de movimiento NSm (de Haan y col. 1991, Li y col. 2009), y un precursor que es procesado proteolíticamente para dar las glicoproteínas Gn y Gc, que están implicadas en la transmisión por thrips (Sin y col. 2005). El segmento S codifica el supresor de silenciamiento NSs (Takeda y col. 2002), y la nucleocápsida N (Fig. 1.12).

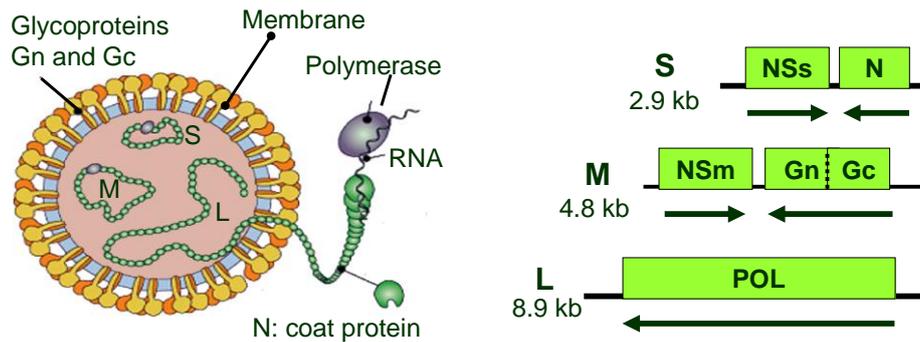


Figura 1.12. Representación de los viriones y el genoma de TSWV (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.4. ToMV.

El virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) pertenece al género *Tobamovirus* de la familia *Virgaviridae*.

ToMV causa graves daños en cultivos de solanáceas, principalmente tomate y pimiento y a una gama amplia de otros cultivos hortícolas y ornamentales (Aramburu y Galipienso. 2005). En tomate (Fig. 1.13), ToMV causa mosaico verde claro-verde oscuro o verde-amarillento y reducción de la lámina foliar; mosaico en el fruto, maduración irregular, áreas de pulpa acorchada y necrosis subepidérmicas. En algunos casos puede producir enanismo y necrosis de las hojas apicales, y falta de desarrollo de las plantas afectadas.



Figura 1.13. Síntomas causados por ToMV en tomate (imagen procedente de <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu>).

ToMV se transmite por contacto mecánico y a través de semillas. Los viriones pueden permanecer infectivos por varios años en restos secos de plantas (Broadbent. 1976).

ToMV está distribuido por todo mundo (Fig. 1.14).

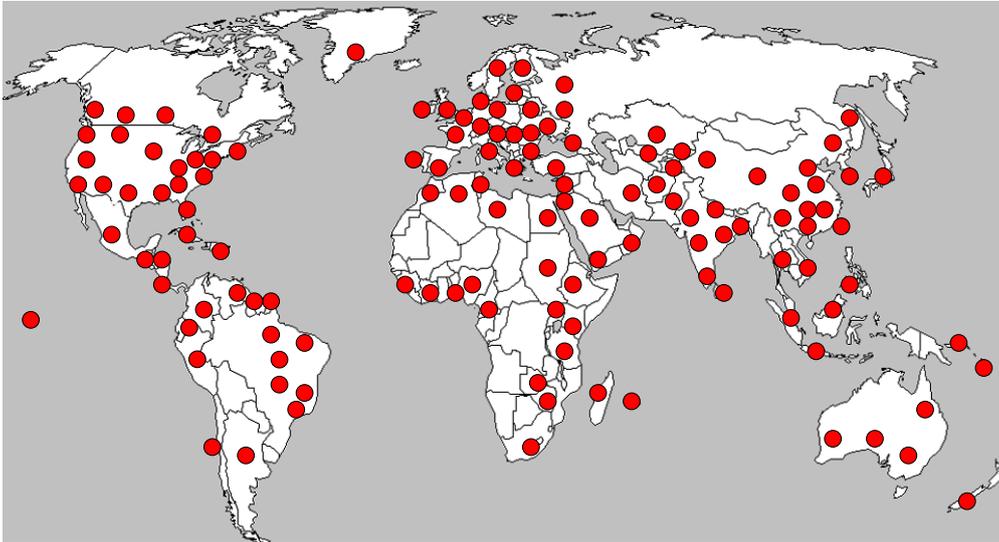


Figura 1.14. Distribución de ToMV (según la información recopilada en diversas fuentes).

Los viriones son filamentos rígidos de aproximadamente 300 nm de largo x 18 nm de diámetro, sin envoltura lipídica, formados por una CP que envuelve una sola molécula de RNA (Fig. 1.15).

El genoma es una molécula de RNA monocatenario, lineal y de polaridad positiva de unas 6 kb (Fig. 1.15). Tiene una estructura RNAt en el extremo 3' y una estructura CAP en el extremo 5' (Adams y col 2012b). El genoma contiene tres ORFs. ORF 1 y ORF 2 codifican dos proteínas de 130 y 180 Kda, respectivamente, que se traducen directamente del RNA genómico y están implicadas en la replicación del genoma. Ambas contienen motivos específicos de una metil transferasa y dominios de una helicasa. La proteína de 180 Kda contiene además un dominio de la polimerasa de RNA dependiente de RNA que se expresa por sobrelectura (*readthrough*) del codón de terminación ámbar del gen de la proteína de 130 Kda. Las otras dos proteínas codificadas son la MP y la CP, que se traducen a partir de dos RNA subgenómicos 3' coterminales (Adams y col 2012b).

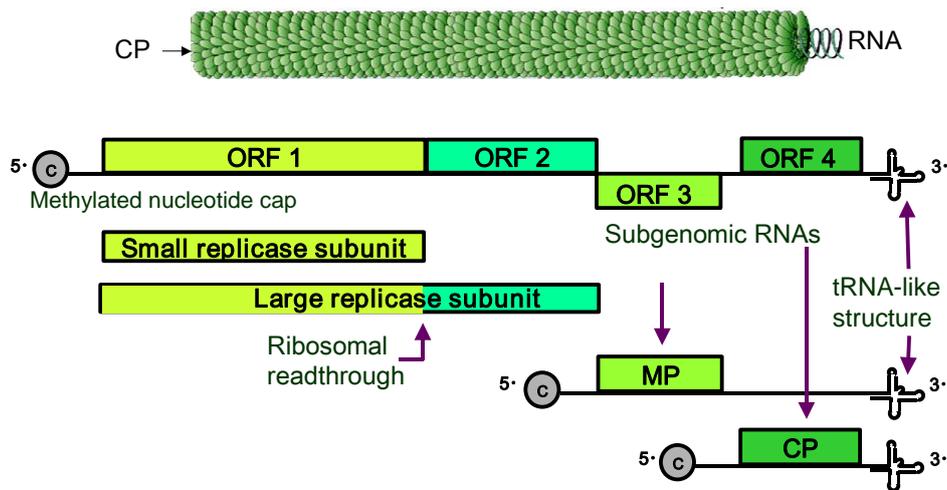


Figura 1.15. Representación de los viriones y el genoma de ToMV (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.5. Crinivirus del tomate: TICV y ToCV.

El virus de la clorosis infecciosa del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) y el virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) pertenecen al género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae*.

TICV infecta al menos 26 especies en ocho familias de plantas, tales como tomate, tomatillo (*Physalis ixocarpa*), patata, alcachofa, lechuga (*Lactuca sativa*), petunia y *N. clevelandii* (Duffus y col. 1996, Wisler y col. 1996), pimiento, *Chenopodium album*, *C. murale*, *D. stramonium* y *S. nigrum*, entre otras (EPPO, 2013). En tomate, el TOCV causa amarillamiento entre las nervaduras de las hojas, las hojas inferiores se engrosan, enrollan y tornan frágiles, y el amarillamiento evoluciona a diferentes grados de enrojecimiento y necrosis foliar, algunas plantas presentan hojas rizadas (Louro y col. 2000). Los síntomas de la enfermedad en el tomate son fácilmente confundidos con desórdenes nutricionales, o fitotoxicidad causada por pesticidas (Wisler y col. 1998). Las plantas infectadas con ToCV son más pequeñas, producen menos frutos y de menor tamaño, la maduración es alterada, y las plantas se hacen senescentes prematuramente. Todo esto disminuye el rendimiento y ocasiona pérdidas económicas (Wintermantel. 2004). Los síntomas de TICV incluyen amarillamiento entre las nervaduras de las hojas, diferentes grados de enrojecimiento y necrosis foliar. *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* presentan amarilleo de las nervaduras frente a ambos virus, pero sólo TICV causa moteado necrótico en estas plantas indicadoras (Wisler y col. 1998). En

ninguno de estos dos virus hay referencias a síntomas evidentes en frutos o flores (Fig. 1.16).



Figura 1.16. Síntomas en hojas de tomate de A) TICV y B) ToCV. Imágenes procedentes de <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/emergingviruses.htm>.

ToCV Infecta al menos 12 especies de plantas en cinco familias, incluyendo tomate, *Physallis peruvianum*, pimiento, patata (*Solanum tuberosum*), *Zinnia* sp., *Datura stramonium*, *Phytolacca icosandra*, *Plantago major*, *Ruta chalepensis* y *Solanum nigrum* (EPPO, 2013).

Ambos virus se transmiten por distintas especies de mosca blanca de manera semipersistente (Fig. 1.17): TICV por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)(Wisler y col. 1996), y ToCV por *T. vaporariorum*, *T. abutilonea*; y *B. tabaci* biotipos A, B, y Q (Hanssen y col. 2010, Navas-Castillo y col. 2000, Wintermantel y Wisler. 2006).



Figura 1.17. Mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* que es vector de TICV y ToCV (imagen procedente de <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/emergingviruses.htm>)

El TICV ha sido detectado en Norte América, varios países de Europa y Asia (EPPO, 2013) (Fig. 1.18). El ToCV está distribuido en todo el mundo; ha sido registrado en algunos países de todo el continente americano,

principalmente en los Estados Unidos, así como en varios países de Europa, Asia (Wintermantel y col. 2005) y Africa (EPPO, 2013).

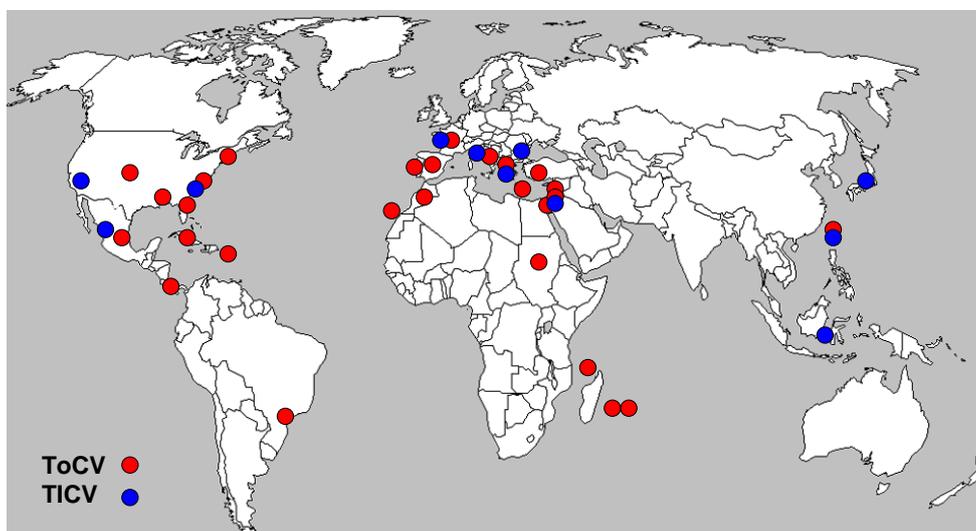


Figura 1.18. Distribución de los crinivirus de tomate: TICV y ToCV (EPPO, 2013).

Los viriones tienen forma de filamentos flexibles con dos longitudes modales, de aproximadamente 650–850 y 700–900 nm x 12 nm de diámetro (Martelli y col. 2012), sin envoltura lipídica y están compuestos por dos proteínas capsídicas: CP que forma la mayor parte del virion y la CPm que se encuentra en un extremo del virion formando una estructura de serpiente de cascabel (Tian y col. 1999). (Fig. 1.19).

El genoma está formado por dos RNAs monocatenarios, lineales de polaridad positiva, cada uno con un tamaño aproximado de unas 8 kb, que se encapsidan separadamente (Fig. 1.19). Ambos RNAs no están poliadenilados en su extremo 3' y contienen una estructura CAP en el extremo 5'. El RNA 1 presenta tres ORFs: ORF1a que codifica los dominios de metiltransferasa y helicasa, el ORF 1b que expresa mediante una deriva ribosomal (frameshifting) la POL, todos ellos necesarios para la replicación del genoma, y el ORF 2 que expresa mediante un RNA subgenómico una proteína necesaria para la replicación del RNA 2. El RNA 2 codifica para la MP, que se expresa directamente y otros ORFs que expresan mediante RNAs subgenómicos 3'-coterminales las proteínas: p59, CP, CPm y p26.

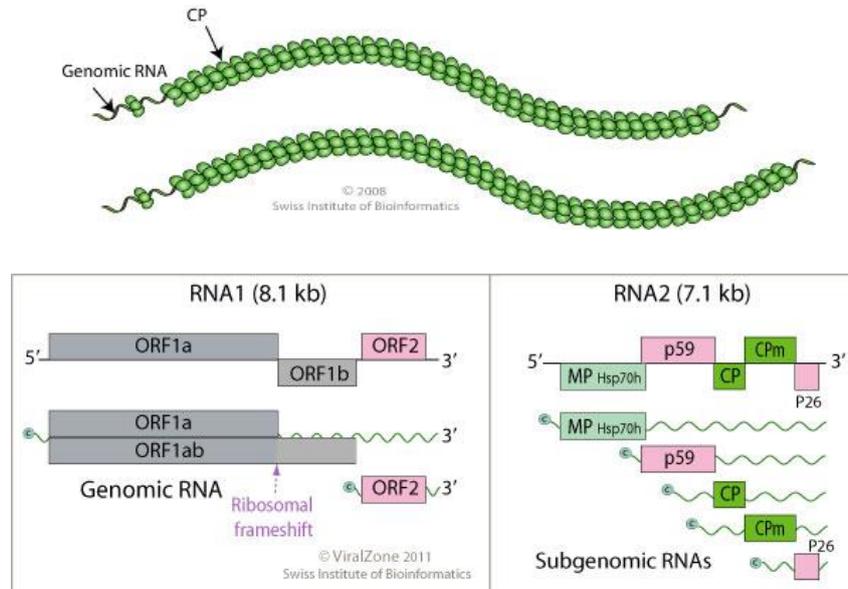


Figura 1.19. Representación de los viriones y el genoma de los crinivirus (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.6. PepMV.

El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) pertenece al género *Potexvirus* de la familia *Alphaflexiviridae* dentro del orden *Tymovirales*.

La gama de hospedantes naturales del PepMV es estrecha: infecta pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.), tomate, patata, y herbáceas como *Amaranthus* spp., *Malva parviflora*, *Nicotiana glauca*, *S. nigrum* y *Sonchus oleraceus* (Jones y col. 1980, Jordá y col. 2001, Pagán y col. 2006, Soler y col. 2002). Algunos aislados no infectan experimentalmente patata pero sí berenjena (*Solanum melongena*) y otras especies en la familia *Solanaceae*, así como *Chenopidium amaranticolor* y *C. quinoa* (Salomone y Roggero. 2002). PepMV produce diversos síntomas en tomate, desde infección latente, mosaico suave, mosaico amarillo y manchas foliares, hasta mosaico severo, ampollas y distorsión de la hoja. Los síntomas en el fruto incluyen mosaico y maduración heterogénea que conducen a una reducción global de la calidad del fruto (Jordá y col. 2001, Pagán y col. 2006)(Fig. 1.20).



Figura 1.20. Síntomas causados por PepMV en tomate (imagen procedente de <http://www.dpvweb.net>).

El virus se transmite por contacto mecánico, por semilla en muy baja proporción (<0,1%), yemas de pepino y por tubérculos de papata infectados (Jones y col. 1980). La transmisión por los abejorros polinizadores, *Bombus terrestris* y *Bombus canariensis*, ha sido también comprobada.

PePMV se encuentra en Perú (Jones y col. 1980, Soler y col. 2002), Canadá, Estados Unidos (French y col. 2001), diferentes países de Europa (Verhoeven y col. 2003) y en China (YaoLiang y col. 2003). (Fig. 1.21).

Los viriones son partículas filamentosas flexibles, sin envoltura lipídica, y miden aproximadamente 508 nm de longitud x 12.5 nm de diámetro (Jones y col. 1980), formados por una única proteína capsídica (Adams y col. 2012a, Lopez y col. 2005). (Fig. 1.22).



Figura 1.21. Distribución de PepMV (EPPO, 2013)

El genoma está compuesto por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 6 kb (Fig. 1.22). Está poliadenilado en el extremo 3' y presenta una estructura CAP en el extremo 5'. Codifica para cinco proteínas: una RNA polimerasa dependiente del RNA, una helicasa (RdRp) traducida directamente del RNA genómico, tres proteínas implicadas en el movimiento del virus (TGB1, TGB2 y TGB3) y la CP, que se traducen a partir de RNAs subgenómicos 3'-coterminales (Lopez y col. 2005).

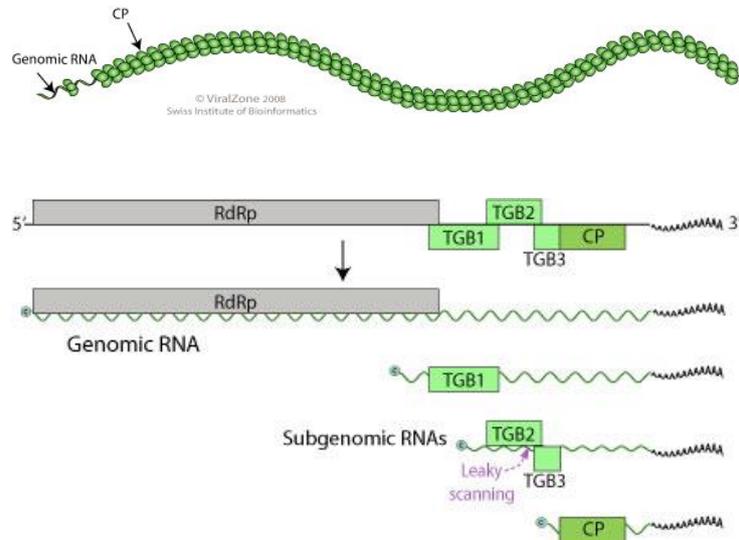


Figura 1.22. Representación de los viriones y el genoma de PepMV (<http://viralzone.expasy.org>).

1.6.7 ToTV.

El virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) es la especie tipo del género *Torradovirus* de la familia *Secoviridae* del orden *Picornavirales*.

La gama de plantas hospedantes del ToTV está restringida a la familia *Solanaceae* (Verbeek y col. 2007), con pocas especies como hospedantes silvestres en las familias *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Malvaceae* y *Polygonaceae* (EPPO, 2013). Los síntomas de esta nueva enfermedad viral consisten inicialmente en manchas necróticas, rodeadas por un área de color verde claro o amarillento que comienzan en la base de los folíolos, los síntomas se hacen mas intensos y conducen a una severa necrosis de las hojas y frutos, y ocasiona una reducción global del crecimiento de la planta. Si la enfermedad logra extenderse en las plantaciones, puede ocasionar importantes pérdidas económicas (Verbeek y col. 2007). (Fig. 1.23).



Figura 1.23. Síntomas causados por ToTV en tomate (imagen procedente de <http://www.daff.qld.gov.au>).

ToTV se transmite por las especies de moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Amari y col. 2008) (Fig. 1.24).



Figura 1.24. Mosca blanca *Bemisia tabaci* que es vector de ToTV (imagen procedente de <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/emergingviruses.htm>).

El virus está presente en Colombia y Panamá (Herrera-Vasquez y col. 2009, Verbeek y Dullemans. 2012), varios países de Europa occidental (EPPO, 2013) y Australia (Gambley y col. 2010)(Fig. 1.25).

Los viriones son icosaédricos, de aproximadamente 30 nm de diámetro, sin envoltura lipídica, y están formados por tres proteínas capsídicas (CP1, CP2 y CP3) (Fig. 1.26).

El genoma está formado por dos RNAs monocatenarios, lineales y de polaridad positiva: RNA 1 (~7,0 kb) y RNA 2 (~5,0 kb) que se encapsidan separadamente (Fig. 1.26).

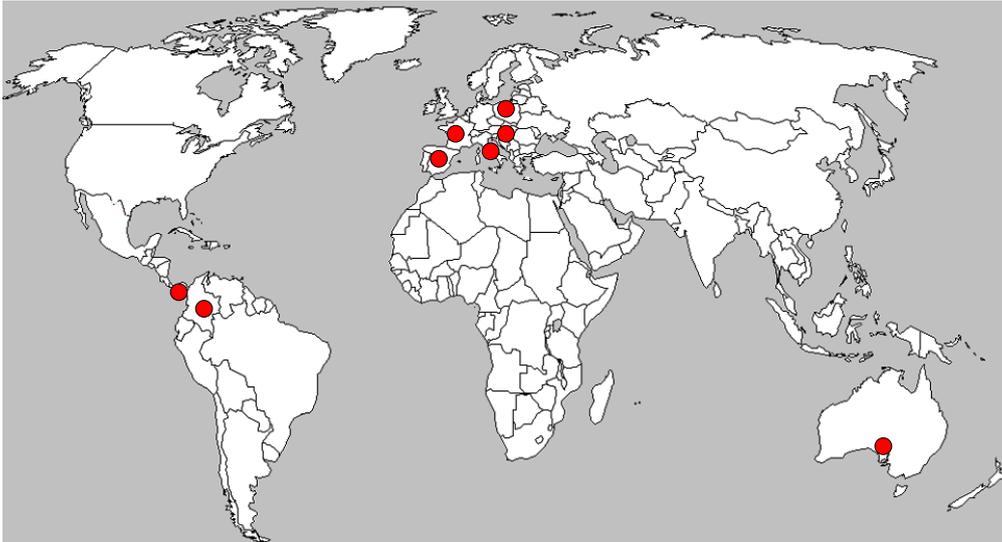


Figura 1.25. Distribución de ToTV (EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization).

Los RNAs están poliadenilados en su extremo 3' y unidos covalentemente a la proteína viral VPg en el extremo 5'. El RNA 1 contiene un ORF que codifica una poliproteína que es procesada para producir una helicasa (Hel), la proteína unida al genoma viral (VPg), una proteasa (Pro) y una polimerasa de RNA dependiente de RNA (POL). El RNA 2 contiene dos ORFs parcialmente solapantes que codifican proteínas de 20 kDa y 134 kDa. La proteína de 20 kDa es de función desconocida, y la proteína codificada por el ORF 2 rinde la proteína de movimiento (MP) y las tres proteínas capsídicas (CP1, CP2 y CP3) (Sanfaçon y col. 2012, Verbeek y col. 2007).

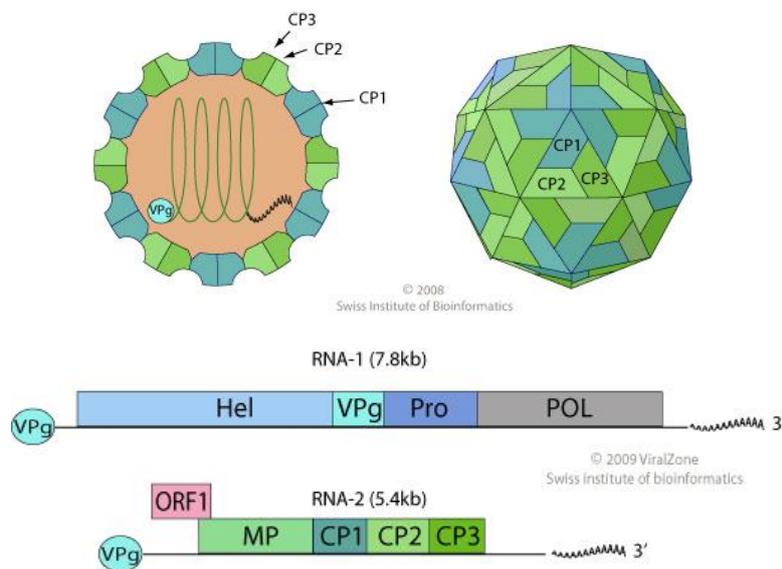


Figura 1.26. Representación de los viriones y el genoma de ToTV (<http://viralzone.expasy.org>).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades virales tienen un gran impacto negativo en la producción agrícola y representan uno de los retos para conseguir una agricultura sostenible y económicamente rentable. Para evaluar el estado fitosanitario de material de propagación, viveros y plantaciones, así como gestionar de manera integrada las medidas de control, es necesario disponer de técnicas que permitan detectar o diagnosticar los agentes causales de las enfermedades. Estas técnicas, además de cumplir con los criterios de especificidad y sensibilidad requeridos, deberían ser económicas y de rápida aplicación para facilitar su eficaz utilización donde sea requerido. Sin embargo, entre algunos de los factores que dificultan lograr estos objetivos, resaltan: A) el carácter dinámico de las virosis debido al constante efecto de las fuerzas evolutivas sobre las poblaciones virales, así como las interacciones entre estos, sus hospedantes naturales y sus vectores, que determina la aparición de nuevas variantes de virus ya conocidos, B) las condiciones ecológicas en diferentes países o regiones, en relación con la presencia de virus nativos, de vectores y hospedantes naturales de ambos, que ante cambios en los agroecosistemas, facilitan su dispersión, por lo que cada año emergen nuevas virosis de importancia agrícola que hacen necesario mantener actualizada la capacidad de detección de esa diversidad mediante el continuo desarrollo de métodos de detección y diagnóstico de relativamente rápida y fácil preparación, C) una fracción desconocida del tráfico global de material vegetal (semillas, material de propagación asexual y plantas) se hace de forma ilegal, o no cumple con las normativas establecidas por las agencias gubernamentales para garantizar el estado fitosanitario del material destinado al comercio internacional, lo cual hace que el movimiento e introducción de virus exóticos ocurra a escala planetaria con mucha rapidez debido a los modernos medios de transporte, y D) la falta de uniformidad en la capacidad de desarrollo y aplicación de estas tecnologías entre distintos países.

Para facilitar la gestión fitosanitaria de los cultivos o productos vegetales por parte de productores y agencias de control gubernamentales, es deseable que las técnicas de detección y diagnóstico sean versátiles, que se puedan aplicar a gran escala y permitan en uno o pocos ensayos la identificación de un gran número de virus a diferentes niveles taxonómicos:

familia, género, especie y aislados virales (cepas, razas, patotipos, etc.). Las técnicas moleculares basadas en la detección del genoma viral (ácidos nucleicos) mediante PCR o RT-PCR e hibridación molecular son las que mejor cumplen con todos los requisitos mencionados. Su rapidez de aplicación, especificidad y sensibilidad las hacen idóneas para su uso en actividades rutinarias de detección y diagnóstico de enfermedades.

Para el desarrollo de estas técnicas es necesario la caracterización molecular del virus, que consiste en la determinación de la secuencia nucleotídica del genoma, para el diseño de iniciadores las técnicas basadas en PCR; o la síntesis de sondas para las técnicas basadas en la hibridación molecular. Para minimizar el riesgo de identificar erróneamente muestras infectadas con otras entidades virales (dando lugar a falsos positivos) y de no detectar algunos miembros pertenecientes a la entidad viral de interés (dando lugar a falsos negativos), se hace necesaria la caracterización de la estructura y diversidad genética de las poblaciones virales y los procesos evolutivos que las determinan.

La finalidad de esta tesis es el desarrollo de métodos moleculares de detección de ribovirus de cultivos hortícolas, para lo cual se han considerado dos retos u objetivos generales. El primero se refiere al género *Fabavirus* que está compuesto por cinco especies virales: El BBWV-1, el BBWV-2, el GeMV, el CuMMV y el LMMV. BBWV-1 y BBWV-2 están distribuidos por todo el mundo y afectan un gran número de cultivos y plantas silvestres. Actualmente están caracterizadas molecularmente BBWV-1, BBWV-2, GeMV y CuMMV, por lo que se requiere determinar la secuencia nucleotídica de LMMV para poder desarrollar métodos de detección a nivel del género *Fabavirus*, y métodos específicos para cada especie basados en RT-PCR e hibridación molecular.

El segundo objetivo consiste en el desarrollo de un método basado en la RT-PCR para la detección simultánea de siete de los ribovirus más importantes en cultivos de tomate del mediterráneo y áreas intertropicales: el CMV, el TSWV, el ToMV, el PepMV, el ToCV, el TICV, y el ToTV. Para el diseño de los cebadores para la RT-PCR se ha tenido en cuenta la diversidad genética de cada uno de estos virus. Fue necesario caracterizar la diversidad genética de ToMV puesto que era único del que no se disponía de esta información.

Basado en todo esto se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Género *Fabavirus*: caracterización molecular de LMMV.
2. Género *Fabavirus*: detección simultánea de todos los fabavirus por RT-PCR.
3. Género *Fabavirus*: detección simultánea de todos los fabavirus por hibridación molecular.
4. Ribovirus de tomate: caracterización molecular de ToMV.
5. Ribovirus de tomate: detección simultánea de siete virus por RT-PCR.

3. EL GÉNERO *FABAVIRUS*: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LMMV

3.1. INTRODUCCIÓN.

La determinación de la secuencia nucleotídica total o parcial de un virus es un requisito básico para el estudio detallado de la variabilidad genética y establecer su relación taxonómica con otros virus. A partir del análisis de las secuencias nucleotídicas se puede inferir algunos de los factores evolutivos que determinan la composición y estructura genética de las poblaciones virales: mutación, recombinación, selección natural, deriva genética y flujo genético (Moya y col. 2004). El modo y amplitud de acción de la evolución depende de la biología de cada virus (ej. gama y tipo de hospederos, modo de transmisión entre plantas, etc.), del ambiente (ej. cultivos y malas hierbas adyacentes, ciclos de cultivos, etc.) y también depende de eventos históricos de la población viral (ej. reducción drástica de su tamaño poblacional por cuellos de botella o efecto fundador). Comprender que la evolución y otros factores implicados en la epidemiología de las enfermedades causadas por ribovirus interactúan en la misma escala espacio-temporal, es fundamental para esbozar escenarios de cómo ocurrirían epidemias, que a su vez influyen en el potencial para la rápida tasa de evolución que presentan estos virus (Grenfell y col. 2004).

Por otra parte, el estudio de la composición genética de poblaciones virales aporta valiosa información para el diseño de métodos moleculares basados en la PCR o RT-PCR y la hibridación molecular. La comparación de secuencias nucleotídicas permite seleccionar zonas genómicas virales conservadas o variables, lo que por una parte proporciona una gran flexibilidad para elegir el nivel de especificidad: familia, género, especie o cepa viral, y por otra parte, mejora la especificidad (detección de todos los miembros de una especie viral o grupo taxonómico y exclusión de otros virus pertenecientes a otra especie o grupo) para evitar o disminuir los falsos positivos o negativos.

Finalmente, se debe tener en cuenta la variabilidad genética y la capacidad evolutiva de los virus en la aplicación de estrategias de manejo

integrado, para lograr un control de la enfermedad que sea eficaz y duradero (Acosta-Leal y col. 2011).

El género *Fabavirus*, ubicado en la Subfamilia *Comovirinae* de la Familia *Secoviridae*, está formado por cinco especies virales: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV. Las características biológicas y moleculares de estos virus están descritas en el Capítulo 1 (Página 27). BBWV-1 fue descubierto en cultivos de haba en Australia en 1947 (Stubbs. 1947). LMMV se encontró en 1953 en Gran Bretaña en plantas de la familia *Lamiaceae* que mostraban un mosaico suave o eran asintomáticas (Lovisol. 1958), y se consideró una especie distinta del género *Fabavirus* con base en la gama de hospederos y su distinta reactividad serológica con respecto a BBWV-1 (Lisa y col. 1982). Posteriormente, se estableció una tercera especie, BBWV-2, basado en sus diferencias serológicas con BBWV-1 (Uyemoto y Providenti. 1974). La determinación de la secuencia de parte del genoma de varios aislados de BBWV-1 y BBWV-2 confirmó que verdaderamente se trataba de dos especies virales distintas (Kobayashi y col. 1999). Las otras dos especies del género *Fabavirus*, GeMV y CuMMV se describieron más recientemente y su clasificación como especies se determinó principalmente en base de la secuencia nucleotídica del genoma (Dong y col. 2012, Kobayashi y col. 2005).

Hasta la fecha, se ha determinado la secuencia nucleotídica del genoma completo de dos aislados de BBWV-1, uno de España (Ferrer y col. 2005) y el otro de EEUU (Kobayashi y col. 2003), 16 aislados de BBWV-2 de Extremo Oriente (Hart y col. 2008, Ikegami y col. 1998, Ikegami y col. 2000, Kuroda y col. 2000, Lee y col. 2000, Nakamura y col. 1998, Qi y col. 2000a, Qi y col. 2000b), tres aislados de GeMV, uno de Japón (Kobayashi y col. 2005) y dos de China (Wang y col. 2008), y un aislado de CuMMV de China (Dong y col. 2012). La única especie viral del género *Fabavirus* de la que aún no se dispone ningún dato de secuencia es LMMV.

El objetivo del presente capítulo es determinar la secuencia nucleotídica completa de LMMV para caracterizar su genoma y estudiar las relaciones filogenéticas con los otros miembros del género *Fabavirus* para evaluar su clasificación taxonómica. La información obtenida será utilizada para desarrollar métodos de detección molecular específicos para LMMV y métodos generales para todos los miembros de este género viral (véase Capítulos 4 y 5 en la páginas 69 y 79, respectivamente).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aislado viral.

El aislado viral de LMMV PV0454 se compró a la colección DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German, Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Este aislado se colectó originalmente en 1953 en Cambridge (Reino Unido) en una planta de *Lamium album* con síntomas de mosaico suave (Lisa y col. 1982), y posteriormente se multiplicó por inoculación mecánica en *Nicotiana clevelandii*.

3.2.2. Extracción de RNA.

El RNA total y el RNA bicatenario (intermediario replicativo del genoma viral) de plantas infectadas con LMMV, se purificaron con los siguientes protocolos:

3.2.2.1. Extracción de RNA total.

El tejido foliar de plantas de *Nicotiana clevelandii* infectada con LMMV se cortó en pequeños trocitos y se congeló en nitrógeno líquido. Alícuotas de 100 mg se pulverizaron dentro de tubos eppendorf de 2 ml con bolitas de vidrio usando un triturador mecánico (MM 400, Retsch GmbH). Se utilizaron dos protocolos para la extracción del RNA total:

A) El protocolo del estuche comercial UltraClean Plant RNA Isolation Kit 13300-50 (MoBio, USA). El RNA se capturó en un filtro para microcentrífuga con membrana de silica gel, que tras lavarse para eliminar los contaminantes, se eluyó en 50 µl de agua desionizada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y se guardó a -80 °C hasta su uso.

B) Un protocolo estandar basado en extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol. A los 100 mg de tejido pulverizado se le añadió 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:C:AI 25:24:1) a pH 6,7 y 2,5 µl de β-mercaptoetanol, se incubó en hielo durante 5 min, se agitó con un vórtex durante 1 min, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min manteniendo una temperatura de 4°C. La fase superior acuosa se transfirió a otro tubo y se mezcló con 450 µl de F:C:AI utilizando un vórtex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y para precipitarlo se añadió 0,1 volumen de acetato sódico (C₂H₃NaO₂) a 3M con pH 5,0 y dos volúmenes de etanol absoluto, se incubó a -20 °C durante la noche o

a -80 °C por al menos 30 min y se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C por 30 min. El precipitado se lavó con 70% de etanol y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada tratada con DEPC. El RNA se guardó a -80 °C hasta su uso.

3.2.2.2. Extracción de RNA bicatenario.

Para la purificación del RNA bicatenario se desarrolló un protocolo simplificado basado en cromatografía de celulosa no iónica (CF-11, Whatman) en presencia de 16% de etanol (Moreno y col. 1990). Se trituró unos 200 mg de tejido foliar con nitrógeno líquido en un tubo para microcentrífuga y se agregó 450 µl de tampón STE 2X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM de EDTA-Na), 55 µl de SDS al 10%, y 500 µl de fenol saturado en STE 1X. La mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm a la misma temperatura. Se recogió la fase acuosa y se ajustó a una concentración final del 16% de etanol, llevando el sobrenadante a 1 ml con STE 2X y agregando 200 µl de etanol al 96%. El sobrenadante se mezcló con 80 mg de celulosa no iónica (CF-11, Whatman) previamente equilibrada con STE 1X con 16% de etanol y se agitó suavemente durante unos minutos para que la celulosa capturase el RNA bicatenario. Para lavar y eliminar los contaminantes, el tubo se centrifugó a 10.000 rpm por 2 min y se descartó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. Este paso se repitió 4 veces. Para eluir el RNA bicatenario, se resuspendió la celulosa con 150 µl de STE 1X (sin etanol) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante que contenía el RNA bicatenario se recogió en un nuevo tubo repitiendo el lavado con STE 1X (sin etanol). Éste se precipitó agregando 0,1 volumen de acetato sódico 3M a pH 5,5; y 2 volúmenes de etanol al 95%, dejando en incubación a -20 °C por 1 h o a -80 °C x 15 min, centrifugando a 13.000 rpm durante 30 min a 4°C, y descartando el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado por 10 min y finalmente se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril. El extracto de RNA bicatenario se guardó a -20 °C hasta su uso.

3.2.2.3. Tratamiento con DNasa.

Para eliminar el DNA, se tomaron 5 µl de RNA total o bicatenario y se agregó 2 unidades (U) de DNasa (Ambión), 2 µl de tampón “first strand 5x (Invitrogen)”, y 1 µl de dithiothreitol (DTT) a 100 mM. La reacción se ajustó a un volumen final de 20 µl, se incubó a 37°C durante 20 min y se calentó a 100°C durante 10 min para inactivar la DNasa.

3.2.3. Síntesis de cDNA del genoma de LMMV.

3.2.3.1. Construcción de una genoteca aleatoria.

Se construyó una genoteca de cDNAs del genoma viral mediante RT-PCR con cebadores aleatorios (Froussard. 1992). La síntesis de la primera hebra de cDNA se llevó a cabo mediante RT con el iniciador PAN, (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3'), que tiene incorporado en su extremo 3' un hexámero sintetizado al azar para poder anillar en muchos puntos aleatorios de la secuencia.

La concentración del RNA bicatenario se estimó usando un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific, Inc). Para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se desnaturizó 8 µl de RNA bicatenario de LMMV (aprox. 500 ng) en presencia de 2 µl del iniciador PAN (0,1 µg/µl) mediante incubación a 95°C durante 5 min y enfriamiento súbito en hielo, y se añadió a una mezcla de reacción que contenía 5 µl de "first strand buffer 5x" (Invitrogen), 100 mM de DTT, 0,5 mM de dNTPs, 40 U de inhibidor de RNasa (RNase OUT™, Invitrogen), y 100 U de transcriptasa reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen). La mezcla se incubó a 45°C durante 50 min en un volumen final de reacción de 25 µl.

Para obtener la segunda hebra de cDNA, se tomaron 12,5 µl de la anterior mezcla de reacción y se agregó 8 U de Klenow (Invitrogen), 5 µl de tampón Klenow 10X y 5 U de RNase H (Invitrogen), se ajustó a un volumen final de 50 µl con agua desionizada estéril y se incubó a 37°C durante 30 min. El cDNA se purificó a través de una minicolumna del estuche comercial GFX PCR DNA Purification Kit (Amershan) y se eluyó en 30 µl de agua desionizada estéril.

Para la amplificación de los fragmentos de cDNA sintetizados al azar se realizó una PCR con el iniciador PA que presentaba la misma secuencia que el iniciador PAN pero carente el hexámero aleatorio NNNNNN (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3'). La reacción de PCR contenía 1 µl del cDNA purificado, 0,8 µl del iniciador PA (0,1 µg/µl), 2 µl de tampón 10X PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y agua desionizada estéril hasta completar en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo de desnaturización a 94°C durante 3 min, 40 ciclos de desnaturización a 94°C durante 30

segundos, anillamiento de los iniciadores a 55°C durante 30 segundos, y elongación a 72°C durante 60 segundos y un paso final de extensión a 72°C durante 10 min. Se verificó la obtención de los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA-2Na), teñido en una solución acuosa de bromuro de etidio a concentración final de 1,0 ng/ml. Los productos de PCR se clonaron y se secuenciaron. A partir de las secuencias nucleotídicas se diseñaron iniciadores para completar la secuencia del genoma de LMMV (Tabla 3.1).

3.2.3.2. RT-PCR con iniciadores específicos para LMMV.

Para determinar la secuencia nucleotídica de LMMV que había entre los clones obtenidos de la genoteca aleatoria, se realizaron RTs y PCRs con los iniciadores diseñados a partir de las secuencias obtenidas de dichos clones.

Las RTs se llevaron a partir de 50 ng de RNA bicatenario que se desnaturalizó en presencia de 0,2 µM de cada iniciador por calentamiento a 95°C por 5 min y enfriamiento súbito en hielo. Luego se añadió a una mezcla de reacción que contenía 4 µl de tampón de síntesis de primera cadena (First Strand Buffer 5X, Invitrogen), 1mM DTT, 0,2 mM de cada dNTP, 10 U de inhibidor de RNasa (RNAase OUT inhibitor, Invitrogen) y 100 U de transcriptasa reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen), a la que se añadió agua desionizada esteril hasta completar 20 µl. Esta solución se incubó a 42 °C durante 50 min. Las PCRs se llevaron a cabo con 1/10 del producto de RT de manera similar al anterior apartado, pero variando las temperaturas de anillamiento o los tiempos de elongación dependiendo de los iniciadores usados. Se siguió una estrategia de avance progresivo (walking through genome) en las que se diseñaban nuevos iniciadores según se iba avanzando en la determinación de la secuencia.

Tabla 3.1. Iniciadores diseñados para determinar la secuencia nucleotídica de LMMV

RNA	Sentido	Iniciador ^a	Secuencia	5' → 3'	Posición
RNA1	Directo	R1d-400	TTTTCAGCAGTGCGAGTATTAAG		400-422
		R1d-1140	TCGGACACAAAGACACCATCAG		1140-1161
		R1d-2637	ACTGCTAATTGTTCTGATGCC		2637-2657
		R1d-3387	GCTGTGATGTTCACTTACAAGTAC		3387-3410
		R1d-4761	CGTTATGCTTACTCCGTCT		4761-4779
		R1d-5508	AATTATGCTTATGGAGTCGG		5508-5527
		R1d-5660	GGTAGTTGGTTATGTTTTCAGT		5660-5681
	Reverso	R1r-242	ACCTGCACACATTTTTGATAACT		242-220
		R1r-299	GTAGTACTTGTGTGCCAAATGCTGA		299-275
		R1r-1614	CTGTGTGTAAGACTTGCATAGAC		1614-1592
		R1r-2130	CATGTGGAATGCTGGGGTTGT		2130-2110
		R1r-3048	CCCAGTTACGGCGATGA ACTT		3048-3028
		R1r-4874	GCGTCTGATACTGATATTTGGTTGTCGTC		4874-4845
		R1r-4176	CGAAATATCTGGCCTTTCCTTTGTC		4176-4152
RNA2	Directo	R2d-93	AATCTAACAGCTTTCAGTAAGTTT		93-116
		R2d-656	GCAAATTCATGAAGATATGCC		656-677
		R2d-1331	TACTATCCCAAAGGCAAGAC		1331-1351
		R2d-2048	AGCCTTTTAGTTGTGTGGATTATTG		2048-2072
		R2d-2670	CCAGCGCGATTTGGTTACAAGTCAGCAG		2670-2697
		R2d-3203	GCACCACACCCAACAGCACTC		3203-3223
		R2d-3421	GCGGAGGAGGTTGAAGTTTT		3421-3440
		R2d-3922	CGAGGGAAGCCAGAACTAA		3922-3941
	Reverso	R2r-157	TGCGCTTTTAATCACACTCCC		157-137
		R2r-283	ATGCGTGTGGACTCTTCAACTCT		307-283
		R2r-1083	AGTATAGTTATCATCGAAATC		1083-1063
		R2r-1687	CTTCCAACACCTCTTGTTCAT		1687-1666
		R2r-3352	GTA CTGATTCAACTTCATGAACATTCCC		3352-3325
R2r-2901	GTACATAAACACATCCCCAAG		2901-2881		

3.2.3.3. RT-PCR de los extremos 5' de los RNA genómicos.

Para determinar la secuencia nucleotídica de los extremos 5' del RNA1 y del RNA2 de LMMV se utilizó el estuche comercial 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche). Primero se diseñaron los iniciadores reversos R1r-242 y R1r-299 para el RNA 1, y R2r-157 y R2r-283 para el RNA 2 (Tabla 3.1). Se sintetizó el cDNA de cada RNA a partir de RNA total mediante RT con los

cebadores R1r-299 y R2r -283 para el RNA 1 y el RNA 2, respectivamente. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl. El cDNA se purificó utilizando el estuche “High Pure PCR Product Purification Kit, Roche” y se añadió una cola de dATP (poli-A) al extremo 3’ de los cDNAs (extremo 5’ de los RNAs genómicos) con el estuche comercial 5’/3’ RACE Kit, 2nd Generation (Roche). Para ello se preparó una mezcla de reacción que contenía 19 µl de cDNA purificado, 2,5 µl de tampón de reacción 10X, y 0,2 mM de dATP, se incubó a 94 °C por 3 min, se enfrió en hielo rápidamente y se añadió 80 U de transferasa terminal, se incubó a 37 °C durante 20-30 min, y finalmente se inactivó la enzima al incubarse a 70 °C por 10 min. Esta cola poli-A artificial, es el sitio de anillamiento de un iniciador directo denominado oligo(dT)-ancla (GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV), que fue suministrado por el estuche comercial, y junto a los anteriores cebadores reversos se usaron para amplificar mediante PCR el cDNA obtenido por RT. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl que contenía 1 µl de cDNA purificado, 0,5 µl de cada iniciador (concentración final 0,2 µM), 2 µl de tampón 10X PCR, 0,6 µl de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de dNTPs (10mM), 0,1 µl de Taq polimerasa (5U/µl, Invitrogen) y agua desionizada estéril hasta completar en el volumen. Las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 45 segundos; y un paso final a 72°C durante 10 min.

El producto de PCR se amplificó con una segunda PCR anidada, empleando los iniciadores reversos R1r-242 para el RNA 1 y R2r-157 para el RNA 2 junto con un cebador directo denominado ancla (5’-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3’) que anilla sobre la región 5’ del cebador oligo(dT)-ancla. La mezcla de reacción fue similar a la anterior pero se usó como molde 10 ng del anterior producto de PCR y 0,4 µl de cada iniciador (concentración final 0,2 µM). Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas anteriormente, excepto que el paso de extensión a 72°C en los 35 ciclos de amplificación se hizo durante 30 segundos.

3.2.3.4. RT-PCR del extremo 3’ de los RNAs genómicos de LMMV.

Dado que el RNA genómico de los integrantes de la familia *Secoviridae* posee una región no codificante que está naturalmente poliadenilada en su extremo 3’, se aprovechó este rasgo para efectuar la RT-PCR utilizando un

oligo(dT)₁₇ como iniciador reverso y los iniciadores directos R1d-5508, R1d-5660 para el RNA 1; y R2d-3421 y R2d-3922 para el RNA 2 (Tabla 3.1), que se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas determinadas previamente. Sin embargo, la presencia de fragmentos de secuencias ricas en A's dentro de la región 3' no codificante a las que se unía el cebador oligo(dT)₁₇, ocasionaron dificultades que no se pudieron solventar empleando diferentes condiciones de RT-PCR y diseñando nuevos iniciadores (datos no mostrados).

Por esta razón, se añadió al extremo 3' una cola poli-C en lugar de una poli-A en el cDNA obtenido por RT a partir de RNA bicatenario con los iniciadores directos R1d-5508 y R2d-3421 para el RNA 1 y RNA 2 utilizando el estuche comercial *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0* (Life Technologies). Se utilizó un iniciador suministrado en el estuche denominado Abridged Anchor primer (AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG IIGGGIIGGGIIG-3'), que incorpora degeneraciones intercaladas de Inosina en un contexto Poli G (para anillar con la cola poli-C). La primera PCR para la obtención del extremo 3' contenía 1 µl de cDNA purificado, 0,2 µM del cebador utilizado para la RT (R1d-5508 para el RNA 1 y R2d-3421 para el RNA 2) y 0,2 µM del cebador AAP, 2 µl de tampón 10X PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y agua desionizada estéril hasta completar un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 45 segundos, y un paso de extensión final a 72°C durante 10 min.

Para la PCR anidada se utilizó como iniciador reverso, un oligonucleótido suministrado por el estuche comercial "Abridged Universal Anchor primer" (AUAP: GGCCACGCGTCGACTAGTAC), y los iniciadores directos R1d-5660 para el RNA 1, y R2d-3922 para el RNA 2 de LMMV (Tabla 3.1). La mezcla de reacción contenía 10 ng de amplicón purificado de la primera PCR, 0,2 µM de cada iniciador. La composición de la reacción de la PCR y el programa de amplificación fue similar a la PCR descrita anteriormente, excepto que los ciclos de elongación a 72°C duraron 30 segundos.

3.2.4. Clonaje y secuenciación.

Los productos de PCR se ligaron en proporción equimolar con el vector pGEMT-Easy (Promega) y se transformaron en bacterias *E. Coli* DH-5 α , según el procedimiento estándar (Sambrook y col. 2001). Las colonias blancas de bacterias seleccionadas se multiplicaron en medio LB (Tryptona 10,0 g/L, extracto de levadura 5,0 g/L, Cloruro de sodio 5,0 g/L, a pH 7,2) líquido y se extrajo el DNA plasmídico con el estuche comercial *UltraClean® Standard Mini Plasmid Prep Kit* (MoBio Laboratories, Inc) tras comprobar el tamaño de los fragmentos clonados mediante PCR y electroforesis.

Los clones de cDNA se secuenciaron con los iniciadores universales T7, SP6 o M13, o con los iniciadores que se usaron en la reacción de PCR a partir de la cual se obtuvieron. En algunos casos, se secuenciaron directamente los productos de PCR tras purificarlos con el estuche comercial *UltraClean® 15 DNA Purification Kit*, 12100-300 (MoBio, Lab. Inc). Las secuencias nucleotídicas de los clones y productos de PCR se determinaron en ambos sentidos en el servicio de secuenciación del IBMCP-CSIC-UPV (Valencia, España) mediante el método Sanger con dideoxinucleótidos marcados (Big Dyes v3.1, Applied Biosystems) en un secuenciador capilar (3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

3.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas.

Los cromatogramas recibidos del servicio de secuenciación se analizaron con el programa CHROMAS 2.31, disponible en <http://www.chromas.com-about.com>, para seleccionar y editar las secuencias con buena calidad. Las aplicaciones BLASTX y BLASTN (Altschul y col. 1990), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, se utilizaron para seleccionar las secuencias con una identidad nucleotídica o aminoacídica significativa con miembros del género *Fabavirus*. El ensamblaje de la secuencia consenso de los dos RNAs genómicos de LMMV se realizó con el programa STADEN (Bonfield y Whitwham 2010). Los iniciadores para la RT y PCR se diseñaron con el programa OLIGO PRIMER ANALYSIS SOFTWARE v.6.65 (Molecular Biology Insights).

Las secuencias nucleotídicas de LMMV se compararon con todas las secuencias completas conocidas del género *Fabavirus* y algunas de los otros dos géneros de la subfamilia *Comovirinae*: *Comovirus* y *Nepovirus* obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El programa MEGA

5.0.1 (Tamura y col. 2011), se utilizó para el alineamiento de las secuencias nucleotídicas mediante el método CLUSTAL W (Higgins y col. 1994), la estimación de las identidades nucleotídicas y aminoacídicas, y la inferencia de las relaciones filogenéticas mediante el método del vecino más próximo (Saitou y Nei. 1987) y máxima verosimilitud (Nei y Kumar. 2000) usando el modelo de Dayhoff (Dayhoff y Schwartz. 1978) para las sustituciones aminoacídicas y un test de simulación de agrupamientos (bootstrap) de 1000 repeticiones para estimar la significancia estadística de cada nodo (Efron y col. 1996).

La estructura secundaria de menor energía libre del RNA se predijo con la opción Quickfold de la aplicación RNA folding form (Zuker. 2003), implementada en *The Unafold Web Server* (<http://www.mfold.rna.albany.edu>). Se utilizaron las opciones por defecto, excepto las reglas de energía que se aplicaron a RNA lineal a 25°C.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se determinó la secuencia nucleotídica del genoma completo de LMMV y se depositó en la base de datos del GenBank con los números de acceso KC595304 y KC595305 para los RNAs genómicos 1 y 2, respectivamente.

3.3.1. Características del genoma de LMMV.

La secuencia del RNA 1 consta de 6.080 nucleótidos (nt), con tres regiones genómicas (Fig. 3.1): una región 5' no codificante (5'-UTR: *untranslated region*) de 209 nucleótidos, un único marco de lectura de 5.601 nt que codifica para una poliproteína de 1.866 aminoácidos (aa) con un peso molecular estimado de 209.447 Da (209 KDa), y una región 3' no codificante (3'-UTR) de 270 nt, que es la de mayor longitud para el RNA 1 dentro del género. El codón de inicio de la traducción del RNA 1 (AUG) está en la posición 210 y presenta un contexto flanqueante (AAA AUG GA) igual al descrito para BBWV-1 y BBWV-2 (Ferrer y col. 2005) y similar al de otros miembros del género *Fabavirus*, los cuales se parecen al contexto (AA(C/A)A AUG GC) encontrado en plantas superiores (Joshi y col. 1997).

La poliproteína 1, es hidrolizada por una proteasa codificada por el virus dando lugar a cinco proteínas. Los sitios de corte reconocidos por la proteasa, así como la presencia de dominios y motivos conservados de estas proteínas en LMMV se han inferido a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las distintas especies del género *Fabavirus* y por

comparación con la secuencia del CPMV, del género *Comovirus*, que es el virus representativo de la subfamilia *Comovirinae* (Goldbach y Wellink. 1996). En la poliproteína 1 de LMMV se han identificado dos dipéptidos: Q/S y Q/G, como posibles sitios de corte (Fig. 3.1) y las cinco proteínas: A) el co-factor de la proteasa (PRO-CO, 963 nt, 321 aa, 36 KDa) en la cual se ha identificado el motivo del cofactor de proteasa conservado en la subfamilia *Comovirinae*, B) la helicasa (HEL, 1806 nt, 602 aa, 67 KDa) para la cual se identificaron los tres motivos conservados de la superfamilia III de virus con genoma de RNA de polaridad positiva (Gorbalenya y col. 1989, Marchler-Bauer y col. 2011), C) la proteína de unión covalente al genoma (VPg, 78 nt, 26 aa, 3 KDa), D) la proteasa (PRO, 630 nt, 210 aa, 23 KDa), cuya secuencia ha alineado con un dominio conservado de las proteasas 3C de cisteína del orden *Picornavirales* (Allaire y col. 1994), y E) la polimerasa de RNA dependiente de RNA (POL, 2124 nt, 707 aa, 80 KDa) que tiene los 3 motivos conservados: sitio de unión de iones metálicos, sitio de unión a NTPs y sitio de unión a oligonucleótidos, característicos de las RNA polimerasas RNA dependientes de los virus de RNA de polaridad positiva (Koonin y col. 1993, Marchler-Bauer y col. 2011).

El RNA 2, de 4.065 nt, consta de una región 5'-UTR de 170 nt, seguida de un único marco de lectura de 3.291 nt, que codifica para la poliproteína 2 de 1.096 aa y 123.236 Da (123 KDa), y una región 3'-UTR atípicamente larga (603 nt) que es entre tres y cinco veces mayor que en los otros virus del género *Fabavirus* (Fig. 3.1).

El codón de inicio de la traducción del RNA 2 de LMMV, en posición 172, presenta un contexto (UAU AUG CA) subóptimo para la traducción, y un codón de inicio en posición 593, en un contexto (GAA AUG AA) más apropiado, similar al igual que ocurre en otros fabavirus (Kobayashi y col. 1999). En el RNA 2 de CPMV se ha demostrado, por transcripción *in vitro*, que se expresan dos poliproteínas carboxi-coterminal de distinto tamaño cuando está presente un segundo codón de inicio en una posición y contexto similares (Verver y col. 1991). La poliproteína 2 está compuesta por tres proteínas: A) la proteína de movimiento (MP, 1488 nt, 496 aa, 56 KDa), B) la proteína capsídica grande (LCP, 1206 nt, 402 aa, 44 KDa), y c) la proteína capsídica pequeña (SCP, 597 nt, 198 aa, 23 KDa).

La señal de poliadenilación AAUAAA, presente en la mayoría de los RNA mensajeros de eucariotas (Nevins. 1983), se encontró en las regiones 3'-UTR de los RNAs 1 y 2 de LMMV, aunque no está presente en otros fabavirus.

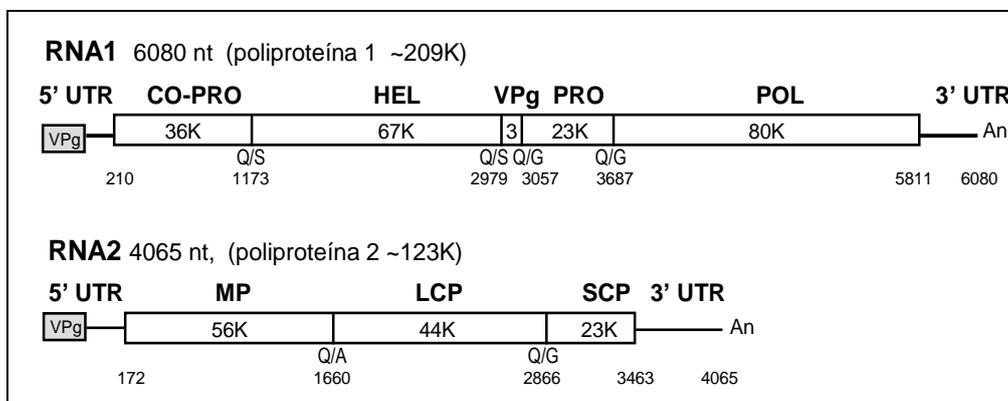


Figura 3.1. Organización del genoma de LMMV. Las líneas horizontales indican las regiones no traducibles, los rectángulos representan las poliproteínas codificadas y las líneas verticales indican los sitios de corte por la proteasa, debajo se indican los dipéptidos reconocidos por la proteasa. Los números dentro de las barras indican el peso molecular aproximado de cada proteína en KDa. Los números inferiores indican la posición nucleotídica. Los rectángulos sombreados representan las proteínas de unión covalente al genoma VPg.

Se estimó un modelo de estructura secundaria de menor energía libre para las porciones terminales 5'-UTR y 3'-UTR del RNA1 y del RNA2 que revelan similitudes entre ellos. Los primeros 21-24 nt de la 5'-UTR del RNA1 y del RNA2 forman una estructura en forma de horquilla, y los últimos 60 nt de la 3'-UTR en ambos RNA forman estructuras similares, con una horquilla seguida del extremo 3'-UTR linearizado (Fig. 3.2). Estas estructuras secundarias están conservadas entre los fabavirus. Se ha demostrado que una horquilla similar en los primeros nt de la region 5'-UTR, conservada entre algunos virus de la subfamilia *Comovirinae*, es una señal de replicación (Goldbach y Wellink. 1996).

Tanto las secuencias específicas como la estructura secundaria de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR de los virus con genoma de RNA de polaridad positiva desempeñan un papel en los mecanismos de replicación y traducción de los mismos, similares a los RNA mensajeros de las plantas (Gallie. 1996).

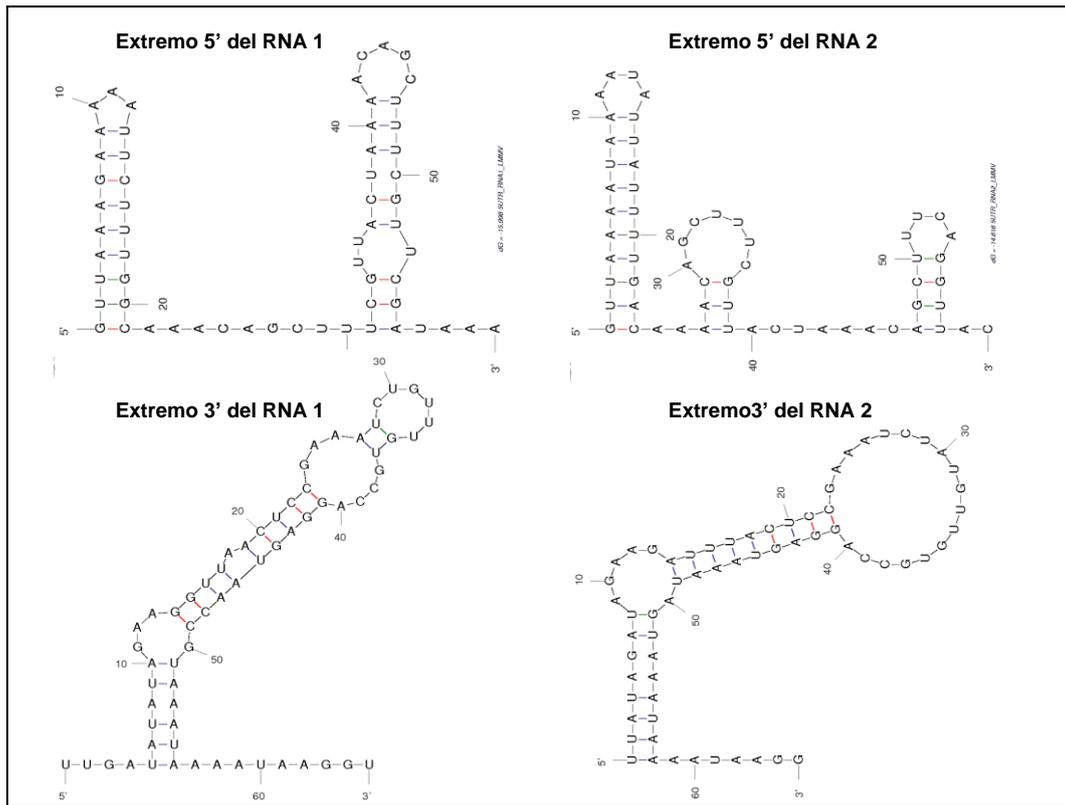


Figura 3.2. Predicción de la estructura secundaria de los extremos 5'-UTR y 3'-UTR de los RNAs 1 y 2 de LMMV.

3.3.2. Descubrimiento de un motivo conservado: seña de identidad del género *Fabavirus*.

Una característica interesante del genoma de LMMV es que presenta un motivo de 10 nt (AACAGCUUUC) en las posiciones 23 a 32, 41 a 50, 60 a 69, 76 a 85 y 90 a 99 del 5'-UTR del RNA 1 y las posiciones 27 a 36, 44 a 53, 63 a 72 y 80 a 89 en el 5'-UTR del RNA 2 (Fig. 3.3). Nuestro análisis mostró que este motivo se encuentra también en todos los aislados de las cinco especies del género *Fabavirus*, mientras que está ausente en otros virus y organismos (Fig. 3.3).

Este motivo puede ser importante en tres aspectos:

A) Funcional. Aunque hasta el presente se desconoce su función, es plausible que este motivo conservado esté implicado en la replicación o expresión del genoma.

B) Taxonómico. Este motivo es una señal de identidad (hallmark) del género *Fabavirus* y su presencia en el genoma de un nuevo virus serviría para asignarlo a este género viral.

C) Diagnóstico. La presencia de varias repeticiones de este motivo en los dos RNAs genómicos podría usarse como diana para la detección y diagnóstico de estos virus por métodos moleculares basados en la RT-PCR y la hibridación molecular (Véase el apartado 5.3.2, página 87).

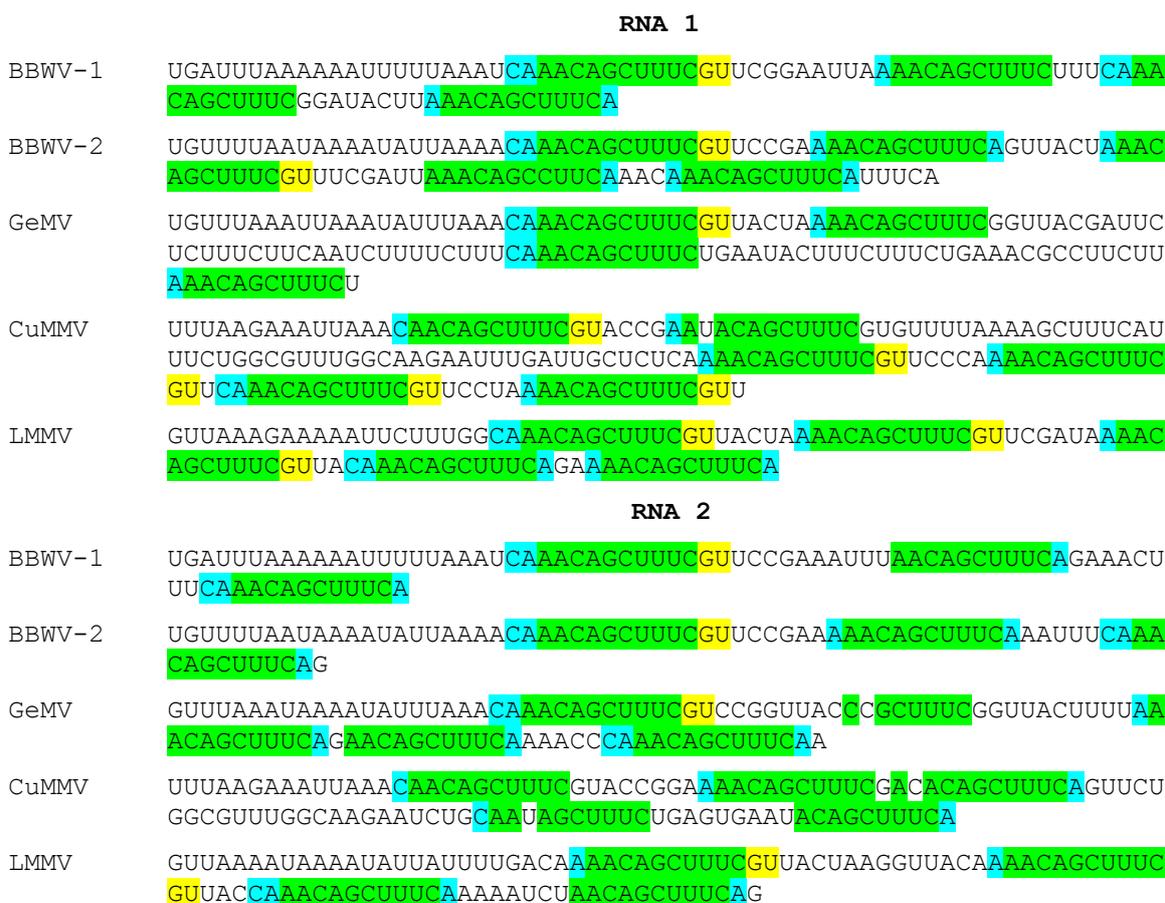


Figura 3.3. Secuencia del extremo 5' de los RNAs 1 y 2 de las cinco especies del género *Fabavirus* indicando las repeticiones de 10 nt en fondo verde y otros nt asociados en fondo amarillo y azul.

3.3.3. Comparación y clasificación taxonómica de LMMV.

La comparación de la secuencia nucleotídica de LMMV con los otros virus del género *Fabavirus* mostró que la región 5'-UTR del RNA 1 de LMMV tenía una identidad nucleotídica aproximada del 75,0 % con la misma región de BBWV1 y BBWV2, y de 43,9 a 51,5 % con GeMV y CuMMV, respectivamente (Tabla 3.2). La región 5'-UTR del RNA 2 de LMMV también presentaba una identidad nucleotídica mayor con BBWV-1 y BBWV-2 (entre 71,9 y 80,9%) que con GeMV y CuMMV (entre 36,0 y 50,6%).

La región 3'-UTR del RNA 1 de LMMV estaba menos conservada que su correspondiente 5'-UTR respecto a BBWV1 y BBWV2, con una identidad nucleotídica entre 39,1 y 42% con BBWV1 y entre 40,6 y 47,8% con BBWV2 (Tabla 3.2). Ésta fue entre 43,5 y 46,4% con GeMV; y 37,7% con CuMMV. La región 3'-UTR del RNA 2 de LMMV presentaba una identidad nucleotídica entre 36,5 y 41,3% con BBWV1, entre 38,1 y 46% con BBWV2, entre 25,4 y 28,6% con GeMV, y 28,6% con CuMMV (Tabla 3.2).

La región del RNA 1 que codifica para la poliproteína 1 de LMMV guarda una identidad nucleotídica entre 55,7 y 58,3% con las demás especies del género, pero varía para las distintas proteínas resultantes del procesado de la poliproteína. Así, la identidad nucleotídica era de 45,1 a 52,6% para Co-Pro; 57,9 a 59,6 % para Hel; de 50 a 67,9% VPg; de 50,6 a 58,6% para Pro, y de 56,6 a 59,5% para Pol. La secuencia del RNA 2 que codifica para la poliproteína 2, mostraba una identidad nucleotídica que va de 52,9 a 54,8 % con las demás especies del género. Dentro de ésta, la identidad nucleotídica fue de 51,8 a 56,2% para MP, de 53,2 a 56,3% para LCP y de 49,2 a 55,6 % para SCP (Tabla 3.2).

La identidad aminoacídica entre LMMV y los otros fabavirus estuvo en un rango entre 46,6 y 51,2% para la proteína 1 y entre 42,6 y 46,4% para la poliproteína 2. Las diferentes proteínas resultantes del procesamiento de las poliproteínas tuvieron un rango de identidad aminoacídica similar (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Identidad nucleotídica y aminoacídica de LMMV con los otros miembros del género *Fabavirus*

Genoma	Region	BBWV-1	BBWV-2	GeMV	CuMMV
RNA1	5'-UTR	74.2-75.8	75.0-78.0	43.9-47.7	51.5
	PP1	56.4-56.7 ^a (51.5-51.9)	55.7-56.8 (52.1-52.8)	56.0-56.3 (52.7-53.2)	58.3 (56.0)
	Co-Pro	47.4-49.0 (37.4-38.5)	45.1-49.0 (34.5-37.9)	46.4-47.8 (35.6-38.6)	52.6 (46.6)
	Hel	58.2-59.3 (54.6-56.0)	58.4-59.6 (55.5-56.4)	57.9-58.5 (55.8-56.4)	59.6 (56.5)
	VPg	59.0-61.5 (50.0-57.7)	50.0-57.7 (44.9 -57.7)	64.1-67.9 (61.5-61.5)	55.1 (50.0)
	Pro	51.5-51.7 (46.2-47.6)	50.6-53.1 (43.3-45.2)	51.2-52.7 (45.2-46.2)	58.6 (52.9)
	RNA Pol	57.7-57.8 (53.4-53.5)	56.6-59.0 (54.9-55.9)	57.4-58.5 (55.8-55.9)	59.5 (58.9)
RNA2	3'-UTR	39.1-42.0	40.6-47.8	43.5-46.4	37.7
	5'-UTR	71.9-75.3	75.3-80.9	36.0-50.6	48.3
	PP2	54.3-54.8 (47.8-49.1)	52.9-54.5 (45.1-47.9)	53.4-54.0 (45.8-47.2)	53.7 (48.9)
	MP	53.1-54.7 (46.6-46.9)	52.5-56.2 (46.6-47.8)	51.8-53.7 (43.5-45.7)	52.5 (49.7)
	LCP	54.7-56.3 (52.5-53.5)	53.2-54.7 (46.0-51.0)	53.8-55.1 (49.8-51.0)	54.6 (50.5)
	SCP	50.6-52.9 (38.1-40.1)	49.2-53.1 (39.5-41.5)	51.0-53.5 (39.5-40.8)	55.6 (44.2)
	3'-UTR	36.5-41.3	38.1-46.0	25.4-28.6	28.6

*Las identidades aminoacídicas están entre paréntesis

Para estudiar la posición taxonómica de LMMV, se consideró la secuencia aminoacídica de dos regiones genómicas usadas para la demarcación de especies (Sanfaçon y col. 2009): A) la secuencia aminoacídica de las dos proteínas capsídicas (LCP + SCP), cuyo criterio es considerar que dos aislados virales son especies distintas cuando tengan una identidad aminoacídica menor que el 75%, y B) la secuencia aminoacídica de la región conservada Pro-Pol, comprendida entre el motivo “CG” de la proteasa y el motivo “GDD” de la polimerasa, cuyo criterio es que la identidad entre especies debe ser menor que el 80%.

Se analizaron las relaciones filogenéticas de LMMV con los otros miembros del género *Fabavirus* y con virus de los otros dos géneros de la subfamilia *Comovirinae*: *Comovirus* y *Nepovirus*. La topología de los árboles filogenéticos fue idéntica para estas dos zonas genómicas con los dos métodos utilizados, por lo que solamente se presentan las relaciones filogenéticas de las proteínas de la cápsida (Fig. 3.4). El árbol filogenético reflejó la clasificación taxonómica de estos virus con alta significancia estadística en los nodos (valores altos de bootstraps).

Se distinguen tres niveles de agrupamientos que corresponden a los niveles taxonómicos:

A) tres clados principales que corresponden a los tres géneros: *Fabavirus*, *Comovirus* y *Nepovirus*, con identidades aminoacídicas entre 33,4 y 47,8%.

B) En el género *Fabavirus* se encontraron cinco subclados que corresponden a las cinco especies de este género: BBWV1, BBWV2, GeMV, CuMMV y LMMV, con identidades aminoacídicas que van de 58,4% a 70,3%.

C) Los distintos aislados para cada especie viral, aunque con valores bajos de bootstrap que impiden determinar el orden de divergencia de estos aislados, presentaban una identidad aminoacídica superior al 88,8%.

Este análisis confirma la situación de LMMV como una especie del género *Fabavirus*.

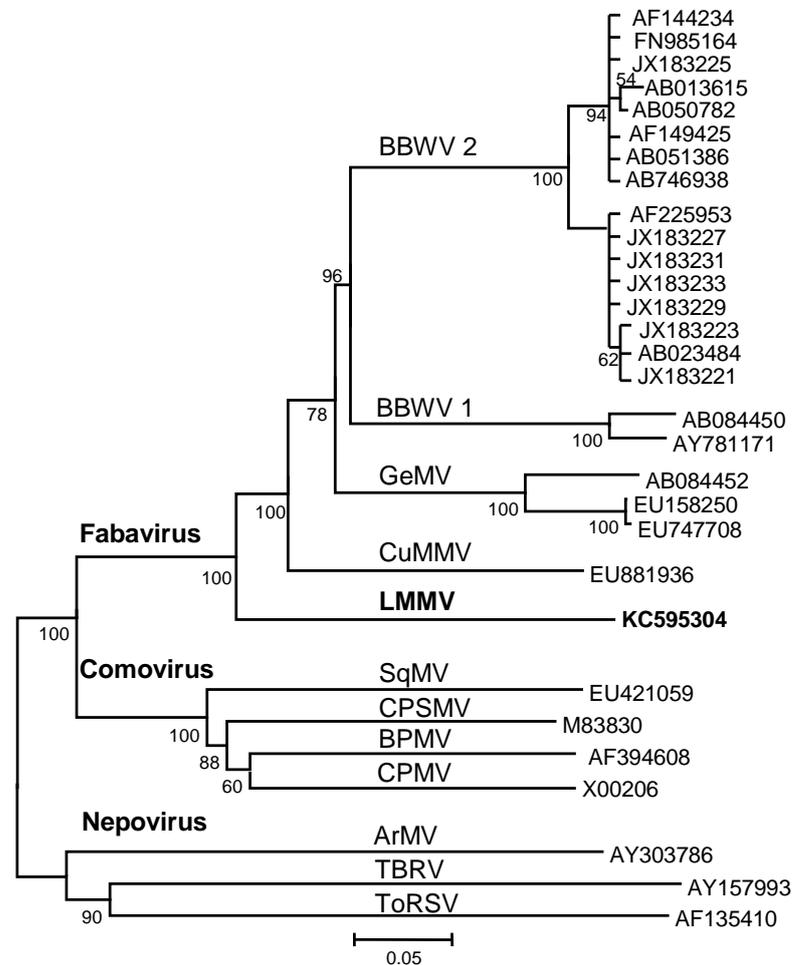


Figura 3.4. Relaciones filogenéticas de las proteínas capsídicas de distintos aislados virales (identificados por el número de acceso del GenBank) pertenecientes a la subfamilia *Comovirinae*. En los nodos, sólo se muestran valores de bootstrap de 50% o superiores.

4. EL GÉNERO *FABAVIRUS*: DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE TODOS LOS FABAVIRUS POR RT-PCR

4.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha indicado, actualmente en el género *Fabavirus* hay descritas cinco especies: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV (véase página 27).

Los métodos tradicionales de diagnóstico para estos virus se basan en ensayos biológicos, mediante observación de síntomas tras la inoculación mecánica de plantas indicadoras o por transmisión por pulgones, y observación de partículas virales con el microscopio electrónico. Sin embargo, estos métodos tienen importantes desventajas como son su poca especificidad, ya que solamente permiten detectar el virus a nivel de género sin identificar la especie viral y pueden confundirse con otros géneros virales, y además son técnicas laboriosas, costosas, lentas y requiere personal altamente cualificado.

La técnica de ELISA tiene la ventaja de ser económica, sencilla y rápida, ya que permite el análisis de muestras a gran escala, habiéndose convertido en el método más común para la detección rutinaria de virus. Actualmente, se comercializan anticuerpos policlonales para BBWV-1 y BBWV-2, aunque se puede producir reacción cruzada. Se han desarrollado anticuerpos para LMMV (Lisa y col. 1982) GeMV (Kobayashi y col. 2005) y CuMMV (Dong y col. 2012), pero no se han comercializado.

Las técnicas basadas en la RT-PCR tienen la ventaja de ser mucho más sensibles y específicas, y además el diseño de iniciadores es rápido y sencillo, permitiendo controlar el nivel de especificidad a nivel de género, especie y cepas o grupos de aislados. Una modalidad, la RT-PCR múltiple (multiplex RT-PCR) con varios pares de iniciadores permite la detección simultánea de varios virus en una sola reacción. Ésta se ha usado para detectar simultáneamente varios virus no relacionados que afectan los mismos cultivos (Bertolini y col. 2003, Meunier y col. 2003, Mortimer-Jones y col. 2009, Sanchez-Navarro y col. 2005, Thompson y col. 2003) y para algunos virus de un mismo género viral (Kumar y col. 2011, Uga y Tsuda. 2005), aunque nunca se ha podido desarrollar para detectar todos los virus de un género.

La determinación de la secuencia del genoma completo de dos aislados de BBWV-1 (Ferrer y col. 2005, Kobayashi y col. 1999, Kobayashi y col. 2003), 16 aislados de BBWV-2 (Ferrer y col. 2011, Ikegami y col. 1998, Ikegami y col. 2000, Koh y col. 2001, Kuroda y col. 2000, Lee y col. 2000, Nakamura y col. 1998, Qi y col. 2000a, Qi y col. 2000b) y tres aislados de GeMV (Kobayashi y col. 2005, Wang y col. 2008), permitió el desarrollo de métodos de diagnóstico más sensibles y específicos para BBWV-1 y BBWV-2 basados en la hibridación molecular (Ferrer y col. 2008) y la RT-PCR en tiempo real (Ferriol y col. 2011). También se intentó desarrollar un método para la detección e identificación simultánea de todos los miembros del género *Fabavirus* mediante RT-PCR con un único par de iniciadores conservados que daban lugar a amplicones de distinto tamaño según la especie viral (Ferrer y col. 2007). Sin embargo, este método solamente funcionó con BBWV-1, BBWV-2 y GeMV, dando un resultado negativo para LMMV del que no había ninguna secuencia nucleotídica disponible en ese momento, mientras que CuMMV se descubrió años más tarde.

La reciente determinación de la secuencia nucleotídica del genoma completo de CuMMV (Dong y col. 2012) y LMMV (Capítulo 3, página 51) abre la posibilidad de desarrollar métodos de detección generales para el género *Fabavirus* y específicos para cada virus de este género. Una dificultad es la elevada diversidad genética (alta divergencia entre los aislados de un virus) observados para BBWV-1, BBWV-2 y GeMV (Ferrer y col. 2011, Ferriol y col. 2013, Kobayashi y col. 1999, Wang y col. 2008) que hay que tener en cuenta para el desarrollo de métodos específicos, para que sean capaces de detectar todos los aislados de una especie viral y así minimizar el número de falsos negativos.

La alta diversidad genética y la falta de información acerca de muchos aspectos biológicos encontrada en algunas especies del género, plantean la necesidad de disponer de métodos de detección simultánea y específica para su incorporación en protocolos de vigilancia sanitaria, efectuar prospecciones para dilucidar aspectos de su distribución geográfica, gama de hospederos y posibles interacciones con otros virus.

En este capítulo se describe el desarrollo de una RT-PCR con iniciadores conservados para el género *Fabavirus* y RT-PCR múltiple para la identificación simultánea de BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV. El

uso combinado de las dos RT-PCRs constituyen un método rápido para la identificación de las especies conocidas y el descubrimiento de nuevas especies que se puedan asignar a este género viral.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Aislados virales.

En este estudio se utilizaron 13 aislados del género *Fabavirus* (Tabla 1): seis aislados de BBWV-1 (Ferriol y col. 2013), cuatro aislados de BBWV-2 (Ferrer y col. 2011) genéticamente diversos, un aislado de GeMV (Kobayashi y col. 2005), un aislado de CuMMV (Dong y col. 2012) y un aislado de LMMV (Capítulo 3, página 51). También se utilizó un aislado del virus de la mancha anular del tabaco (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) del género *Nepovirus* en la subfamilia *Comovirinae*, como control negativo. Estos aislados fueron propagados en diferentes hospederos: *Vicia faba*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* y *Chenopodium quinoa*.

Tabla 4.1. Aislados virales utilizados en esta tesis doctoral.

Género	Virus	Aislado	Hospedador	Origen	Proveedor	
<i>Fabavirus</i>	BBWV-1	Ben	<i>Capsicum annum</i>	España (Castellón)	Dr. Rubio	
		PV-132	<i>Spinacia oleracea</i>	EEUU (Nueva York)	ATCC	
		PV176	<i>Nasturtium sp</i>	Gran Bretaña	ATCC	
		PV0548	<i>Vicia faba</i>	Siria	DSMZ	
		480-3	<i>C. annum</i>	República Checa	Dr. Cervená	
		B41/99	<i>C. annum</i>	Bulgaria	Dr. Kostova	
	BBWV-2	IP	<i>C. annum</i>	Japón	NIAS	
		PV131	<i>Lactuca sativa</i>	EEUU (Nueva York)	ATCC	
		94/1996	<i>Pisum sativum</i>	Sudáfrica	Dr. Jooste	
		PV0550	<i>Gentiana sp</i>	Alemania	DSMZ	
		L1926	<i>Verbena sp.</i>	Holanda	DSMZ	
		GeMV	N-1	<i>Gentiana scabra</i>	Japón	NIAS
		CuMMV	Beijing	<i>Cucurbita moschata</i>	China	Dr. Han
LMMV	PV0454	<i>Lamium orvala</i>	Gran Bretaña (Cambridge)	DSMZ		
<i>Nepovirus</i>	TRSV	PV0236	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EEUU (Maryland)	DSMZ	

ATCC: Colección Americana de cultivos tipo (American type culture collection).

DSMZ: Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur).

NIAS: Instituto Nacional de Ciencias Agrobiológicas de Japón (National Institute of Agrobiological Sciences of Japan).

4.2.2. Extracción de RNA.

El RNA total se purificó a partir de aproximadamente 10 mg de tejido desecado (rehidratado con 8 volúmenes de agua deionizada durante 10 min), o a partir de 50 mg de tejido fresco, utilizando el estuche comercial UltraClean Plant RNA Isolation Kit (MoBio) (véase el apartado 3.2.2.1., página 53).

4.2.3. RT-PCR

La RT está descrita en la sección 3.2.3.2 (página 56). La PCR está descrita en la sección 3.2.3.1 (página 55).

La RT-PCR en un solo paso se realizó añadiendo el RNA desnaturalizado a 20 µl de mezcla de reacción que contenía: tampón de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 0,2 µM of de los iniciadores directo y reverso, 3 U RNase Out (Invitrogen), 15 U Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) y 0,75 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). El perfil térmico fue: RT a 42 °C durante 50 min, desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de amplificación con una desnaturación a 94 °C durante 30 s, anillamiento con un gradiente de temperaturas durante 30 s y enlogación a 72 °C durante 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 4 min.

4.2.4. Clonaje y secuenciación.

Se llevaron a cabo tal como se ha indicado en el apartado 3.2.4 (Página 60).

4.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas.

Para el diseño de iniciadores, se utilizaron todas las secuencias nucleotídicas del genoma completo de los virus del género *Fabavirus* disponibles en la base de datos GenBank. Las secuencias nucleotídicas tanto del RNA1 como del RNA2 se alinearon con el algoritmo ClustalW (Larkin y col. 2007) implementado en el programa Geneious Pro 5.4.6 (Biomatters, New Zealand). El programa MEGA 5,05 (Tamura y col. 2011) se utilizó para el alineamiento de las secuencias por el método CLUSTAL W (Larkin y col. 2007) y la estimación de la distancia nucleotídica (p-distance: proporción de posiciones con distintos nucleótidos entre dos secuencias sin ajustarlas a un modelo de sustituciones nucleotídicas). De esta manera la identidad nucleotídica se calculó como $(1 - \text{distancia}) \times 100$. Los iniciadores para RT-PCR se diseñaron mediante los programas Primer Express 2.0 (Applied

Biosystems, USA) y Vector NTI 9.0 (Invitrogen, USA). Para confirmar la especificidad de los cebadores dentro del género *Fabavirus*, se efectuó un análisis de similaridad nucleotídica contra la base de datos de GenBank utilizando BLASTX (Altschul y col. 1990), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, ajustando los parámetros para la búsqueda de entradas de secuencias cortas.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1. Diseño de iniciadores.

En un primer lugar se intentó desarrollar una única RT-PCR múltiple con seis pares de iniciadores: un par conservado para el género *Fabavirus* y los otros específicos para BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV.

Para el diseño de los iniciadores, se consideraron los siguientes criterios: A) la temperatura de anillamiento de todos los iniciadores debería ser similar, de tal manera que fuese posible el uso de la misma temperatura de anillamiento en la reacción múltiple con todas las combinaciones de cebadores, B) los iniciadores específicos para BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV deberían estar conservados entre los aislados dentro de la misma especie y no reaccionar con los aislados de especies distintas, C) todos los iniciadores deberían ser compatibles en la misma reacción de RT-PCR, para evitar la formación de dímeros entre pares de iniciadores, y D) los productos de RT-PCR esperados deberían ser de diferente tamaño para distinguirlos por electroforesis.

Como ya se ha señalado, una dificultad añadida para el diseño de iniciadores para cada especie fue la gran variabilidad genética entre los aislados de BBWV-1 (Ferriol y col. 2013, Kobayashi y col. 1999), los aislados de BBWV-2 (Ferrer y col. 2011, Kobayashi y col. 1999) y los de GeMV (Kobayashi y col. 2003, Wang y col. 2008) en comparación con otros virus de plantas (Davino y col. 2012a, García-Arenal y col. 2001, Tiberini y col. 2011).

Dada la complejidad mencionada, el análisis *in silico* no encontró regiones genómicas que cumpliesen todos los criterios mencionados. No obstante se diseñaron tres pares de iniciadores específicos para cada especie viral y un par de iniciadores conservados para la detección del género *Fabavirus*. Se comprobó por RT-PCR que que no era posible

utilizar todos los iniciadores a la vez y se tuvieron que utilizar en dos RT-PCRs separadas: A) una RT-PCR para la detección de todos los miembros del género *Fabavirus* empleando un par de iniciadores degenerados y conservados para el género (Tabla 4.2A), y B) una RT-PCR múltiple con cinco pares de iniciadores, cada uno específico para cada una de las cinco especies conocidas del género *Fabavirus* (Tabla 4.2B).

Tabla 4.2. Iniciadores diseñados.

A. Detección general de los virus del género *Fabavirus* mediante RT-PCR simple con un par de iniciadores.

Virus	Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3') ^a	Position RNA2 ^b	Tamaño ^c	GenBank ^d
BBWV-1	FabaF	AAGGCGTGAYTCIGAYTTYGAYGA	1062-1522	460	AF225955
BBWV-2			1138-1628	490	AF225954
GeMV			999-1474	475	AB084453
CuMMV	FabaR	CTCCAACACITCYTIYTCCAT	972-1441	469	EU881937
LMMV			1050-1687	637	KC590305

B. Identificación simultánea de cada virus del género *Fabavirus* mediante RT-PCR múltiple con cinco pares de iniciadores.

Virus	Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3') ^a	Posición (RNA1) ^b	Tamaño ^c	GenBank ^d
LMMV	4157F	AGGAAAGGCCAGATATTTTCGAA	4157	622	KC590304
	4755R	GACGGAGTAAGCATAACGTACCAG	4778		
BBWV1	4758F	TGACACATATGTGGCCATGG	4758	511	AB084450
	5245R	CAGATTCTCAAGTTGGTGACAGG	5267		
GeMV	2497F	ACGATAAACCCCTTAGCGG	2497	370	AB084452
	2846R	CAAATGAAGCTTCTCCTGCAC	2866		
BBWV2	5692F	CAGAGTTCAGTAGTTCCTGCTTATG	5692	237	AB013615
	5907R	GGCATTTCACCCTGCATAATAC	5928		
CuMMV	419F	GAGAAATGATTGTCAGTACTGAGAAGGT	547	98	EU881936
	496R	CACGGGCACTATAGCATAACC	644		

^aSecuencia nucleotídica: C=Citosina, T=Timina, G=Guanina, A=Adenina, I=Inosina, Y= C ó T.

^bLa posición de anillado del extremo 5' de los iniciadores directo y reverso sobre la secuencia del RNA genómico correspondiente.

^cTamaño del amplicón (pares de bases).

^dNúmero de acceso en el GenBank de las secuencias de referencia para ubicar la posición de los iniciadores.

4.3.2. Detección de fabavirus mediante RT-PCR con un par de iniciadores conservados.

La amplificación de las cinco especies de fabavirus con los iniciadores conservados FabaF/FabaR (Tabla 4.2A) solamente se consiguió usando una temperatura de anillamiento baja (50 °C). La RT-PCR en un solo paso dio lugar a un amplicón único del tamaño esperado para cada virus (Fig. 4.1). Los amplicones de BBWV-1, BBWV-2, GeMV y CuMMV, cuyo tamaño variaba entre 460 y 490 nt presentaban una movilidad similar en la electroforesis, mientras que el amplicón de LMMV de 639 nt se distinguía con claridad. No hubo amplificación a partir de extracto de plantas sanas.

El empleo de RT-PCR con iniciadores conservados ha sido también desarrollada para algunos géneros o familias de virus de plantas, como *Torradorivirus* (Verbeek y col. 2012), *Nepovirus* (Wei y Clover. 2008), *Ilarvirus* (Untiveros y col. 2010), *Potexvirus* (van der Vlugt y col. 2002), *Tobravirus* (Jones y col. 2008), y *Begomovirus* (Davino y col. 2008), la subfamilia *Comovirinae* (Maliogka y col. 2004), y las familias *Bromoviridae* (Untiveros y col. 2010) y *Luteoviridae* (Chomič y col. 2010).

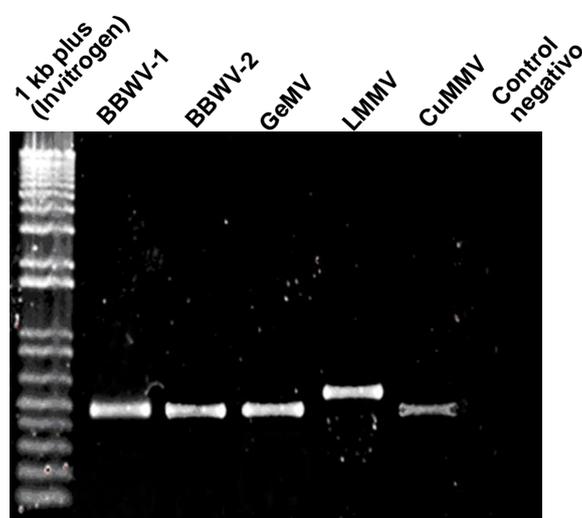


Figura 4.1. Electroforesis de la RT-PCR con los cebadores FabaF y FabaR (Tabla 4.2) para las cinco especies del género *Fabavirus*.

4.3.3. Detección e identificación de los cinco fabavirus mediante RT-PCR múltiple

Puesto que la optimización de las condiciones de amplificación de la PCR múltiple requiere muchos ensayos, primero se realizaron RT-PCR individuales para el aislado Ben de BBWV-1, el aislado IP de BBWV-2 y los aislados de GeMV, CuMMV y LMMV (Tabla 4.1) utilizando su par de iniciadores correspondientes (Tabla 4.2B). Se utilizó un gradiente de temperatura para el anillado y se comprobó que la temperatura óptima para los cinco pares de iniciadores fue 57 °C. Los productos de RT-PCR se clonaron, se comprobaron por secuenciación y se utilizaron como molde en los siguientes ensayos.

Para evaluar la compatibilidad y especificidad de los iniciadores, se realizó una PCR múltiple con los cinco pares de iniciadores para cada uno de los cinco clones por separado. En todos los casos, cada virus solamente se amplificó con su par de iniciadores correspondiente dando lugar a un amplicón único del tamaño esperado mientras que el control negativo no mostró ningún amplicón (Fig. 4.2, carriles 2-7). La PCR múltiple con una mezcla de los cinco clones (correspondientes a las cinco especies de fabavirus) dio lugar a los cinco amplicones esperados con una intensidad similar a la obtenida para cada virus por separado (Fig. 2, carril 1), lo que demuestra que los iniciadores son compatibles.

Para evaluar la sensibilidad relativa para la detección de un virus respecto a los demás, se llevaron a cabo PCR múltiples con mezclas que contenían los clones de las cinco especies en distinta proporción. Para cada virus, se prepararon cuatro mezclas que contenían el virus a una concentración constante (1 ng) y los demás virus en diluciones seriadas (de 10^{-1} a 10^{-4} ng). En todos los casos se pudo detectar cada virus a 10^{-3} ng (datos no mostrados), lo que indica una buena sensibilidad.

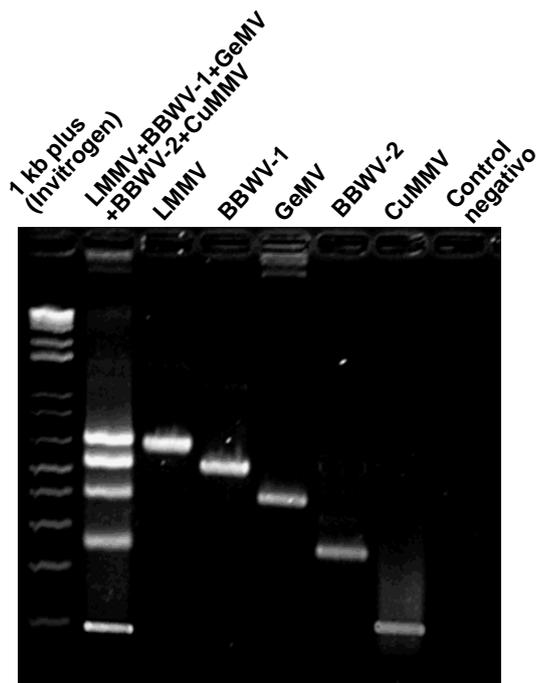


Figura 4.2. Electroforesis de la PCR múltiple con clones correspondientes a BBWV-1, BBWV-2, GeMV, LMMV y CuMMV.

Por último, como no se disponen de muestras con infecciones mixtas de dos especies de fabavirus, se evaluó la RT-PCR múltiple con extractos de RNA correspondientes a distintos aislados virales o a una mezcla de aislados de distintos virus. En todos los casos se generaron los amplicones del tamaño esperado (Fig. 4.3). Se comprobó que todos los aislados de BBWV-1 y BBWV-2 ensayados (Tabla 4.1), a pesar de la baja identidad nucleotídica (~80 %) entre algunos aislados de la misma especie viral (Ferrer y col. 2005, Ferrer y col., Ferriol y col. 2013, Kobayashi y col. 1999, Kobayashi y col. 2003), se amplificaban con los iniciadores específicos de BBWV-1 y BBWV-2.

La detección e identificación de patógenos es una práctica básica para estudios de biología molecular, así como para estudios epidemiológicos y la implementación de procedimientos de control y manejo de enfermedades tales como la cuarentena, erradicación, certificación y mejora genética de plantas para el desarrollo de cultivares resistentes a patógenos. La escasa disponibilidad de técnicas de diagnóstico también ha limitado el estudio de este género y por consiguiente contribuido al poco conocimiento de este grupo de virus, por lo cual su impacto ha sido subestimado.

La combinación de la RT-PCR con iniciadores conservados para el género *Fabavirus* y la RT-PCR múltiple para BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV hace posible la rápida, sensible y fiable identificación de las especies virales del género *Fabavirus* y tiene gran potencial para el descubrimiento de nuevas especies dentro del género.

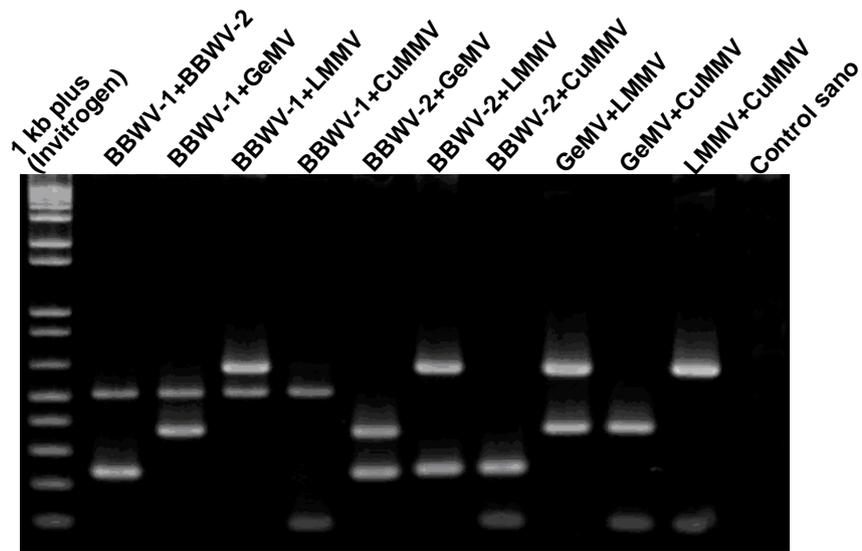


Figure 4.3. Electroforesis de la RT-PCR múltiple a partir de mezclas de extractos de RNA de los cinco fabavirus.

5. EL GÉNERO *FABAVIRUS*: DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE *FABAVIRUS* POR HIBRIDACIÓN MOLECULAR.

5.1. INTRODUCCIÓN.

A lo largo del texto, se han señalado las ventajas de las técnicas moleculares basadas en la RT-PCR o la hibridación molecular sobre las técnicas serológicas para el diagnóstico rutinario y sensible de virus. En el caso del género *Fabavirus*, la técnica de ELISA solamente está disponible para dos de las cinco especies descritas. Además, las técnicas moleculares son más sensibles, más fáciles de desarrollar y permiten un control fino del nivel de especificidad. En el capítulo anterior, desarrollamos un procedimiento para la detección e identificación de todos los virus del género *Fabavirus*, basado en RT-PCR con iniciadores conservados y una RT-PCR múltiple con iniciadores específicos. Las técnicas basadas en la PCR tienen la gran ventaja de que son las más sensibles, pero la hibridación molecular permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras y por tanto es más apropiada para efectuar análisis a gran escala.

Dentro del género *Fabavirus*, se ha desarrollado procedimientos basados en la hibridación molecular con sondas de DNA no radiactivas para la detección de BBWV-1 y BBWV-2 (Ferrer y col. 2008). Esta técnica es efectiva para detectar estos virus no solamente a partir de extractos de RNA (dot-blot hybridization) sino también a partir de improntas de tejido (tissue-print hybridization), lo que ahorra tiempo y trabajo ya que no se necesita extraer el RNA de las muestras (Fig. 5.1). Esta técnica se mejoró mediante el uso de sondas de RNA (ribosondas) no radioactivas, que aprovecha la mayor afinidad de los híbridos de moléculas RNA-RNA, en comparación con los híbridos RNA-DNA, lo que permite la aplicación de condiciones más astringentes, incrementando la especificidad y bajando la señal inespecífica sin perder sensibilidad (Ferriol, 2012). Otra mejora consistió en la aplicación de un sistema de flujo en el proceso de hibridación (Ferriol, 2012). La hibridación convencional está basada en la incubación de las sondas con las muestras fijadas en membranas. La hibridación de flujo (flow-through hybridization), con patente US 6638760, consiste en producir un flujo de las sondas a través de la membrana donde están inmovilizadas las muestras mediante una

presión negativa creada por una bomba de vacío (Fig. 5.1). La hibridación de flujo ofrece como ventajas: A) la optimización de la interacción entre la sonda y la muestra inmovilizada sobre la membrana, que ahora actúa como una matriz tridimensional, B) la significativa reducción del tiempo en el que tiene lugar la hibridación, que va desde unas 12-36 horas en la hibridación convencional, a 30-60 min en la hibridación de flujo, y C) requiere cantidades de sondas y reactivos mucho menores, lo que disminuye los costes (Fig. 5.1).

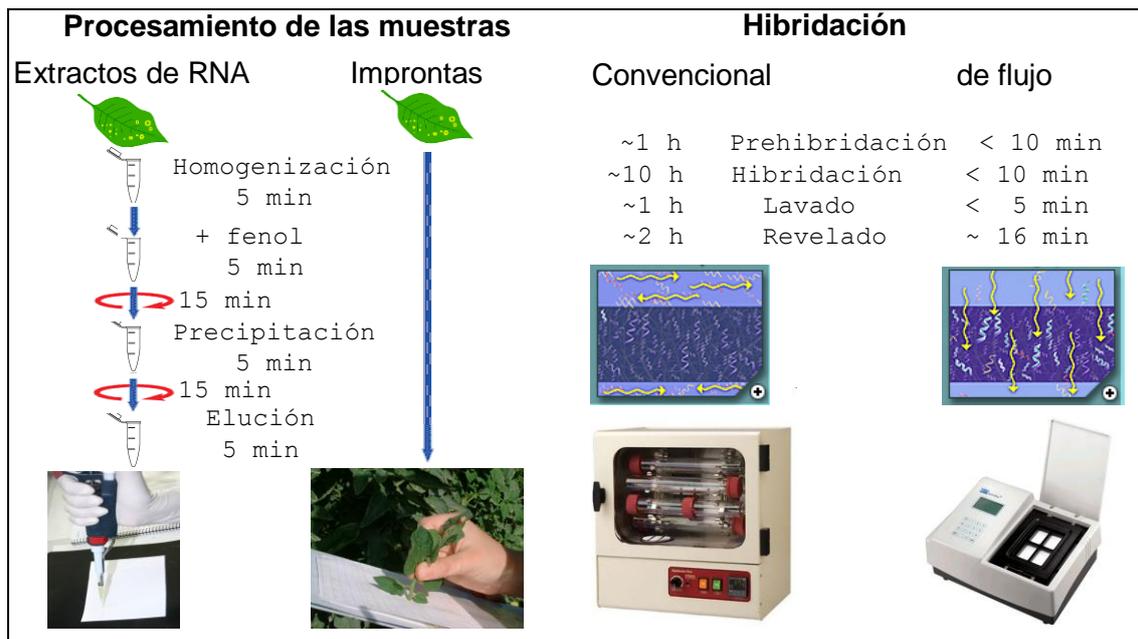


Figura 5.1. Esquema del procedimiento de la hibridación molecular convencional y de flujo para extractos de RNA e improntas vegetales (Ferriol 2012).

La determinación de las secuencias nucleotídicas de los otros miembros del género *Fabavirus*: GeMV (Kobayashi y col. 2005), CuMMV (Dong y col. 2012), y LMMV (véase capítulo 3, página 51) ha posibilitado: A) el desarrollo de sondas para la detección específica de GeMV, CuMMV y LMMV, y B) el desarrollo de una sonda general para el género *Fabavirus* basados en la presencia de varias repeticiones de la secuencia “AACAGCUUUC” encontradas en la region 5'-UTR de los dos RNAs genómicos de las cinco especies conocidas de fabavirus (Véase el apartado 3.3.2, página 64, y la Fig.3.3, página 65). Esta sonda permitiría descubrir nuevas especies del género *Fabavirus* y sería el primer caso descrito en virus de plantas en los que una sonda única se

utilizase para la detección por hibridación molecular de todos los virus de un género.

En este capítulo se ha desarrollado un método basado en la hibridación de flujo para la detección general de todos los miembros del género *Fabavirus* con única sonda y la identificación de las cinco especies conocidas de este género con sondas específicas.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Aislados virales

En este trabajo se han utilizado 10 aislados virales que corresponden a las cinco especies del género *Fabavirus*: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV LMMV, y una especie (TRSV) del género *Nepovirus* (Tabla 4.1, página 71). Algunos aislados virales se inocularon mecánicamente a *Vicia faba*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana megalosiphon* y *N. clevelandii*, que se mantuvieron en un invernadero con malla a prueba de insectos.

5.2.2. Extracción de RNA.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante un protocolo estándar basado en extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol descrito en el apartado 3.2.2.1. (Pag. 53). El extracto de RNA se guardó a -80°C hasta su uso.

5.2.3. Síntesis de las sondas.

5.2.3.1. RT-PCR y clonaje.

El molde para la síntesis de las sondas consistió en productos de PCR obtenidos a partir de clones de cDNA que se habían obtenido a partir de RT-PCR de RNA total de distintos aislados virales (Tabla 4.1, página 71) con tres pares de iniciadores (Tabla 5.1). La RT se llevó a cabo como en la sección 3.2.3.2 pero usando un oligo dT como único iniciador (página 56). La PCR está descrita en la sección 3.2.3.1 (página 55). El clonaje y secuenciación se llevó a cabo tal como se ha indicado en el apartado 3.2.4 (Página 60).

Tabla 5.1. Sondas sin sintetizadas.

Sonda	Virus	Aislado ^a	Position ^b	Iniciadores ^c
Faba _{5'R1}	BBWV-1	Ben	RNA1 (11-363)	Fab5'R1F / Fab5'R1R
BBWV-1 _{MP}	BBWV-1	Ben	RNA2 (1062-1501)	FabaF / FabaR
BBWV-2 _{MP}	BBWV-2	IP	RNA2 (1138-1607)	FabaF / FabaR
GeMV _{MP}	GeMV	N-1	RNA2 (999-1453)	FabaF / FabaR
CuMMV _{MP}	CuMMV	Beijing	RNA2 (972-1420)	FabaF / FabaR
LMMV _{MP}	LMMV	PV0454	RNA2 (1049-1665)	FabaF / FabaR
TRSV _{CP}	TRSV	PV0236	RNA2 (827-1195)	TRSVCPF / TRSVCPR

^aAislado utilizado como molde para la síntesis de las sondas.

^bPosición con respecto a las secuencias del GenBank: AY781171, AY781172, AB018698, AB084453, KC595305, EU881937 y JQ670669.

^cPares de iniciadores usados para la preparación del molde de las sondas por RT-PCR: A) Fab5'R1F / Fab5'R1R: AAATATTAACAAACAGCTTTCGTT / TTCAAAGCTCGTGCCATNTYATTKGC (Ferrer y col. 2007), B) FabaF / Faba R: AAGGCGTGAYTCIGAYTTYGAYGA /CTTCCAACACITCYIYTCCAT (diseñados en el capítulo anterior), y C) TRSVCPF/TRSVCPR: TGTTVTGGGGCCACATCAGAT / CCAGTRGCTGCRACAAGCCA (diseñados en este capítulo).

5.2.3.2. Transcripción *in vitro*: marcaje con digoxigenina

El molde para la transcripción se obtuvo mediante PCR de los clones obtenidos en el apartado anterior utilizando los mismos iniciadores directos, pero una versión modificada de los iniciadores reversos para incluir la secuencia promotora T7 (Tabla 5.1). Los productos de PCR se purificaron con el estuche comercial GFX PCR DNA kit (GE Healthcare). Con el estuche comercial Megascript T7 Kit (Ambion) y el estuche comercial DIG RNA Labeling Mix (Roche), se generaron transcritos de RNA monocatenarios de polaridad negativa marcados con digoxigenina. Para ello, se utilizó como molde 200 ng de amplicón resuspendidos en 5 µl de agua en un coctel de reacción que contenía 8 µl de agua desionizada, 2 µl de una mezcla de 10 x DIG-NTPs (10 mM de ATP, 10 mM de CTP, 10 mM de GTP, 6,5 mM de UTP, y 3,5 mM de DIG-11-UTP, pH 7.5), 2 µl de tampón 10 x tampón, 1 µl de RNase Out, y 2 µl de mezcla enzimática (T7 Enzyme mix 2720G Ambión). La reacción se incubó por un tiempo mínimo de 4 horas a 37 °C y se detuvo agregando 1 µl de EDTA 0,5 M a pH 8,0.

Los transcritos se trataron con 10 U de DNasa libre de RNasa (DNase I RNase free, Roche) para eliminar el DNA contaminante y se purificaron con el estuche comercial Rnaid w/Spin Kit (Q-BIO gene). Para ello se agregó 3 volúmenes de "RNA binding salt" a la reacción de transcripción y se mezcló

por pipeteo. Seguidamente se añadió 1-2 µl de resina “RNAMATRIX” por cada 1 µg de RNA (mínimo 5 µl de resina), se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, mezclando periódicamente para mejorar la adsorción del RNA a la matriz de la resina. Luego se centrifugó por un minuto a máxima velocidad en una microcentrífuga y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 500 µl de “RNA wash solution” resuspendiéndolo con la punta de una pipeta y centrifugando a máxima velocidad por un minuto. Finalmente, el precipitado fue resuspendido cuidadosamente en 20 µl de agua desionizada estéril y colocado en incubación a 50 °C por tres minutos. Se centrifugó una vez más a máxima velocidad por un minuto y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo.

5.2.3.3. Evaluación de las sondas: concentración y marcaje.

La calidad y concentración de RNA se estimó con el espectrofotómetro nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Inc) y mediante electroforesis en geles de agarosa libre de RNasas, al 1% en TAE 1X a 100 V durante 30 min, usando como marcador de peso molecular, un carril con real marker (Durviz), que tiene bandas de diferentes pesos moleculares a concentraciones pre-establecidas.

Para evaluar la eficacia del marcaje (incorporación de DIG-UTP en las sondas) se puso un µl de diluciones seriadas decimales (desde 10^{-1} a 10^{-4}) de los transcritos marcados en una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) y se fijaron por irradiación con luz ultravioleta a 120 mJ/cm² en un horno cross-linker UV (CL-1000, UVP). Se fijaron también diluciones seriadas decimales de una sonda de concentración conocida y marcaje satisfactorio en ensayos previos como control positivo. La membrana es procesada de la misma manera que un ensayo típico de hibridación, pero a partir de los pasos de lavado posteriores a la hibridación, y se revelaron con sustrato cromogénico. Los detalles del ensayo se explican en el apartado siguiente.

5.2.4. Hibridación de flujo.

Las muestras se prepararon mediante aplicación de un µl de extracto de RNA total a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) y fijación por irradiación con luz ultravioleta a 120 mJ / cm².

El protocolo de la hibridación de flujo se llevó a cabo en un aparato denominado Hybrimax (HybriBio Limited) que aplica una presión negativa

mediante una bomba de vacío, de manera que las soluciones fluyen a través de la membrana de nylon. De esta manera se reduce el volumen de cada solución a 0,125 ml por cada cm² de membrana, justo para cubrir la membrana, y también se reduce el tiempo de cada paso del protocolo entre 30 y 60 s.

La prehibridación y la hibridación se realizaron a 68 °C en el Hybrimax con tampón ULTRAhyb (Ambion) y 20 ng de sonda por cada ml de tampón.

El lavado de las membranas se hizo en el Hybrimax, dos veces con 2 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7,0) y 0,1% SDS, y dos veces más con 0,1 x SSC y 0,1% SDS at 68°C. Los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente.

Para el revelado de la hibridación, se equilibraron las membranas con tampón maleato-tween (100 mM de ácido maleico y 150 mM de ClNa pH 7,5) y 0,3% (v/v) Tween 20), y luego otro lavado sólo con tampón maleato. Para evitar uniones inespecíficas en las membranas, se añadió tampón maleato con 1% (p/v) de agente bloqueante (Roche). Seguidamente se añadieron anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) (0.75 U/ μ l) diluidos en tampón maleato a la proporción 1:5.000, cuando se efectuó el revelado con substrato cromogénico, y 1:10.000 cuando se efectuó el revelado con substrato quimioluminiscente.

Las membranas se lavaron sucesivamente con tampón maleato-tween y luego con tampón maleato. Finalmente, se agregó una pequeña cantidad de tampón de detección compuesto de 100mM Tris/HCl, 100mM NaCl, pH 9,5. Todo ello se llevó a cabo en el Hybrimax.

Revelado con substrato cromogénico. Las membranas se mantuvieron en tampón de detección, el revelado se hizo directamente sobre la membrana, agregando el sustrato NBT/BCIP, a razón de 20 μ l de solución stock comercial de NBT/BCIP por ml de tampón de detección. La membrana se incubó en la oscuridad y sin agitación. La reacción se detuvo luego de 16 horas con tampón TE 1X y quedó lista para su lectura.

Revelado con substrato quimioluminiscente. Las membranas se mantuvieron en tampón de detección en una bandeja, se sacaron y se aplicó substrato quimioluminiscente, CDP-star (Roche) diluido 1/100 en tampón de detección, distribuyéndolo de manera uniforme y eliminando el exceso. En un

cuarto oscuro se colocó una película (Kodak®, BioMax MR Film) sobre la membrana y se dejó incubar dentro de un cassette para autorradiografía (Kodak® BioMax MS Exposure Cassette/Intensifying Screen Set) a 37 °C durante 10 o 20 minutos y tras lo cual se reveló la película manualmente con una solución reveladora (Kodak® autoradiography GBX developer, 190 0943), y otra fijadora (Kodak® autoradiography GBX fixer, 190 1875).

5.2.5. Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Para evaluar la especificidad de la hibridación, se calculó la identidad nucleotídica entre las sondas y las muestras (porcentaje de posiciones con el mismo nucleótido). Las secuencias nucleotídicas se determinaron en trabajos previos y están depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso: AB084450, AB084453, AB018698, AB023484, AY78171, AY78172, EU881936, EU881937, JF440076, JQ670669, JX304792, HQ602948, HQ602951, HQ602956, HQ602959, KC595304 y KC595305. El programa MEGA 5,05 (Tamura y col. 2011) se utilizó para el alineamiento de las secuencias por el método CLUSTAL W (Larkin y col. 2007) y la estimación de la distancia nucleotídica (p-distance: proporción de posiciones con distintos nucleótidos entre dos secuencias sin ajustarlas a un modelo sustituciones nucleotídicas). De esta manera la identidad nucleotídica se calculó como $(1 - \text{distancia}) \times 100$.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.3.1. Diseño de las sondas.

En este trabajo se tuvo en cuenta la variabilidad genética dentro y entre especies virales del género *Fabavirus*, y entre este género viral y otros virus (Tabla 5.2) para diseñar sondas con dos niveles de especificidad: género y especie viral, y para evitar o minimizar los falsos positivos en plantas infectadas con otros virus.

Para la detección a nivel de género, se diseñó la sonda general Faba5'R1 para que hibride con todos los aislados del género *Fabavirus* y no hibride con otros virus. El problema es que la identidad nucleotídica a lo largo del genoma entre especies virales de cualquier género viral es muy baja para conseguir que una misma sonda pueda hibridar con varios virus. Por esta razón nunca se ha desarrollado un método de hibridación que permita detectar distintas especies pertenecientes a un mismo género viral, aunque se ha logrado para

un género de viroides (Jiang y col. 2013). En el género *Fabavirus* la identidad nucleotídica entre especies fue menor del 75% (Tabla 5.2). Sin embargo en las regiones 5'-UTR del RNA 1 y el RNA 2 de todos los fabavirus hay un motivo de secuencia (AACAGCUUUC) con varias repeticiones perfectas o imperfectas que no están presentes en otros virus ni otros organismos (Fig. 3.3, página 65). Para probar si la repetición de este motivo de secuencia posibilita la hibridación de una sonda con los RNAs 1 y 2 de varias especies de fabavirus, se sintetizó una sonda a partir del RNA 1 (posición 11-364 del aislado Ben de BBWV-1 (Tabla 4.1, página 71) que contenía el motivo repetido y se denominó Faba_{5'R1} (Tabla 5.1). Así mismo, se diseñó la sonda TRSV_{CP} que es específica de TRSV del género *Nepovirus* para usarlo como control negativo del género *Fabavirus*, ya que ambos géneros están relacionados al pertenecer a la subfamilia *Comovirinae* (Sanfaçon y col. 2009).

Para la detección a nivel de especie, se diseñaron las sondas BBWV1_{MP}, BBWV-2_{MP}, GeMV_{MP}, CuMMV_{MP} y LMMV_{MP}. (Tabla 5.1). Como se ha mencionado en el capítulo anterior, una gran dificultad para conseguir que cada sonda hibride con todos los aislados de la especie viral (de la cual se ha obtenido la sonda) es la gran variabilidad genética que se ha encontrado dentro de algunas especies de fabavirus (Ferrer y col. 2011, Ferriol y col. 2013, Kobayashi y col. 2003, Kobayashi y col. 1999, Wang y col. 2008) en comparación con otros virus de plantas (Davino y col. 2012a, García-Arenal y col. 2001, Tiberini y col. 2011). La identidad nucleotídica entre aislados de la misma especie en esta región genómica del RNA2 (que codifica la proteína del movimiento), puede llegar a ser tan baja como un 83% mientras que entre virus puede ser tan alta como un 71 % (Tabla 5.2.). De manera que estos son los límites para conseguir que cada sonda hibride con todos los aislados de la especie viral (evitar falsos negativos) y no hibride con aislados de otras especies virales (evitar falsos positivos).

Para ensayar la hibridación molecular de flujo se eligieron como muestras extractos de RNA de aislados representativos del género *Fabavirus*: tres aislados de BBWV-1 y tres aislados de BBWV-2 que eran genéticamente diversos (Ferrer y col. 2011, Ferriol y col. 2013), y el único aislado disponible de GeMV, CuMMV y LMMV (Tablas 4.1 y 5.1). Se eligió un aislado de TRSV del género *Nepovirus* como un control negativo del género *Fabavirus*.

Tabla 5.2. Identidad nucleotídica entre sondas y muestras.

Muestras		S o n d a s							
Especie	Aislado	Faba _{5'R1}		BBWV1 _{MP}	BBWV2 _{MP}	GeMV _{MP}	CuMMV _{MP}	LMMV _{MP}	TRSV _{CP}
		5'UTR	Cod	Cod	Cod	Cod	Cod	Cod	Cod
BBWV-1	Ben	100.0	100.0	100.0	64.4	66.0	59.7	60.7	17.7
	PV132	89,5	87.0	83.2	62.3	65.4	63.4	56.5	19.4
	PV-0548	92,6	93.5	95.3	64.9	67.0	60.7	61.8	17.7
BBWV-2	IP	64,2	48.6	64.4	100.0	71.2	65.4	59.2	21.0
	PV131	60,0	52.9	61.8	84.8	69.1	59.7	58.1	19.4
	PV0537	60,0	51.4	63.9	83.8	69.1	58.1	57.6	17.7
GeMV	N-1	40,0	50.7	66.0	71.2	100.0	61.8	59.7	16.1
CuMMV	Beijing	25,3	44.9	59.7	65.4	61.8	100.0	56.0	17.7
LMMV	PV0454	47,4	44.2	60.7	59.2	59.7	56.0	100.0	14.5
TRSV	PV0236	27,4	32.6	17.7	21.0	16.1	17.7	14.5	100.0

5'UTR: region no traducida del extremo 5', Cod: región codificante.

Las reacciones positivas entre sondas y muestras están sombreadas.

5.3.2. Detección de todos los fabavirus mediante hibridación con una única sonda.

En un trabajo previo, con una sonda de DNA que correspondía a la misma zona genómica y aislado de BBWV-1 que la sonda de RNA Faba5'R1, sintetizada en este trabajo (Tabla 5.2), se comprobó que solamente reaccionaba con aislados de BBWV-1 y no con aislados de BBWV-2 (FERRER GUAL 2010, Ferrer y col. 2008). En este trabajo se ensayaron varias condiciones de hibridación con esta sonda de RNA (datos no mostrados) y se encontró que era necesario una temperatura de hibridación a 68 °C y lavados de alta astringencia (véase el apartado 5.2.4, página 83) para que no hubiera ruido de fondo con extractos de planta sana.

La hibridación de flujo con la sonda de RNA Faba_{5'R1} dio una fuerte reacción con todos los aislados del género *Fabavirus* (BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV) mientras que no dió ninguna señal con el aislado de TRSV ni con extractos de plantas sanas (Fig. 5.2). La falta de reacción con TRSV del género *Nepovirus*, que es uno de los grupos mas relacionados con los fabavirus, nos asegura que esta sonda no va a reaccionar con otros virus y dar lugar a falsos positivos. La sonda TRSV_{CP} dio una fuerte señal con el aislado viral de TRSV, mientras que no reaccionó con ninguno de los fabavirus

ni con los extractos de plantas sanas, de esta manera se tiene la seguridad que la reacción negativa entre la sonda Faba_{5R1} y el aislado de TRSV se debe a una baja identidad nucleotídica y no a la mala calidad o baja concentración del RNA viral de TRSV.

Este resultado demuestra que la sonda permite una detección universal y simultánea de todos los miembros del género *Fabavirus* y específica para este género. Esta es la primera vez que se consigue una sonda que hibrida con todos los virus de un género viral. Aunque se ha conseguido la detección simultánea de varias especies virales mediante hibridación con una combinación de sondas o polisondas (Aparicio y col. 2009, Herranz y col. 2005, Minutillo y col. 2012, Saade y col. 2000, Sánchez-Navarro y col. 1999), la utilización de una sonda universal para un grupo taxonómico tiene la ventaja de posibilitar el descubrimiento de nuevas especies virales dentro de dicho grupo.

5.3.3. Detección e identificación de los cinco fabavirus mediante hibridación con sondas específicas.

La sonda BBWV1_{MP} hibridó solamente con los tres aislados de BBWV-1 y la sonda BBWV2_{MP} con los tres aislados de BBWV-2, mientras que no se produjo ninguna reacción con el resto de muestras (Fig. 5.2). Esto demuestra que estas sondas se pueden utilizar para una detección universal de todos los aislados de estos dos virus a pesar de su alta divergencia genética (evita o minimiza falsos negativos) y es específica para cada especie viral (evita o minimiza falsos positivos). En este caso también se encontró una diferencia del nivel de especificidad entre sondas de RNA y DNA sobre la misma zona genómica. En un trabajo previo se observó que una sonda de DNA obtenida de la misma zona genómica (la región que codifica la proteína del movimiento) reaccionaba solamente con un grupo de aislados de BBWV-1, dependiendo de si el aislado del cual se obtuvo la sonda tenía una identidad nucleotídica mayor que 85 % (Ferrer y col. 2008). Por tanto, se constata que las sondas de RNA amplían el espectro de detección con respecto a las sondas de DNA sin perder especificidad. Las sondas GeMV_{MP}, CuMMV_{MP} y LMMV_{MP} reaccionaron solamente con extractos de GeMV, CuMMV y LMMV, respectivamente (Fig. 5.2), demostrando también especificidad a nivel de especie. Por lo tanto, las cinco sondas pueden usarse para la detección e identificación de las cinco especies conocidas del género *Fabavirus*.

En un trabajo previo se comprobó que la hibridación de flujo tenía la misma sensibilidad que la hibridación convencional, de manera que se podía analizar improntas de tejido vegetal preparadas en campo (Ferriol, 2012). La gran rapidez de la hibridación de flujo (duración menor a una hora) y el análisis de improntas que ahorran el procesamiento de muestras hace que esta sea la técnica de detección más rápida. Con el trabajo realizado aquí, la hibridación de flujo se puede utilizar para analizar un elevado número de muestras en un periodo de tiempo extraordinariamente corto para detectar e identificar las cinco especies conocidas del género *Fabavirus* y descubrir nuevas especies dentro de este género.

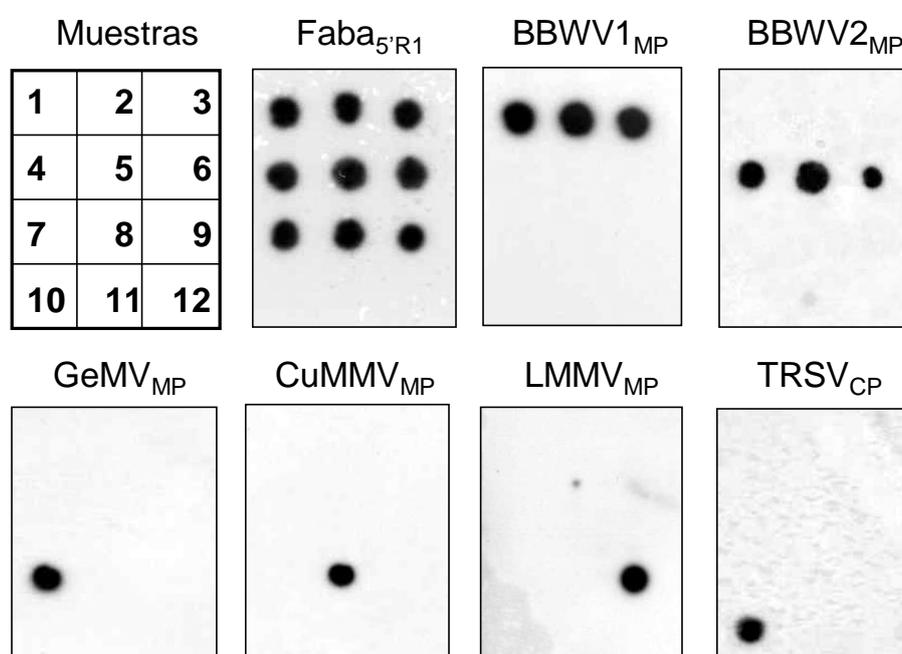


Figura 5.2. Hibridación de flujo de muestras de RNA (Tabla 4.1): aislados Ben, PV132 y PV0548 de BBWV-1 (cuadros 1, 2 y 3), aislados de BBWV-2 IP, PV131 y L1926 (4, 5 y 6), GeMV (7), CuMMV (8), LMMV (9), TRSV (10) y plantas sanas de pimiento y haba (11 y 12) con las sondas Faba_{5'R1}, BBWV1_{MP}, BBWV2_{MP}, GeMV_{MP}, CuMMV_{MP}, LMMV_{MP} y TRSV_{CP} (Tabla 5.1).

Esto es particularmente útil para el estudio de un género que ha sido escasamente caracterizado, del cual dos de sus especies están dispersas alrededor del mundo, y presentan una amplia gama de hospedantes que afectan numerosos cultivos de interés agrícola. Además, se dispone de escasa información biológica para las restantes tres especies que lo componen y que

han sido identificadas hasta el presente (GeMV, LMMV y CuMMV), de las que hay muy pocos aislados disponibles y que probablemente no reflejan la diversidad genética de estas especies. La técnica de hibridación molecular puesta a punto en este trabajo, ofrece los atributos de rapidez, especificidad y sensibilidad apropiada, así como bajo coste y facilidad de ejecución para efectuar prospecciones extensivas y rutinarias. Estas características le convierten en una opción de aplicación factible en países en vías de desarrollo.

6. RIBOVIRUS IMPORTANTES EN TOMATE: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ToMV

6.1. INTRODUCCIÓN.

Como ya se ha mencionado, para el desarrollo de métodos moleculares de diagnóstico de los virus es necesaria su caracterización molecular. Anteriormente, se ha descrito el diagnóstico para los miembros del género *Fabavirus* basados en la RT-PCR (Capítulo 4, página 69) y la hibridación molecular (Capítulo 5, página 79). Para el diseño de estas técnicas se tuvo en cuenta la composición genética de los cinco virus que actualmente están descritos dentro de este género: BBWV-1, BBWV-2, GeMV, CuMMV y LMMV. Puesto que LMMV era el único de estos virus que no estaba caracterizado molecularmente, fue necesario determinar su secuencia nucleotídica (Capítulo 3, página 51).

En el capítulo siguiente a este (Capítulo 7, página 103) se describe el desarrollo de un método basado en la RT-PCR para detectar los siete virus, con genoma de RNA (ribovirus), de mayor importancia económica en cultivos de tomate de la cuenca del Mediterráneo y otras áreas subtropicales: CMV, TSWV, ToMV, ToCV, TICV, PepMV y ToTV (descripciones de estos virus están en el Capítulo 1, páginas 31-46). Actualmente se dispone de información sobre la variabilidad genética y los factores evolutivos implicados de todos estos virus: CMV (Davino y col. 2012b, Lin y col. 2004, Roossinck y col. 1999, Roossinck 2002, Sacristán y col. 2004), TSWV (López y col. 2011, Tentchev y col. 2011, Tsompana y col. 2005), ToTV (Alfaro-Fernández y col. 2010), ToCV (Lozano y col. 2009, Rubio y col. 2013, Wintermantel y Wisler 2006), TICV (Rubio y col. 2013), y PepMV (Gómez y col. 2012, Pagán y col. 2006), excepto de ToMV. Por ello, en este capítulo se ha planteado el estudio de la diversidad genética y los mecanismos evolutivos del ToMV.

ToMV pertenece al género *Tobamovirus* de la familia *Virgaviridae*. Los viriones son filamentos rígidos y el genoma codifica para dos proteínas implicadas en la replicación, la proteína de movimiento y la proteína de la cápsida (King y col. 2011b). Este virus está distribuido por todo mundo y causa graves daños en tomate y otros cultivos, principalmente de la familia *Solanaceae*. Los viriones pueden permanecer infectivos por varios años en

restos secos de plantas, y pueden ser transmitidos a otras plantas por contacto mecánico y a través de semillas (Broadbent. 1976). Información más detallada de este virus se encuentra en el apartado 1.6.4 (Página 37).

ToMV, como todos los virus con genoma de RNA, tiene un gran potencial para evolucionar rápidamente y generar poblaciones con gran diversidad genética (Domingo y Holland. 1997). La caracterización de la estructura y diversidad genética de poblaciones de ToMV es necesaria para entender su evolución y epidemiología, desarrollar métodos moleculares de diagnóstico, así como diseñar y aplicar estrategias específicas para el control de la enfermedad (Acosta-Leal y col. 2011, Moya y col. 2004).

En este capítulo, se ha estudiado la estructura y diversidad genética de la población mundial de ToMV, así como los mecanismos evolutivos implicados, mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína de la cápsida (CP).

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Aislados virales.

En total se analizaron 75 aislados del ToMV recolectados por las Dras. Isabel Font San Ambrosio (Universidad Politécnica de Valencia) y Marisol Luis Arteaga (Centro de Investigación y Tecnología Agraria, de Aragón). Se determinó las secuencias nucleotídicas del GPC de 29 aislados de ToMV procedentes de campos de pimiento o de tomate de diferentes provincias de España: Almería (9 aislados), Barcelona (3), León (1), Murcia (9), uno de Valencia (1), Vizcaya (2) y Zaragoza (4) a partir de muestras colectadas por las Dras. Isabel Font San Ambrosio y Marisol Luis Arteaga.

De la base de datos GenBank, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas del gen de la CP de 46 aislados del ToMV procedentes de diferentes cultivos (tomate, pimiento, berenjena, lila, camelia, cornejo, abeto rojo, etc.) y fuentes naturales de agua (arroyos, glaciares y lagos) de diferentes países: Alemania (4 secuencias con los números de acceso AJ429083, AJ428084, AJ428085, AJ428086), Brasil (11 secuencias: AM411425-AM411432, AF411922, AY063743 y DQ230836), China (8: AJ417701, AJ011934, AJ0132845, AY313136, DQ661035, GQ280794, FN985165 y Z98201), Corea (2: EU885417 y HM623426), Groenlandia (6: AF067229, AF067233, AF067237, AF067239, AF067250 y AF067252), Irán (4: HQ593624-

HQ593627), EEUU (6: AF067230, AF067234, AF067241, AF067242, AF067248 y AF067249), Kazajstán (3: AJ243571, AJ310339 y Z92909), Malasia (1: AF067236), y Taiwán (1: AY383730). También se utilizó la secuencia del gen de la CP de TMV (número de acceso del GenBank: V01408) como referencia externa a ToMV (outgroup), ya que ambos virus pertenecen al género *Tobamovirus*.

6.2.2. Extracción de RNA

Se homogenizaron 0,5 g de tejido foliar en una bolsa plástica con 10 volúmenes de tampón de lisis, compuesto de Isotiocianato de Guanidina 4 M, acetato de sodio 0,2 M y pH 5,0, EDTA2-Na 25 mM, 2,5% (p/v) de PVP-40, al que se agregó 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol justo antes de usar. Para la purificación del RNA total se utilizó el estuche comercial *RNeasy Plant Mini Kit* 74904 (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.2.3. RT-PCR.

Se utilizaron los cebadores ToMVspec (dir): 5'-CGGAAGGCCTAAACC AAAAAG-3', y Tob-Uni1 (rev): 5'-ATTTAAGTGGASGGAAAIVCACT-3', que flanquean por completo el gen que codifica la CP (Letschert y col. 2002). Para ello, se colocó 0,2 μ M de cada cebador, 1,0 μ l de extracto de RNA y 3 μ l de agua desionizada en un tubo, y se desnaturalizaron a 80°C x 5 minutos, incubando inmediatamente después en hielo otros cinco minutos para añadir el resto de la mezcla de reacción, que consistió en 2,0 μ l de tampón 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 40 U de Superscript II (Invitrogen), 0,1 μ l Rnase Out (Invitrogen) y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), ajustada a 15 μ l. Luego de mezclar el RNA y los cebadores con la mezcla de RT-PCR en un tubo, la RT-PCR se realizó en un solo tubo siguiendo el siguiente programa: un ciclo a 42°C durante 45 min, un ciclo a 94°C durante 3 min, 35 ciclos que incluyen 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y un ciclo final de 72°C durante 5 min. Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, y teñido con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, de la forma como ha sido descrito en el apartado 3.2.3.1 (página 55).

6.2.4. Secuenciación.

Los productos de RT-PCR se purificaron con el estuche comercial *UltraClean® 15 DNA Purification Kit*, 12100-300 (MoBio). Las secuencias nucleotídicas se determinaron en ambos sentidos utilizando un secuenciador *ABI PRISM DNA sequencer 377* (Perkin-Elmer) y se depositaron en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) con los números de acceso de JF810425 a JF810439 y de JN381931 a JN381944.

6.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas.

El programa MEGA 5.05 (Tamura y col. 2011) se utilizó para varios análisis:

A) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen de la CP de 75 aislados de ToMV usando el algoritmo CLUSTAL W (Larkin y col. 2007) considerando los codones para mantener la pauta de lectura, esencial para análisis posteriores.

B) Estimación de la distancia nucleotídica entre aislados de ToMV (d, número de sustituciones nucleotídicas por posición nucleotídica). Para ello se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-3 parámetros (Tamura. 1992), por ser el que mejor se ajusta a estas secuencias nucleotídicas según el criterio de Akeike, corregido (Nei y Kumar. 2000). Este modelo asume que la ocurrencia de transiciones es mayor que la tasa de transversiones y que la proporción del contenido de GC \neq 0,5.

C) Estimación de la diversidad nucleotídica (π) como el promedio de la distancia nucleotídica entre pares de aislados de ToMV.

D) Estimación del número de sustituciones sinónimas (S) por sitio sinónimo y el número de sustituciones no sinónimas (N) por sitio no sinónimo con el método de Pamilo-Bianchi-Li (Li 1993, Pamilo y Bianchi 1993).

E) Inferencia de las relaciones filogenéticas del gen de la CP de los 75 aislados de ToMV mediante el método del vecino mas próximo (neighbor joining) y de máxima verosimilitud (maximum likelihood, ML) (Nei y Kumar. 2000). La significancia estadística de los nodos se realizó con la prueba de simulación de agrupamientos (bootstrap test) con 1000 repeticiones (Efron y col. 1996). La raíz del árbol filogenético se calculó usando la secuencia del gen de la CP del virus del mosaico del tabaco TMV como outgroup.

El programa DnaSP5.10 (Librado y Rozas. 2009) se utilizó para los siguientes análisis:

A) Estimación de la diferenciación genética y el grado de flujo genético entre subpoblaciones de ToMV que ocupan áreas geográficas distintas. Para determinar si dos subpoblaciones están o no genéticamente diferenciadas, se utilizaron tres estadísticos basados en datos de secuencias (distancias nucleotídicas): K_s^* , Z^* (Hudson y col. 1992) y S_{nn} (Hudson. 2000). K_s^* , Z^* son los estadísticos mas potentes para detección de diferencias genéticas entre subpoblaciones de pequeño tamaño muestral y alta tasa de variación, mientras que S_{nn} es mas adecuado para subpoblaciones de pequeño tamaño muestral y baja variación genética (Hudson. 2000). F_{st} , es otro estadístico utilizado para cuantificar el flujo genético entre subpoblaciones (Weir y Cockerham. 1984). Subpoblaciones no diferenciadas muestran valores de F_{st} cercanos a cero (flujo genético total), mientras que subpoblaciones completamente diferenciadas mostrarán valores cercanos a uno (poblaciones aisladas con ningún flujo de genes entre ellas). Se considera que un valor de $F_{st} > 0.33$ indica un flujo genético bajo que puede producir una diferenciación genética incipiente de las subpoblaciones (Wei y col. 2009).

B) Pruebas estadísticas basadas en la hipótesis de evolución neutral (sin selección natural y en poblaciones virales grandes sin grandes cambios en su tamaño). Se utilizó el estadístico D de Tajima (Tajima. 1989) y los estadísticos D^* y F^* de Fu y Li (Fu y Li. 1993) con una significancia estadística de $\alpha=0.05$ y 1000 réplicas en una simulación coalescente. El estadístico D de Tajima evalúa la relación entre el número de sitios polimórficos y la diversidad nucleotídica. El estadístico D^* de Fu y Li, evalúa la relación entre el número de mutaciones únicas por sitio en las secuencias que componen la muestra (singletons) y el número total de mutaciones. El estadístico F^* de Fu y Li, evalúa la relación entre el número de singletons en la muestra, y la diversidad nucleotídica. La selección natural por fijación de mutaciones ventajosas (positiva o adaptativa), o eliminación de mutaciones deletéreas (estabilizadora, negativa o purificadora) produciría un exceso de variantes virales de baja frecuencia que conllevaría a valores negativos de los estadísticos; aunque esto también puede ocurrir por un aumento del tamaño poblacional después de un proceso de cuello de botella (reducción drástica); en la práctica se traduce en una disminución de la diversidad genética dentro de una subpoblación. Si la selección es disruptiva o

balanceada se generará un exceso de variantes virales con una frecuencia intermedia (divergentes) que produciría valores positivos en los estadísticos. Sin embargo, esto también puede ocurrir después de una reducción del tamaño poblacional.

El servidor DATAMONKEY (<http://www.datamonkey.org>) se utilizó para:

A) Detección de eventos de recombinación e identificación de los puntos de recombinación mediante el método GARD (Pond y col. 2006). Este programa se basa en la búsqueda de discordancias en las relaciones filogenéticas entre distintos segmentos de las secuencias nucleotídicas alineadas. El análisis de recombinación debe realizarse en primer lugar ya que ignorar su efecto puede conducir a errores en la inferencia de las relaciones filogenéticas (Posada y Crandall. 2001), y una sobreestimación de la presión de selección a nivel de codón, incrementando la tasa de falsos positivos (Anisimova y col. 2003, Shriner y col. 2003).

B) Estimación del efecto de la selección en cada aminoácido de la CP. Se utilizó el método de la probabilidad de efecto fijo (FEL: *Fixed Effect Likelihood*) (Pond y Frost. 2005), que evalúa estadísticamente la relación entre el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo, para probar la hipótesis nula de que ambas variables se distribuyen de manera independiente.

Para estudiar la recombinación y la selección natural, se excluyeron del análisis las secuencias procedentes de Groenlandia debido a que no representan secuencias completas de la CP, mientras que el estudio de los atributos poblacionales (diferenciación geográfica, estabilidad y flujo genético), se incluyeron todos los aislados virales y se consideró la secuencia parcial de la CP común a todos ellos.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSION

6.3.1. Recombinación.

Ninguno de los aislados de ToMV presentó recombinación dentro del gen que codifica la CP. Esto podría deberse a varias razones: A) una baja tasa de recombinación o selección de recombinantes viables en este virus. B) sólo se analizó una pequeña zona del genoma (el gen de la CP corresponde aproximadamente a un 7 % del genoma), aunque en algunos virus se ha encontrado recombinantes dentro de la CP (Rubio y col. 2013). C) la baja

divergencia entre aislados de ToMV (véase los siguientes apartados) no permite detectar los recombinantes. Esta parece la causa más probable ya que se han encontrado recombinantes entre ToMV y TMV (He y col. 2012) así como entre distintos virus del género *Tobamovirus* (Fraile y col. 1997, Lartey y col. 1996, Lim y col. 2010, Min y col. 2009), aunque se ha observado que hay una fuerte selección negativa en los recombinantes de la CP de TMV y ToMV para mantener los dominios funcionales (He y col. 2012). La recombinación parece haber tenido un papel importante en la evolución de muchos virus de plantas con un genoma formado por una cadena de RNA de sentido positivo (Chare y Holmes. 2006, Ferrer y col. 2011, Rubio y col. 2013). Se ha propuesto que la recombinación puede compensar la disminución de eficacia biológica en las poblaciones virales de pequeño tamaño debido a la generación de un gran número de mutaciones deletéreas (Nagy. 2008).

6.3.2. Relaciones filogenéticas de los aislados de ToMV.

El análisis filogenético del GPC de 75 aislados de distintos países, cultivos y fuentes de agua mostró tres clados o agrupaciones con un elevado soporte estadístico, con valores de bootstrap mayores del 70% (Fig. 6.1).

El clado I está compuesto por la mayoría de los aislados, procedentes de Sudamérica (Brasil), Norteamérica (EEUU y Groenlandia), Europa (Alemania y España), Asia central (Kazajistán e Irán) y Asia oriental (China, Corea, Malasia y Taiwán), procedentes de diversos cultivos y fuentes de agua. El clado II está formado por un solo aislado de Brasil de pimiento y el clado III por tres aislados de Brasil de pimiento. La distancia nucleotídica entre aislados dentro de un clado fue menor que 0,042 (distancias medias de $0,013 \pm 0,004$ y $0,021 \pm 0,007$ para los clados I y III, respectivamente), mientras que las distancias entre los clados varió entre 0,086 y 0,207.

Es interesante notar, que las secuencias nucleotídicas de aislados de ToMV que se obtuvieron por RT-PCR de muestras recogidas en hielo glacial de unos 140.000 años (Castello y col. 1999) eran muy similares a las secuencias de aislados recientes, lo cual sugiere una gran estabilidad genética de ToMV. El hecho que se hayan establecido tres clados de aislados de ToMV con baja diversidad genética dentro de cada clado sugiere una fuerte selección negativa y que las mutaciones viables en el genoma de ToMV podrían estar restringidas en torno a variantes genéticas que corresponderían a unos picos muy estrechos dentro del paisaje adaptativo de este virus (Wright. 1932).

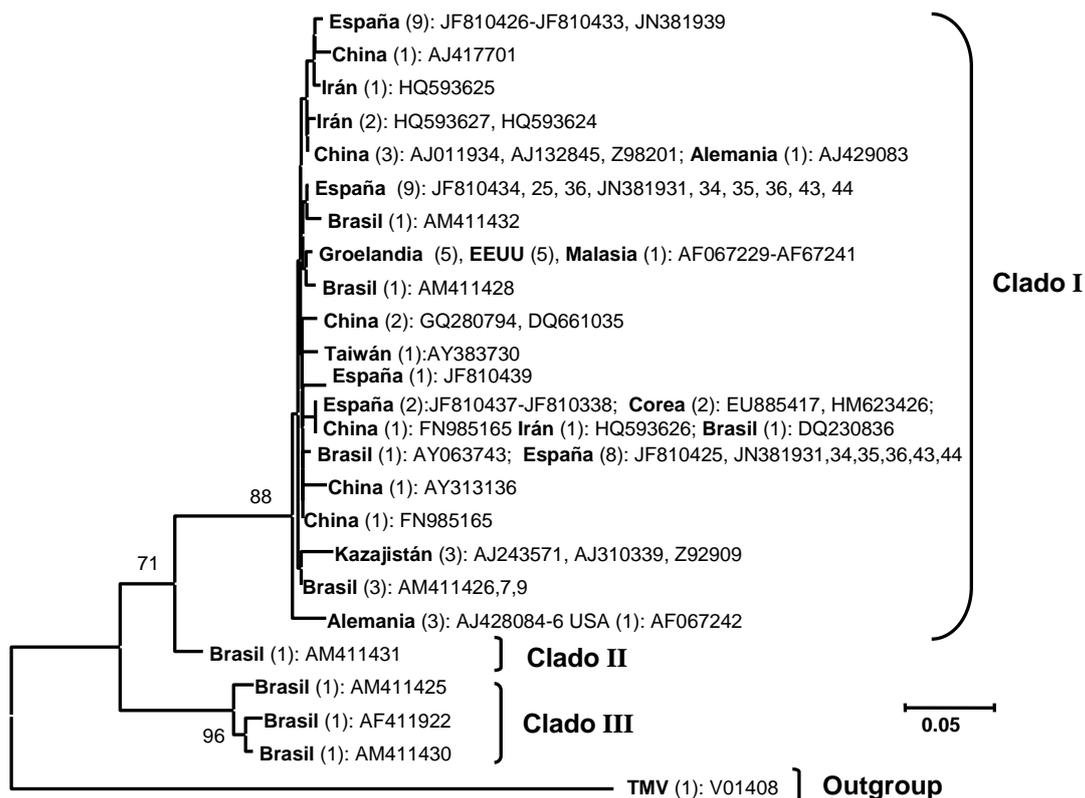


Figura 6.1. Arbol filogenético del gen de la CP de 75 aislados de ToMV y un aislado de TMV usado como outgroup, generado con el método de Máxima Verosimilitud. Sólo se muestran valores de bootstrap mayores de 50%. La longitud de las ramas del árbol es proporcional a las distancias genéticas. Se indica el origen geográfico y los números de acceso de GenBank. Los números entre paréntesis indican el número de aislados.

En Brasil se encontraron aislados correspondientes a los tres clados, siendo dos de estos clados exclusivos de Brasil. La existencia de aislados divergentes en Brasil y la baja divergencia observada entre los aislados del resto del mundo sugieren que Brasil o Sudamérica podría ser el origen de dispersión de ToMV, y que un aislado (o genotipo) se habría dispersado por todo el mundo.

La gran estabilidad genética de ToMV y el hecho que la mayoría de aislados del mundo tienen una baja divergencia tienen importantes implicaciones prácticas, ya que por una parte facilita el diseño de métodos de detección y la aplicación de estrategias de control de la enfermedad, y por otra parte muestra que hay un riesgo muy bajo de la dispersión y emergencia de aislados divergentes de ToMV.

Hay que destacar que la distancia nucleotídica máxima entre aislados de ToMV (correspondiente a distintos clados) llegó a ser 0,207, mientras que la distancia entre éstos y el aislado de TMV que se usó como outgroup varió entre 0,304 y 0,368. Estas distancias nucleotídicas están en consonancia con uno de los criterios para la demarcación de especies en el género *Tobamovirus*, cuyo punto de corte es de 0,250 en el gen de la CP (King y col. 2011b).

6.3.3. Estructura genética y flujo genético entre subpoblaciones de ToMV.

La población mundial de ToMV se dividió en seis subpoblaciones: Sudamérica (Brasil), Norteamérica (EE.UU), Groenlandia, Europa (España y Alemania), Asia central (Kazajstán e Irán) y Asia oriental (China, Corea, Taiwán y Malasia). La diversidad nucleotídica fue muy baja tanto dentro de cada subpoblación como entre subpoblaciones (ambas menor que 0,020), excepto para Sudamérica (Tabla 6.1), que mostró una diversidad nucleotídica de 0,095 (dentro de Sudamérica); y cerca de 0,070 cuando fue comparada con las otras subpoblaciones. Se ha encontrado también estabilidad genética espacial en otros virus del género *Tobamovirus* (Fraile y col. 1996, Rodríguez-Cerezo y col. 1989) y en otros virus de plantas (García-Arenal y col. 2001, Vives y col. 2002).

La estimación de la diferenciación genética entre subpoblaciones, con los estadísticos K_s^* , Z^* y S_{nn} , sugieren diferenciación genética entre ellas. El análisis con estos tres estadísticos mostró a Norteamérica y Groenlandia como una única subpoblación genética, mientras que las demás subpoblaciones estuvieron genéticamente diferenciadas. Solamente cuando se comparó Sudamérica con Norteamérica, Asia central o Groenlandia, el estadístico K_s^* no mostró diferenciación genética.

Los valores de flujo genético, F_{st} fluctuaron entre 0,100 y 0,300 (Tabla 6.1) para la mayoría de los casos, lo que sugiere que hay un cierto flujo genético entre algunas subpoblaciones. Los mayores valores de F_{st} se dieron entre Groenlandia con respecto a Europa y Asia oriental, indicando un aislamiento geográfico entre dichas subpoblaciones. Los valores más bajos de F_{st} se dieron entre Europa y Asia oriental y entre Groenlandia y Norteamérica, indicando un alto flujo genético entre estas subpoblaciones. Se podría especular que este flujo genético entre la subpoblación de Norteamérica y Groenlandia haya sido causado por la liberación de secuencias ancestrales del virus en fenómenos de desprendimiento y derretimiento de glaciares,

dispersando el virus a través del ciclo hidrológico y podría explicar en parte la gran estabilidad genética entre estas dos subpoblaciones (Castello y col. 1999).

La baja diversidad genética y el relativamente bajo flujo genético encontrado en ToMV corresponde a una situación que difiere de otros virus que tienen una diversidad baja con un alto flujo genético (Rubio y col. 2001a), una diversidad genética relativamente alta con alto flujo genético (Rubio y col. 2001b) o con bajo flujo genético (Wei y col. 2009). Este limitado flujo genético podría explicar en parte el hecho que los aislados divergentes de Brasil no se hayan dispersado.

Tabla 6.1. Diversidad genética y flujo genético de subpoblaciones geográficas de ToMV

Subpoblación ^a N ^b		Diversidad nucleotídica (F _{st}) ^c					
		Europa	Sudamérica	Asia Oriental	Asia Central	Norteamérica	Groenlandia
Europa	33	0.011±0.004 (0.210)					
Sudamérica	11	0.068±0.014 (0.208)	0.095±0.014				
Asia Oriental	12	0.013±0.004 (0.055)	0.0069±0.015 (0.204)	0.013±0.004			
Asia Central	7	0.019±0.004 (0.155)	0.072±0.015 (0.201) ^{Ks*}	0.018±0.004 (0.133)	0.018±0.007 (0.559)		
Norteamérica	6	0.016±0.005 (0.265)	0.069±0.0015 (0.222) ^{Ks*}	0.016±0.004 (0.263)	0.019±0.005 (0.230)	0.011±0.004	
Groenlandia	6	0.015±0.005 (0.536)	0.068±0.016 (0.273) ^{Ks*}	0.015±0.005 (0.452)	0.017±0.005 (0.373)	0.007±0.002 (-0.038) ^{Ks*, Z*, Snn}	0.003±0.001

^a Subpoblaciones geográficas: Europa: España (29 aislados) y Alemania (4); Sudamérica: Brasil (11); Asia oriental: China (8), Corea (2), Taiwán (1) y Malasia (1); Asia central: Irán (4) y Kazajistán (3); Norteamérica: EEUU (6) y Groenlandia (6).

^bN = Número de aislados de ToMV.

^cDiversidad nucleotídica dentro de subpoblaciones (sombreada) y entre subpoblaciones, incluyendo los errores típicos. Los Valores de F_{st} están entre paréntesis. Valores no significativos de los estadísticos Ks*, Z* y Snn (P>0,05) están representados como superíndices. Estos estadísticos también fueron evaluados entre España y Alemania en Europa y entre Irán y Kazajistán en Asia Central.

6.3.4. Selección natural.

La comparación entre sustituciones no sinónimas (dN, producen cambio de aminoácido) y sinónimas (dS, silenciosas, no producen cambio de aminoácido) proporcionan información sobre la intensidad y la dirección de la selección a nivel molecular. En la CP de ToMV el número de sustituciones

sinónimas fue mayor que el de las sustituciones no sinónimas indicando que hay una presión de selección negativa. La relación dN/dS dio un valor de 0.171 indicando una intensidad de selección moderada que está dentro de los valores observados en otros virus de plantas (García-Arenal y col. 2001). El análisis estadístico de las sustituciones dN y dS a nivel de cada codón reveló que ninguno estaba bajo selección positiva como resultado de una adaptación, mientras que había 137 bajo evolución neutra y 22 bajo selección negativa (Fig. 6.2).

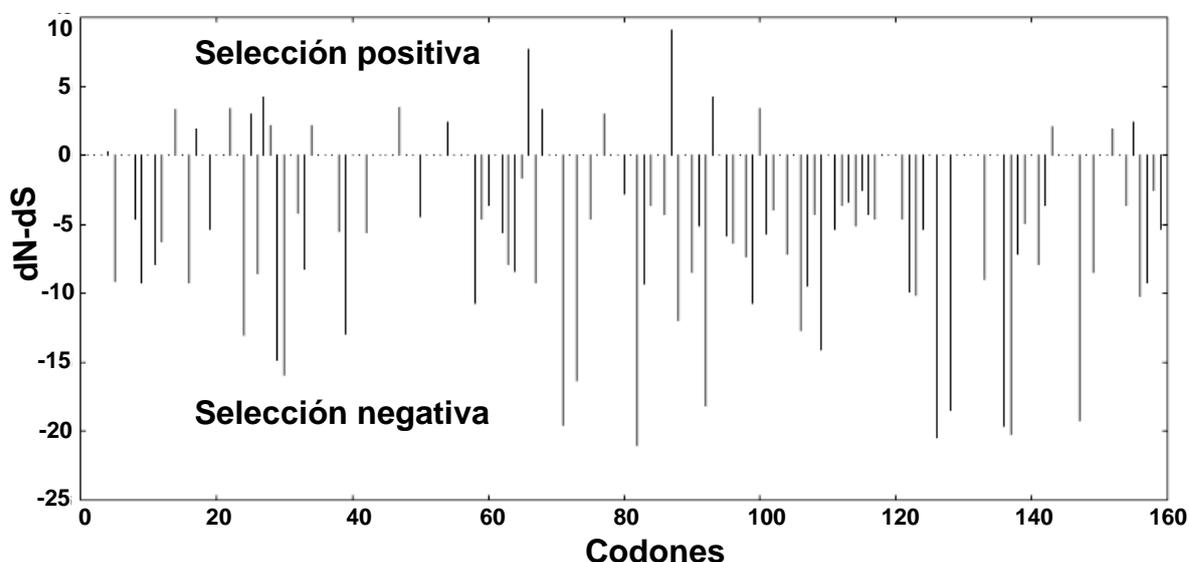


Figura 6.2. Posición de los aa de la CP de ToMV bajo selección negativa. La ordenada representa la diferencia de las sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (dN) y las sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) normalizadas. La abscisa representa la posición de los aa.

Finalmente, el papel de la selección natural a nivel poblacional se analizó con los estadísticos D de Tajima, y D^* y F^* de Fu y Li, que dieron valores significativamente negativos ($P < 0.05$). Esto sugiere una fuerte selección negativa o purificadora, que podría ocurrir por restricciones funcionales de la CP por estar implicada en las diferentes funciones de protección del genoma, movimiento célula a célula, y transmisión entre plantas, entre otras (Callaway y col. 2001b). Sin embargo, la deriva genética puede haber contribuido a la reducción de la variabilidad genética después de

que las poblaciones virales hubiesen pasado por cuellos de botella durante diferentes fases de su ciclo vital como el movimiento entre células y movimiento sistémico (Sacristan y col. 2003) o transmisión entre plantas (Ali y col. 2006).

7. RIBOVIRUS IMPORTANTES DE TOMATE: DETECCIÓN SIMULTÁNEA MEDIANTE RT-PCR MÚLTIPLE

7.1. INTRODUCCIÓN.

El tomate es la hortaliza más importante en el mundo, con una producción mundial de 152 millones de toneladas métricas, cosechadas sobre poco mas de 4,5 millones de hectáreas, y un valor de la producción alrededor de 406 mil millones de euros en 2009 (FAO, 2009, <http://www.fao.org/corp/statistics>). En la última década, se ha descrito varios casos de enfermedades virales emergentes en tomate que han causado pérdidas económicas considerables (Hanssen y col. 2010b). En la cuenca del mediterráneo y otras áreas subtropicales, los siete ribovirus (con genoma de RNA) más dañinos en tomate son: CMV, TSWV, ToMV, ToCV, TICV, PepMV y ToTV (una descripción detallada de estos virus está en las páginas 31-46).

El control de estas virosis es muy difícil. Para algunos virus no se han encontrado resistencias naturales mientras que otros son capaces de evolucionar y superar resistencias introducidas en tomate por mejora genética (Aramburu y Galipienso 2005, Lin y col. 2003, López y col. 2011). A *priori*, la mejor estrategia para el control de las enfermedades causadas por virus en tomate está basada en prevenir la introducción y el establecimiento de los virus en viveros y en los cultivos, así como la erradicación de plantas infectadas en etapas tempranas de las epidemias. La implementación de estas medidas de control requiere una vigilancia continua mediante el uso de métodos de detección específicos, sensibles y de rápida aplicación.

La detección de los virus de tomate se efectúa tradicionalmente mediante métodos serológicos, principalmente ELISA, con anticuerpos policlonales o monoclonales. Sin embargo, el bajo título viral que frecuentemente se encuentra en plantas de vivero o durante las primeras fases de la infección viral puede dar lugar a falsos negativos. Además, no se dispone de estuches comerciales de ELISA para ToCV, TICV y ToTV.

Como ya se ha mencionado, los métodos moleculares basados en la hibridación molecular o RT-PCR tienen la ventaja de ser más sensibles que ELISA, más fáciles de desarrollar, y permiten el control del nivel de

especificidad. Hasta la fecha se han desarrollado la RT-PCR para CMV (Lin y col. 2004), TSWV (Mumford y col. 1994), ToMV (Letschert y col. 2002), ToCV (Louro y col. 2000a), TICV (Vaira y col. 2002), PepMV (Mumford y Metcalfe 2001), y ToTV (Pospieszny y col. 2007). Una modalidad de gran interés es la RT-PCR múltiple (multiplex RT-PCR) con varios pares de iniciadores para la detección e identificación simultánea de varios virus que afectan un cultivo (Bertolini y col. 2003, Meunier y col. 2003, Mortimer-Jones y col. 2009, Sanchez-Navarro y col. 2005, Thompson y col. 2003).

En este capítulo, se planteó como objetivo el desarrollo de técnicas de RT-PCR múltiple para la detección e identificación simultánea de los siete ribovirus más importantes en cultivos de tomate del área mediterránea: CMV, TSWV, ToMV, ToCV, PepMV, ToTV y TICV.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Aislados virales.

Se utilizaron aislados virales de CMV, TSWV, ToMV, ToCV, TICV, PepMV y ToTV recolectados por los Drs. José Aramburu (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria, Barcelona), M^a Isabel Font (Universidad Politécnica de Valencia) y Salvatore Davino (Universidad de Palermo) como control positivo en los ensayos de diagnóstico. TSWV, CMV, ToMV y PepMV se inocularon mecánicamente en plantas de tomate y se recogieron del campo plantas de tomate que estaban infectadas por TICV, ToCV y ToTV. Las plantas de tomate se mantuvieron en invernadero con malla a prueba de insectos.

7.2.2. Extracción de RNA.

Se prepararon extractos de plantas mediante maceración de tejido foliar en una proporción 1:20 (p/v) con tampón PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 2mM de KH₂PO₄) a pH 7,2 y suplementado con 0,2% Na-DIECA + 2% (p/v) de polivinil-pirrolidona (PVP-10), en bolsas plásticas individuales (Bioreba) al pasarle un rodillo. Estos extractos crudos se dividieron en dos partes. Una parte se utilizó directamente en el análisis por ELISA y la otra (equivalente a 100 mg de tejido vegetal) se utilizó para la purificación del RNA total con el estuche comercial “Ultraclean Plant RNA Isolation Kit” (MoBio), tal como se describe en el apartado 3.2.2.1 (Página 53), para luego usarlo en el análisis por RT-PCR.

7.2.3. RT-PCR y PCR.

La RT-PCR en un solo vial, tanto simple como múltiple, se realizó tal como se ha indicado en el apartado 4.2.3 (página 72) pero adaptando la temperatura de anillado a los iniciadores diseñados (véase el apartado de Resultados y discusión de este capítulo). La PCR se realizó tal como se indica en el apartado 3.2.3.3 (Páginas 57 y 58).

7.2.4. Clonaje y secuenciación.

El clonaje y secuenciación están descritos en el apartado 3.2.4 (página 60).

7.2.5. Análisis de secuencias nucleotídicas

Las secuencias nucleotídicas utilizadas en este trabajo se descargaron de la base de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias fueron alineadas usando el programa CLUSTAL W (Higgins y col. 1994), habilitado en el software Geneious Pro 5.4.6 (Biomatters). El diseño de los iniciadores se realizó con los programas Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y Vector NTI 9.0 (Invitrogen).

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Diseño de iniciadores

Se diseñaron pares de iniciadores específicos para los siete virus: CMV, TSWV, ToMV, ToCV, TICV, PepMV y ToTV. Para que estos iniciadores se puedan utilizar simultáneamente en una RT-PCR, se tuvo en cuenta que fueran compatibles: sin ninguna interacción entre ellos (primer dimer) y con una temperatura de anillamiento similar para todos. Para permitir la discriminación de los diferentes virus por electroforesis, se eligieron las secuencias de iniciadores que flanquean regiones genómicas de diferentes tamaños. Las secuencias nucleotídicas, la posición genómica de los cebadores y el tamaño esperado de los amplicones, se muestran en la Tabla 7.1.

Para minimizar los falsos negativos debido a la ausencia de reconocimiento de los iniciadores con algunos aislados genéticamente divergentes de cada virus, se tuvo en cuenta la variabilidad genética de estos virus: CMV (Davino y col. 2012b, Lin y col. 2004, Roossinck y col. 1999, Roossinck 2002, Sacristán y col. 2004), TSWV (López y col. 2011, Tentchev y col. 2011, Tsompana y col. 2005), , ToTV (Alfaro-Fernández y col. 2010), ToCV (Lozano y col. 2009, Rubio y col.

2013, Wintermantel y Wisler 2006), TICV (Rubio y col. 2013), PepMV (Gómez y col. 2012, Pagán y col. 2006) y ToMV (Véase el capítulo anterior, página 91). En el caso de PepMV se tuvo que diseñar dos iniciadores reversos (Tabla 7.1), ambos compatibles con el mismo iniciador directo que correspondían a dos grupos divergentes del virus, ya que en este caso no se pudo encontrar una región conservada para todos los aislados de PepMV que cumpliera todos los requisitos especificados anteriormente.

Tabla 7.1. Iniciadores diseñados para RT-PCR múltiples.

Virus	Iniciador^a	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Posición^b	Tamaño^c	GenBank
TICV	TICV 1 (+)	TTGGCTGTGAGTCAAGGAGGT	RNA 2: 5414	136	FJ815441
	TICV 2 (-)	CTGATTTGATAGCCGATTTCCC	RNA 2: 5549		
ToTV	ToTV 1 (+)	TGGTGCTCAACAGTGCAATCA	RNA 1: 859	189	DQ388879
	ToTV 2 (-)	CACACTGCATCCACCTCTTCCA	RNA 1: 1047		
ToCV	ToCV 1 (+)	CATTCCGGCTAATCCTAATCGA	RNA 2: 4461	101	AY903448
	ToCV 2 (-)	CCCTAGTGGAGGTACCTTCAATTC	RNA 2: 4561		
TSWV	TSWV 1 (+)	ACCATGGTCTTCTTCTGATGAA	RNA M: 165	452	S48091
	TSWV 2 (-)	AGTTATTGTCCCCTGACCCTTC	RNA M: 616		
CMV	CMV 1 (+)	ATTAACCACCCAACCTTTG	RNA 3: 1413	478	D10538
	CMV 2 (-)	TGGGAATGCGTTGGTGCTC	RNA 3: 1890		
PepMV	PepMV 1 (+)	CATAGTTGTGCACGGAATTGC	4503	773	AF484251
	PepMV 2 (-) ^d	TTCCGTCTTGATACTGACCA	5275		
	PepMV 3 (-) ^d	TGCCGTCTTGATATTGGCCA	5279		
ToMV	ToMV 1 (+)	GATAATTTGATTGAAGATGAAGCC	5644	274	AF332868
	ToMV 2 (-)	CTGTACACCTTATAAACATCGCC	5917		

^aLos iniciadores directos se indican con (+) y los reversos con (-).

^bLas posición de anillado del extremo 5' de los iniciadores directo y reverso sobre la secuencia del RNA genómico correspondiente.

^cTamaño de los amplicones, deducido de las secuencias nucleotídicas.

^dSe usaron dos cebadores reversos para PepMV para abarcar dos grupos de aislados divergentes.

7.3.2. Desarrollo de la RT-PCR múltiple.

En primer lugar, se llevó a cabo la RT-PCR en un solo paso para cada virus por separado utilizando solamente el par de iniciadores específicos correspondiente. Se ensayó un gradiente de temperatura entre 50 y 60 °C y se encontró que la temperatura de anillado óptima para todos los iniciadores (de los siete virus) era 50 °C dando lugar un amplicón único del tamaño esperado, mientras que no se obtuvo ningún amplicón en muestras procedentes de plantas no infectadas. Los amplicones se clonaron y su secuencia nucleotídica confirmó la identidad de los virus en las muestras de las que derivaban dichos clones.

Los clones obtenidos de estos virus se utilizaron para ensayar y optimizar las condiciones de la PCR múltiple. Para ello se utilizó una mezcla con cantidades equimolares (1 ng) de los clones de cDNA correspondiente a cada uno de estos virus. La PCR con los siete pares de iniciadores específicos para estos virus dio lugar a los amplicones con los tamaños esperados para CMV, TSWV, ToMV, PepMV y ToTV, pero no se observaron los amplicones correspondientes a los dos crinivirus: ToCV y TICV; lo que indica que existe una incompatibilidad entre los iniciadores de estos dos virus. Tras varios ensayos, la detección simultánea de los siete virus se consiguió mediante dos PCRs múltiples: una para PepMV, TSWV, ToTV y ToCV y la otra para la detección de CMV, ToMV y TICV (Fig. 7.1).

Para determinar la sensibilidad en infecciones mixtas, se ensayó las PCRs múltiples con mezclas de cuatro o tres clones (según se usara una de las dos RT-PCR múltiples) de los distintos virus. Las mezclas se prepararon de manera que se variaba la concentración de un virus (diluciones desde 1 ng a 10^{-4} ng) y se mantenía constante la concentración de los otros virus (1 ng). En todos los casos, cada virus se pudo detectar en una proporción de 1:1000 con respecto a los otros virus (datos no mostrados).

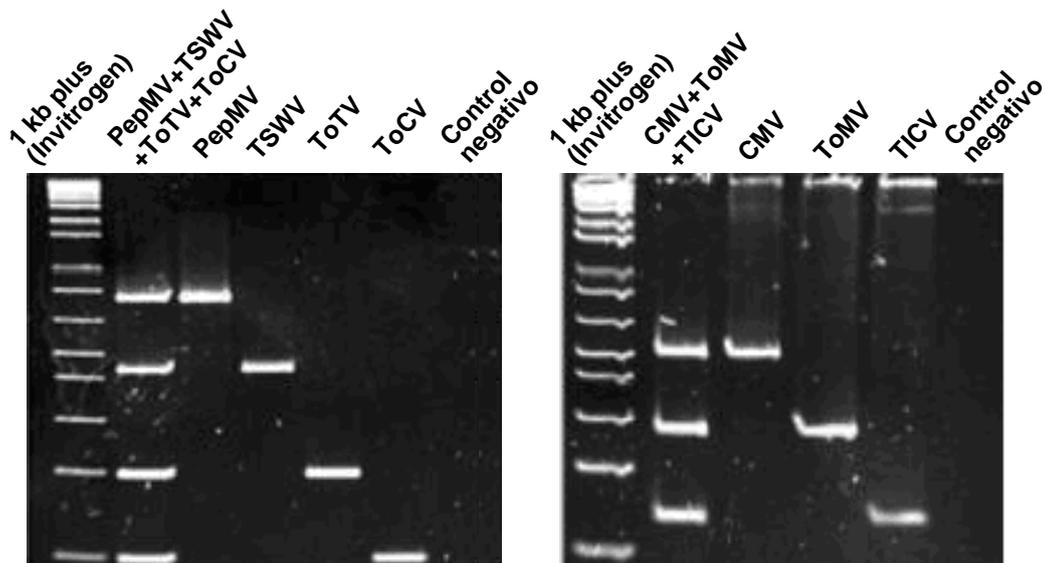


Figura 7.1. Electroforesis de dos PCRs múltiples: A) con iniciadores para PePMV, TSWV, ToTV y ToCV y B) con iniciadores para CMV, ToMV y TICV. Las muestras utilizadas (clones de cada virus) se indican encima del gel.

7.3.3. Análisis de muestras de campo mediante la RT-PCR múltiple

Para validar las técnicas de detección basadas en RT-PCR múltiples con muestras de campo, se analizaron 45 muestras de tomate recolectadas en el 2011 en distintos invernaderos y en parcelas al aire libre de Sicilia.

En la Fig. 7.2 se muestra el análisis electroforético de las RT-PCRs múltiples de algunas muestras y en la Tabla 7.2 se muestran los virus detectados en las 45 muestras de tomate analizadas.

El virus mas prevalente fue ToCV que se detectó en 32 plantas, seguido por TSWV que se encontró en 25 plantas, CMV en 20 plantas, PePMV en 17 plantas, ToMV en 12 plantas, TICV en seis plantas y ToTV en dos plantas (Tabla 7.2). Tres plantas de tomate no estaban infectadas por ningún virus, ocho presentaron infecciones simples, mientras que otras 10 estaban infectadas por dos virus distintos, 13 plantas por tres virus, ocho plantas por cuatro virus y tres plantas por cinco virus (Tabla 7. 2). Las infecciones mixtas parecen ser un fenómeno bastante frecuente ya que se ha reportado con diferentes virus en diversos lugares y cultivos (Herrera-Vasquez y col. 2009, Karyeija y col. 2000, Ochoa-Corona y col. 2010, Wintermantel y col. 2008); incluso se ha llegado a detectar ocho virus infectando una sola planta (Rodríguez y col. 2004).

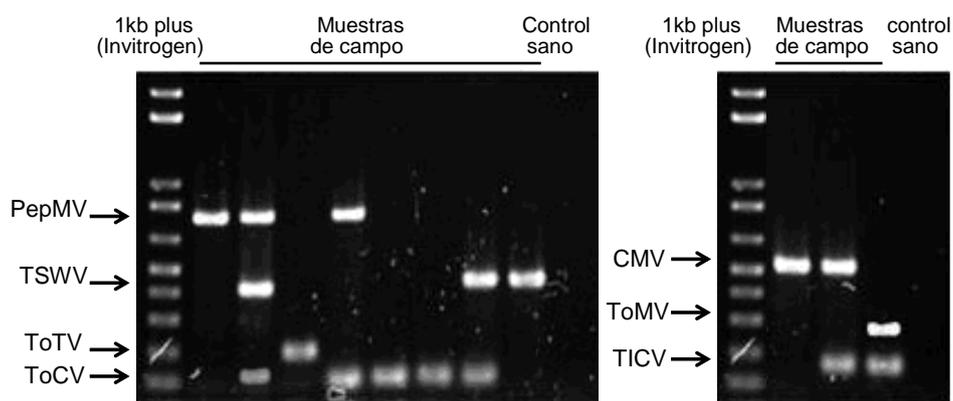


Figura 7.2. Análisis de algunas muestras de tomate de campo mediante A) RT-PCR múltiple para PepMV, TSWV, ToTV y ToCV y B) RT-PCR múltiple para CMV, ToMV y TICV .

Las infecciones mixtas podrían estar favorecidas por una interacción sinérgica entre distintas especies virales que daría como resultado un aumento de la infectividad o multiplicación de uno o varios de los virus con respecto a las infecciones simples. El sinergismo puede ocurrir porque un virus suprime algún mecanismo de defensa del hospedero que inhibe la infección o multiplicación del otro virus. Se han descrito varios casos en los que cada virus codifica un supresor de silenciamiento que interfiere en diferentes etapas de la ruta del silenciamiento génico, de manera que la coinfección de ambos virus da lugar a síntomas mas severos que la infección individual de cada virus (González-Jara y col. 2005, Karyeija y col. 2000, Palukaitis 2011, Syller 2011). Un caso interesante es la capacidad de TSWV de infectar plantas de tomate con el gen de resistencia *Sw-5* cuando están preinfectadas con ToCV (Garcia-Cano y col. 2006). Otro tipo de interacción sinérgica es la complementación, en que uno de los virus provee de una función en trans de la que carece el otro virus. Por ejemplo los umbravirus solo se transmiten por pulgones cuando están en plantas que estan infectadas por luteovirus (Syller. 2011). La interacción entre diferentes virus coinfectando la misma planta puede tener un impacto importante en el desarrollo de epidemias y podría incrementar el daño en cultivos en caso de ocurrir sinergismo (Syller. 2011).

La distribución de los virus analizados fue diferente para cada provincia de Sicilia. Aunque ToCV estaba ampliamente extendido en todas las provincias Sicilianas, ToTV y TICV solamente se detectaron en la provincia de Ragusa, mientras que CMV y TSWV tuvieron mayor prevalencia en Agrigento y Trapani. Estas diferencias en la prevalencia de estos virus en cada provincia siciliana podría deberse a diversos factores, entre ellos: los genotipos de tomate cultivados en cada provincia, las poblaciones de insectos vectores, las condiciones climáticas y las prácticas agronómicas. Así por ejemplo, en Ragusa se cultiva el tomate en invernadero mientras que en Agrigento y Trapani se hace en campo abierto.

Tabla 7.2. Detección de siete virus mediante RT-PCR múltiple en 45 plantas de tomate recolectadas en tres provincias de Sicilia.

Virus	Provincias		
	Ragusa	Agrigento	Trapani
PepMV	+++++---+---+++-	+++-----	---+---++++-----
TSWV	---+-----+---	--+++--+---+++++	-+++++++-----+
ToTV	+------	-----	-----
ToCV	-++++++-++++-+	+-++++-++++-	+++++++---+--+
CMV	---+-----	+++++---+-----	+++++---+-----
ToMV	+------	+++--+---+---+	---+-----
TICV	++++-----+---	-----	-----

Cada columna corresponde a una planta de tomate.

La presencia de cada virus se denota con + y la ausencia con -.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Las técnicas moleculares basadas en la PCR e hibridación molecular tienen ventajas en la aplicación por su gran sensibilidad, reproducibilidad y especificidad; y en el diseño por su facilidad, rapidez y capacidad de controlar el nivel de especificidad (familia, género, especie, cepa o grupo de aislados). La capacidad de detectar simultáneamente un cierto número de virus en el campo o en lotes de semilla, constituye una herramienta valiosa para la gestión de la calidad fitosanitaria de los cultivos en todas sus fases, ya sea en cribado de bancos de germoplasma, en programas de mejora genética para introducción de resistencia en nuevos cultivares, en muestreos de rutina para vigilancia epidemiológica, en control de calidad en programas de certificación, o en vigilancia cuarentenaria para la regulación del movimiento de material vegetal en el comercio entre países. Para garantizar una buena especificidad y minimizar los falsos positivos y negativos es necesaria la caracterización molecular de los virus de interés.

En este trabajo abordamos dos retos interesantes tanto a nivel tecnológico como a nivel práctico sobre la detección de un grupo de virus relacionados taxonómicamente (género *Fabavirus*) y los virus más importantes que afectan a un cultivo en un área determinada (tomate en el área mediterránea).

De todo el trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones concretas:

Reto 1. Detección simultánea de los miembros del género *Fabavirus*

1.1. Se ha determinado la secuencia nucleotídica del genoma completo de LMMV, que era el único miembro del género *Fabavirus* que no tenía confirmado su estatus de especie viral ya que no se disponía de ninguna secuencia.

1.2. La inferencia de las relaciones filogenéticas demostró que LMMV es una especie del género *Fabavirus* y se corroboró el criterio para delimitar entre géneros, especies y aislados virales basado en la identidad nucleotídica y aminoacídica. Esta información se utilizó para el diseño de los métodos moleculares de detección con distintos niveles de especificidad.

1.3. Se descubrió un motivo de secuencia de 10 nucleótidos, repetido a lo largo de la 5'-UTR en ambos RNAs genómicos de todos los miembros del género *Fabavirus*. Esto tiene por un lado un valor taxonómico ya que sirve de seña de identidad para adscribir nuevos virus a este género, y por otro lado se podría utilizar para el desarrollo de un método de detección general para el género *Fabavirus*.

1.4. Se desarrolló un procedimiento basado en RT-PCR con un par de iniciadores conservados para el género *Fabavirus* y RT-PCR múltiple con iniciadores específicos de las cinco especies conocidas de este género que permite la detección muy sensible de estos virus y el descubrimiento de nuevos virus dentro del género *Fabavirus*.

1.5 Se desarrolló un método basado en la hibridación de flujo, que permite un análisis muy rápido de un elevado número de muestras para la detección de todos los miembros del género *Fabavirus* con una sonda general (que contiene los motivos seña de identidad del género), y la identificación de las cinco especies conocidas mediante sondas específicas. Esta es la primera vez que se consigue una sonda general para un género viral y posibilita el descubrimiento de nuevas especies dentro del género *Fabavirus*.

Reto 2. Detección simultánea de los siete ribovirus más importantes de cultivos de tomate del área mediterránea.

2.1. La caracterización genética de la población mundial de ToMV, el único de los siete ribovirus no caracterizado, mostró tres grupos divergentes de aislados. Sólomente uno de estos grupos, formado por aislados muy similares genéticamente, estaba distribuido por todo el mundo. Esta estabilidad genética facilita el diseño de métodos de detección y el control de la enfermedad, aunque hay que vigilar por el riesgo de dispersión de los pocos aislados divergentes.

2.2. Se desarrolló un método basado en dos RT-PCRs múltiples para la detección e identificación simultánea de CMV, TSWV, ToMV, ToTV, ToCV, TICV, y PepMV.

2.3. Una prospección en campo con este método reveló que la prevalencia de cada virus era distinta y variaba según las áreas geográficas analizadas, así como que era frecuente las infecciones mixtas con varios de estos virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Leal R, Duffy S, Xiong Z, Hammond R, Elena SF (2011) Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopathology* 101:1136-1148
- Adams M, Candresse T, Hammond J, Kreuze J, Martelli G, Namba S, Pearson M, Ryu K, Vaira A (2012a) Family *Alphaflexiviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp:904-919. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego
- Adams, M.J., Heinze, C., Jackson, A.O., Kreuze, J.F., Macfarlane, S.A. and Torrance, L (2012b) Family *Virgaviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp: 1139-1162. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- Alfaro-Fernández A, Cebrián M, Herrera-Vásquez J, Córdoba-Sellés M, Sánchez-Navarro J, Jordá C (2010) Molecular variability of Spanish and Hungarian isolates of *Tomato torrado virus*. *Plant Pathol* 59:785-793
- Ali A, Li H, Schneider WL, Sherman DJ, Gray S, Smith D, Roossinck MJ (2006) Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. *J Virol* 80:8345-8350
- Allaire M, Chernaiia MM, Malcolm BA, James MN (1994) Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* 369: 72-76
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Amari K, Gonzalez-Ibeas D, Gómez P, Sempere R, Sanchez-Pina M, Aranda M, Diaz-Pendon J, Navas-Castillo J, Moriones E, Blanca J (2008) *Tomato torrado virus* is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. *Plant Dis* 92:1139-1139

- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19:535-544
- Anisimova M, Nielsen R, Yang Z (2003) Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics* 164:1229-1236
- Aparicio F, Soler S, Aramburu J, Galipienso L, Nuez F, Pallas V, Lopez C (2009) Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur J Plant Pathol* 123:117-123
- Aramburu J, Galipienso L (2005) First report in Spain of a variant of Tomato mosaic virus (ToMV) overcoming the *Tm-22* resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Pathol* 54:566-566
- Aramburu J, López C, Galipienso L, Rubio L. 2014. Bronceado del tomate en “Enfermedades de las plantas causadas por virus”. Editores: Cambra, M., Moriones, E., Llave, C. y Ayllón, M.A. Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España, (en prensa).
- Bariana H, Shannon A, Chu P, Waterhouse P (1994) Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology* 84:1201-1205
- Baulcombe DC (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833
- Belliure B, Gomez-Zambrano M, Ferriol I, La Spina M, Alcacer L, Debreczeni DE, Rubio L (2009) Comparative transmission efficiency of two *Broad bean wilt virus 1* isolates by *Myzus persicae* and *Aphis Gossypii*. *J Plant Pathol* 91:475-478
- Bertolini E, Olmos A, López MM, Cambra M (2003) Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93:286-292
- Bonfield JK, Whitwham A (2010) Gap5-editing the billion fragment sequence assembly. *Bioinformatics* 26:1699-1703

- Boonham N, Walsh K, Smith P, Madagan K, Graham I, Barker I (2003) Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J Virol Methods* 108:181-187
- Boonham N, Tomlinson J, Mumford R (2007a) Microarrays for rapid identification of plant viruses 1. *Annu Rev Phytopathol* 45:307-328
- Broadbent L (1976) Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annu Rev Phytopathol* 14:75-96
- Bujarski J, Figlerowicz M, Gallitelli D, Roossinck M, Scott S (2012) Family *Bromoviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp: 965-976. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- Bystricka D, Lenz O, Mraz I, Piherova L, Kmoch S, Sip M (2005) Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *J Virol Methods* 128:176-182
- Bystricka D, Lenz O, Mraz I, Dedic P, Sip M (2003) DNA microarray: parallel detection of potato viruses. *Acta virologica* 47:41-44
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock E, Sit T, Lommel S (2001a) The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* 39:419-460
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA (2001b) The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* 39:419-460
- Cambra M, Garnsey S, Permar T, Henderson C, Gumpf D, Vela C (1990) Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* 80:1034
- Castello JD, Rogers SO, Starmer WT, Catranis CM, Ma L, Bachand GD, Zhao Y, Smith JE (1999) Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biol* 22:207-212
- Chakraborty S, Newton AC (2011) Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathol* 60:2-14
- Chare ER, Holmes EC (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol* 151:933-946

- Chare ER, Holmes EC (2004) Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. *J Gen Virol* 85:3149-3157
- Chomič A, Pearson M, Clover G, Farreyrol K, Saul D, Hampton J, Armstrong K (2010) A generic RT-PCR assay for the detection of *Luteoviridae*. *Plant Pathol* 59:429-442
- Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350:91-92
- Córdoba Sellés C (2010) El virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus) afectando al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y Epidemiología. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Daviet L, Schalk M (2010) Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. *Flavour Fragrance J* 25:123-127
- Davino S, Miozzi L, Panno S, Rubio L, Davino M, Accotto GP (2012a) Recombination profiles between *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications. *J Gen Virol* 93:2717
- Davino S, Panno S, Rangel EA, Davino M, Bellardi MG, Rubio L (2012b) Population genetics of *Cucumber mosaic virus* infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Arch Virol* 157: 739-745
- Davino S, Willemsen A, Panno S, Davino M, Catara A, Elena SF, Rubio L (2013) Emergence and Phylodynamics of *Citrus tristeza virus* in Sicily, Italy. *PLOS ONE* 8:e66700
- Davino S, Davino M, Accotto GP (2008) A single-tube PCR assay for detecting viruses and their recombinants that cause tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *J Virol Methods* 147:93-98
- Dayhoff MO, Schwartz RM (1978) A model of evolutionary change in proteins. In *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 89-99, Editor Dayhoff MO, Citeseer, Penn, USA
- de Castro AP, Díez MJ, Nuez F (2007) Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Dis* 91:879-885

- de Haan P, Kormelink R, de Oliveira Resende R, van Poelwijk F, Peters D, Goldbach R (1991) *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol* 72:2207-2216
- Dietzgen RG, Xu Z, Teycheney P (1994) Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Dis* 78:708-711
- Dodds JA, Bar-Joseph M (1983) Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology* 73:419-423
- Domingo E, Holland J (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51:151-178
- Dong SW, Xiang HY, Shang QX, Li DW, Yu JL, Han CG (2012) Complete genomic sequence analysis reveals a novel fabavirus infecting cucurbits in China. *Arch Virol* 157:597-600
- Dovas C, Katis N, Avgelis A (2002) Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Dis* 86:1345-1349
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148:1667-1686
- Duffus JE, Liu H, Wisler GC (1996) *Tomato infectious chlorosis virus*-A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Eur J Plant Pathol* 102:219-226
- Edwardson J, Christie R (1978) Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Annu Rev Phytopathol* 16:31-55
- Efron B, Halloran E, Holmes S (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7085-7090
- Elena SF (2011) Evolutionary constraints on emergence of plant RNA viruses. *Recent Advances in Plant Virology*, pp:283-300. Editores C Caranta, MA Aranda, M Tepfer, JJ López-Moya, Caister Academic Press, Norfolk, UK
- Elena SF, Bedhomme S, Carrasco P, Cuevas JM, de la Iglesia F, Lafforgue G, Lalic J, Prosper A, Tromas N, Zwart MP (2011) The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact* 24:287-293

- EPPO (2013) PQR - EPPO database on quarantine pests (available online).
<http://www.eppo.int>
- Fereres A (2000) Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Virus Res* 71:221-231
- Fernández AMF, Burruezo AR, Tomás JP (2008) *Genética y mejora vegetal*. Universidad Politécnica de Valencia Edit UPV. ISBN:978-84-8363-340-3
- Ferrer R (2008) *Caracterización molecular y desarrollo de métodos de diagnóstico del género Fabavirus*. Evaluación de BTH como método de control. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ferrer RM, Luis-Arteaga M, Guerri J, Moreno P, Rubio L (2007) Detection and identification of species of the genus *Fabavirus* by RT-PCR with a single pair of primers. *J Virol Methods* 144:156-160
- Ferrer RM, Guerri J, Luis-Arteaga MS, Moreno P, Rubio L (2005) The complete sequence of a Spanish isolate of *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) reveals a high variability and conserved motifs in the genus *Fabavirus*. *Arch Virol* 150:2109-2116
- Ferrer R, Escriu F, Luis-Arteaga M, Guerri J, Moreno P, Rubio L (2008) New molecular methods for identification of *Broad bean wilt virus 1*. *Mol Cell Probes* 22:223-227
- Ferrer RM, Ferriol I, Moreno P, Guerri J, Rubio L (2011) Genetic variation and evolutionary analysis of *Broad bean wilt virus 2*. *Arch Virol* 156:1445-1450
- Ferriol I (2012). *Factors involved in the evolution of Broad bean wilt virus 1 and Tobacco mosaic virus*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ferriol I, Rubio L, Pérez-Panadés J, Carbonell E, Davino S, Belliure B (2013) Transmissibility of Broad bean wilt virus 1 by aphids: influence of virus accumulation in plants, virus genotype and aphid species. *Ann Appl Biol* 162:71-79
- Ferriol I, Ruiz-Ruiz S, Rubio L (2011) Detection and absolute quantitation of Broad bean wilt virus 1 (BBWV-1) and BBWV-2 by real time RT-PCR. *J Virol Methods* 177:202-205

- Ferriol I, Ferrer R, Luis-Arteaga M, Guerri J, Moreno P, Rubio L (2014) Genetic variability and evolution of *Broad bean wilt virus 1*: role of recombination, selection and gene flow. *Arch Virol*:159: 779-784.
- Font MI, Rubio L, Martínez-Culebras PV, Jordá C (2007) Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Res* 128:43-51
- Fraile A, Escriu F, Aranda MA, Malpica JM, Gibbs AJ, Garcia-Arenal F (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J Virol* 71:8316-8320
- Fraile A, Malpica JM, Aranda MA, Rodríguez-Cerezo E, García-Arenal F (1996) Genetic Diversity in Tobacco Mild Green Mosaic Tobamovirus Infecting the Wild Plant *Nicotiana glauca*. *Virology* 223:148-155
- French C, Bouthillier M, Bernardy M, Ferguson G, Sabourin M, Johnson R, Masters C, Godkin S, Mumford R (2001) First report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States. *Plant Dis* 85:1121-1121
- Frost K, Groves R, Charkowski AO (2013) Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Dis* 97:1268-1280.
- Froussard P (1992) A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Res* 20:2900-2900
- Fu YX, Li WH (1993) Maximum likelihood estimation of population parameters. *Genetics* 134:1261-1270
- Fuchs M, Gonsalves D (2007) Safety of Virus-Resistant Transgenic Plants Two Decades After Their Introduction: Lessons from Realistic Field Risk Assessment Studies*. *Annu Rev Phytopathol* 45:173-202
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch Virol* 148:1713-1720
- Galipienso L, Carmen Vives M, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2004) Detection of Citrus Leaf Blotch Virus Using Digoxigenin-Labeled cDNA Probes and RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* 110:175-181
- Gallie DR (1996) Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol Biol* 32:145-158

- Gallitelli D, Martelli G, Gabré SK, Marchoux G (1995) Progress in the biological and molecular studies of some important viruses of Solanaceae in the Mediterranean:503-514
- Gambley C, Thomas J, Persley D, Hall B (2010) First report of Tomato torrado virus on tomato from Australia. *Plant Dis* 94:486-486
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 39:157-186
- García-Cano E, Resende RO, Fernández-Munoz R, Moriones E (2006) Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus*. Results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96:1263-1269
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M, Henderson CT (1993) Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). 12th Conference of International Organization of Citrus Virologist, pp:39-50.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386-401
- Goldbach RW, Wellink J. 1996. Comovirus: molecular biology and replication. In *The Plant Viruses*, vol. 5, pp. 35-76. Eds BD Harrison, AF Murrant. Plenum Press, New York, USA
- Goldbach R, Bucher E, Prins M (2003) Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res* 92:207-212
- Gómez P, Sempere R, Aranda M, Elena S (2012) Phylodynamics of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Eur J Plant Pathol*:1-5
- González-Jara P, Atencio FA, Martínez-García B, Barajas D, Tenllado F, Díaz-Ruiz JR (2005) A single amino acid mutation in the *Plum pox virus* helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95:894-901
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17:4713-4730

- Goszczyński D, Jooste A (2002) The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of *Grapevine virus A*. *Vitis* 41:77-82
- Green, S. K. (1991). Integrated control of virus diseases of vegetables in Taiwan. Proceedings of the International Workshop on the Implementation of Integrated Control of Virus Diseases of Important Crops. April pp: 9-14
- Green S, Hwang L, Kuo Y (1987) Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *J Plant Dis Prot* 94:386-397
- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JLN, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303:327-332
- Guerri J, Moreno P, Muñoz N, Martínez M (1991) Variability among Spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathol* 40:38-44
- Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BP (2010) Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant-Microbe Interact* 23:539-548
- Harlow E, Lane D (1988) Monoclonal Antibodies. In *Antibodies A Laboratory Manual*. pp:141, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- Harper K, Creamer R (1995) Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. *Plant Dis* 79:563-567
- Hart TJ, Kohl A, Elliott RM (2008) Role of the NSs Protein in the zoonotic capacity of orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health* 56:285-296
- He M, He C, Ding N (2012) Natural recombination between tobacco and tomato mosaic viruses. *Virus Res* 163:374-379
- Helguera P, Taborda R, Docampo D, Ducasse D (2001) Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *J Virol Methods* 95:93-100
- Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Aparicio F, Pallás V (2005) Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *J Virol Methods* 124:49-55

- Herrera-Vasquez J, Alfaro-Fernández A, Cordoba-Selles M, Cebrian M, Font M, Jordá C (2009) First report of *Tomato torrado virus* infecting tomato in single and mixed infections with cucumber mosaic virus in Panama. *Plant Dis* 93:198-198
- Higgins D, Thompson J, Gibson T (1994) {CLUSTAL W}: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 128:280-291
- Hu J, Li H, Barry K, Wang M, Jordan R (1995) Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis* 79:902-906
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155:2011-2014
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol* 9:138-151
- Hull R, Matthews REF (2002). *Matthews's plant virology*. Academic Press, San Diego, USA, 1056 p.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17:377-386
- Hyman ED (1988) A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* 174:423-436
- Ikegami M, Onobori Y, Sugimura N, Natsuaki T (2000) Complete nucleotide sequence and the genome organization of patchouli mild mosaic virus RNA1. *Intervirology* 44:355-358
- Ikegami M, Kawashima H, Natsuaki T, Sugimura N (1998) Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of patchouli mild mosaic virus, a new favavirus. *Arch Virol* 143:2431-2434
- Ivars P, Alonso M, Borja M, Hernández C (2004) Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of *Pelargonium*

- flower break virus* and *Pelargonium line pattern virus*. Eur J Plant Pathol 110:275-283
- James D, Varga A, Pallas V, Candresse T (2006) Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. Can J Plant Pathol 28:16-29
- James D, Jelkmann W, Upton C (1999) Specific detection of *Cherry mottle leaf virus* using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR. Plant Dis 83:235-239
- Jiang D, Hou W, Sano T, Kang N, Qin L, Wu Z, Li S, Xie L (2013) Rapid detection and identification of viroids in the genus *Coleviroid* using a universal probe. J Virol Methods 187:321-326
- Jones D, Farreyrol K, Clover G, Pearson M (2008) Development of a generic PCR detection method for tobnaviruses. Australas Plant Pathol 37:132-136
- Jones R, Koenig R, Lesemann D (1980) *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). Ann Appl Biol 94:61-68
- Jones RA (2009) Plant virus emergence and evolution: origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. Virus Res 141:113-130
- Jordá C, Perez AL, Martinez Culebras P, Lacasa A (2001) First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. Plant Dis 85:1292-1292
- Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. Plant Mol Biol 35:993-1001.
- Kaiser, W. J. (1980). Use of thermotherapy to free potato tubers of alfalfa mosaic, potato leaf roll, and tomato black ring viruses. Phytopathology, 70:1119-1122.
- Karyeija R, Kreuze J, Gibson R, Valkonen J (2000) Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. Virology 269:26-36
- Kawasaki ES (1990) Amplification of RNA. PCR protocols: A guide to methods and applications, pp:21-22. Eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic Press, San Diego, USA

- Kobayashi YO, Kobayashi A, Nakano M, Hagiwara K, Honda Y, Omura T (2003) Analysis of genetic relations between *Broad bean wilt virus 1* and *Broad bean wilt virus 2*. *J Gen Plant Pathol* 69:320-326
- Kobayashi YO, Nakano M, Kashiwazaki S, Naito T, Mikoshiba Y, Shiota A, Kameya-Iwaki M, Honda Y (1999) Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species. *Arch Virol* 144:1429-1438
- Kobayashi Y, Kobayashi A, Hagiwara K, Uga H, Mikoshiba Y, Naito T, Honda Y, Omura T (2005) Gentian mosaic virus: a new species in the genus *Fabavirus*. *Phytopathology* 95:192-197
- Koh L, Cooper J, Wong S (2001) Complete sequences and phylogenetic analyses of a Singapore isolate of broad bean wilt fabavirus. *Arch Virol* 146:135-147
- Koonin EV, Dolja VV, Morris TJ (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:375-430
- Kumar S, Udaya Shankar A, Nayaka SC, Lund OS, Prakash H (2011) Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Lett Appl Microbiol* 53:359-363
- Kuroda T, Okumura A, Takeda I, Miura Y, Suzuki K (2000) Nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA from cloned cDNA of *Broad bean wilt virus 2* RNA 2. *Arch Virol* 145:787-793
- Kwok P (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:235-258
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- Lartey RT, Voss TC, Melcher U (1996) Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol Biol Evol* 13:1327-1338
- Lee R, Lehman PS, Navarro L (1999) Nursery Practices and Certification Programs for Budwood and Rootstocks. In *Citrus Health Management, Plant Health Management Series* pp:35-46. Eds Timmer LW, Duncan LW, APS Press, Minnesota, USA

- Lee U, Hong J, Choi J, Kim K, Kim Y, Curtis I, Nam H, Lim P (2000) Broad bean wilt virus causes necrotic symptoms and generates defective RNAs in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 90:1390-1395
- Letschert B, Adam G, Lesemann DE, Willingmann P, Heinze C (2002) Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J Virol Methods* 106:1-10
- Li H, Roossinck MJ (2004) Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J Virol* 78:10582
- Li WH (1993) Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J Mol Evol* 36:96-99
- Li W, Lewandowski DJ, Hilf ME, Adkins S (2009) Identification of domains of the *Tomato spotted wilt virus* NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390:110-121
- Liao Y, Pingli H, Senzhao C, Yao M, Zhang J, Liu J (2006) Plantibodies: A novel strategy to create pathogen-resistant plants. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 23:253-272
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452
- Lim M, Hong J, Song Y, Ryu K (2010) The complete genome sequence and genome structure of *Frangipani mosaic virus*. *Arch Virol* 155:1543-1546
- Lin HX, Rubio L, Smythe AB, Falk BW (2004) Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. *J Virol* 78:6666
- Lin HX, Rubio L, Smythe A, Jiminez M, Falk BW (2003) Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *J Gen Virol* 84:249
- Lin N, Hsu Y, Hsu H (1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828
- Lisa V, Boccardo G (1996) Fabaviruses: Broad bean wilt virus and allied viruses. In *Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes. The Plant*

- Viruses, vol. 5, pp. 229-250. Eds Harrison BD, Murant AF, Plenum Press, New York, USA
- Lisa V, Luisoni E, Boccardo G, Milne R, Lovisolo O (1982) *Lamium mild mosaic virus*: A virus distantly related to broad bean wilt. *Ann Appl Biol* 100:467-476
- Liu Y, Sun B, Wang X, Zheng C, Zhou G (2007) Three digoxigenin-labeled cDNA probes for specific detection of the natural population of Barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization. *J Virol Methods* 145:22-29
- Lopez C, Soler S, Nuez F (2005) Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Arch Virol* 150:619-627
- López C, Aramburu J, Galipienso L, Soler S, Nuez F, Rubio L (2011) Evolutionary analysis of tomato *Su-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *J Gen Virol* 92:210-215
- López MM, Bertolini E, Olmos A, Caruso P, Gorris MT, Llop P, Penyalver R, Cambra M (2003) Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int Microbiol* 6:233-243
- Lopez-Moya JJ, Abella DL. 1996. Transmisión de virus de plantas por insectos vectores. En *Patología Vegetal*. Vol 1, pp. 275-300. Eds G Llacer, MM Lopez, A Trapero, A Bello, Ed. Phytoma-España. Valencia, España
- Louro D, Accotto G, Vaira A (2000) Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *Eur J Plant Pathol* 106:589-592
- Lovisolo O (1958) Virus e piante spontanee. I. "Mosaico lieve del Lamium" nuovo virus di tipo maculatura anulare. *Boll.Staz.Pat.veg.Roma*, III ser 15:89-137
- Lozano G, Grande-Pérez A, Navas-Castillo J (2009) Populations of genomic RNAs devoted to the replication or spread of a bipartite plant virus differ in genetic structure. *J Virol* 83:12973-12983
- Luis-Arteaga M (1989) Virosis y micoplasmosis del pimiento cultivado al aire libre en España: identificación de virus y caracterización de cepas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, España

- Malek L, Sooknanan R, Compton J (1994) Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™). In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes* pp: 253-260. Ed Peter GI, Humana Press, Totowa, NJ, USA
- Maliogka V, Dovas C, Efthimiou K, Katis N (2004) Detection and Differentiation of Comoviridae Species using a Semi-nested RT-PCR and a Phylogenetic Analysis based on the Polymerase Protein. *J Phytopathol* 152:404-409
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39:D225-D229
- Martelli G, Agranovsky A, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts R, Dolja V, Hu J, Jelkmann W, Karasev A (2012) Family *Closteroviridae* In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp: 987-1001. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- Martín S, Alioto D, Milne R, Guerri J, Moreno P (2002) Detection of *Citrus psorosis virus* in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathol* 51:134-141
- Martín S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, García ML, Grau O, Guerri J, Moreno P (2004) Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur J Plant Pathol* 110:747-757
- Más P, Sánchez-Navarro J, Sánchez-Pina M, Pallás V (1993) Chemiluminescent and colorigenic detection of *Cherry leaf roll virus* with digoxigenin-labeled RNA probes. *J Virol Methods* 45:93-102
- Maury Y, Duby C, Khetarpal RK (1998) Seed certification for viruses. In *Plant Virus Disease Control*, pp:237-248, Editores Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H. APS Press, MN, USA
- Meunier A, Schmit J, Stas A, Kutluk N, Bragard C (2003) Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein*

- virus*, Beet soilborne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Appl Environ Microbiol* 69:2356-2360
- Micó MC, Sellés CC, Fernández A, Vásquez JH, Gutiérrez CJ (2012) Transmisión por semilla del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) y eficacia de tratamientos de desinfección de semilla. *Bol San. Veg. Plagas* 38:387-398
- Min B, Song Y, Ryu K (2009) Complete sequence and genome structure of *Cactus mild mottle virus*. *Arch Virol* 154:1371-1374
- Minutillo SA, Mascia T, Gallitelli D (2012) A DNA probe mix for the multiplex detection of ten artichoke viruses. *Eur J Plant Pathol* 134:459-465
- Montasser M, Tousignant M, Kaper J (1998) Viral satellite RNAs for the prevention of *Cucumber mosaic virus* (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Dis* 82:1298-1303
- Moreno P, Guerri J, Muñoz N (1990) Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80:477-482
- Morris J, Clover G, Harju V, Hugo S, Henry C (2001) Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for *Beet necrotic yellow vein virus* detection. *J Virol Methods* 95:163-169
- Morrison R (1999) Sampling in seed health testing. *Phytopathology* 89:1084-1087
- Morrison M, Thompson JR, Tepfer M (2008) Twenty years of transgenic plants resistant to *Cucumber mosaic virus*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:675-684
- Mortimer-Jones SM, Jones MGK, Jones RAC, Thomson G, Dwyer GI (2009) A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *J Virol Methods* 161:289-296
- Moya A, Holmes EC, González-Candelas F (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 2:279-288
- Mumford R, Metcalfe E (2001) The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Arch Virol* 146:2455-2460

- Mumford R, Barker I, Wood K (1994) The detection of *Tomato spotted wilt virus* using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 46:303-311
- Mumford R, Boonham N, Tomlinson J, Barker I (2006) Advances in molecular phytodiagnostics—new solutions for old problems. *Eur J Plant Pathol* 116:1-19
- Nagy PD (2008) Recombination in plant RNA viruses. In *Plant virus evolution* pp:133-164. Ed MJ Roossinck. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Nakamura S, Iwai T, Honkura R (1998) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Broad bean wilt virus 2*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 64:565-568
- Narváez G, Slimane Skander B, Ayllón MA, Rubio L, Guerri J, Moreno P (2000) A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J Virol Methods* 85:83-92
- Navarro, L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. *Proc 12th Conf Int Organ Citrus Virol* pp:383-391. Editores P Moreno, JV da Graça, LW Timmer, Univ Calif, Riverside, USA
- Navas-Castillo J, Camero R, Bueno M, Moriones E (2000) Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis* 84:835-837
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, USA. 352 p.
- Nevins JR (1983) The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annu Rev Biochem* 52:441-466
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:e63
- Ochoa-Corona FM, Tang J, Lebas BSM, Rubio L, Gera A, Alexander BJR (2010) Diagnosis *Broad bean wilt virus 1* and *Verbena latent virus* in *Tropaeolum majus* in New Zealand. *Australas Plant Pathol* 39:120-124
- Olmos A, Capote N, Bertolini E, Cambra M (2007a) Molecular diagnostic methods for plant viruses. In *Biotechnology and Plant Disease*

- Management, pp: 227–249. Eds Z.K. Punja, S. De Boer and H.I. Sanfaçon. CABI Publishing, Wallingford, UK
- Olmos A, Bertolini E, Cambra M (2007b) Isothermal amplification coupled with rapid flow-through hybridisation for sensitive diagnosis of *Plum pox virus*. *J Virol Methods* 139:111-115
- Olmos A, Bertolini E, Cambra M (2002) Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J Virol Methods* 106:51-59
- Pagán I, del Carmen Córdoba-Sellés M, Martínez-Priego L, Fraile A, Malpica JM, Jordá C, García-Arenal F (2006) Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 96:274-279
- Palukaitis P (2011) The Road to RNA Silencing is Paved with Plant-Virus Interactions. *Plant Pathol J* 27:197-206
- Palukaitis P, García-Arenal F (2003) Cucumoviruses. *Adv Virus Res* 62:241-323
- Pamilo P, Bianchi NO (1993) Evolution of the *Zfx* and *Zfy* genes: rates and interdependence between the genes. *Mol Biol Evol* 10:271-281
- Phillips JM (2004) Real-time RT-PCR: What Lies Beneath the Surface. In *A-Z of Quantitative PCR*, pp:49-85 Editor Bustin SA. International University Line, La Jolla, CA, USA
- Plyusnin A, Beaty B, Elliott R, Goldbach R, Kormelink R, Lundkvist Å, Schmaljohn C, Tesh R (2012) Family *Bunyaviridae* In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp: 725-741. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- Pond SLK, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SDW (2006) GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22:3096-3098
- Pond SLK, Frost SD (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* 22:1208-1222

- Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13757–13762
- Pospieszny H, Borodynko N, Obrepalska-Stepłowska A, Hasiów B (2007) The first report of *Tomato torrado virus* in Poland. *Plant Dis* 91:1364-1364
- Power AG, Flecker AS (2008) The role of vector diversity in disease dynamics. In *Infectious Disease Ecology: The effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems* pp: 30-47. Eds Ostfeld RS, Keesing F, Eviner VT, Princeton University Press, NJ, USA
- Prendeville HR, Ye X, Morris TJ, Pilson D (2012) Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *Am J Bot* 99:1033-1042
- Prins M, Laimer M, Noris E, SCHUBERT J, Wassenegger M, Tepfer M (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* 9:73-83
- Pybus OG, Suchard MA, Lemey P, Bernardin FJ, Rambaut A, Crawford FW, Gray RR, Arinaminpathy N, Stramer SL, Busch MP (2012) Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:15066-15071
- Qi Y, Zhou X, Li D (2000a) Complete nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the RNA1 of a Chinese isolate of *Broad bean wilt virus 2*. *Virus Genes* 20:201-207
- Qi Y, Zhou X, Xue C (2000b) Nucleotide sequence of RNA2 and polyprotein processing sites of a Chinese isolate of *Broad bean wilt virus 2*. *Prog Nat Sci* 10: 680–686 10:680-686
- Qu J, Ye J, Fang R (2007) Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* 81:6690-6699
- Rodríguez Y, Rangel E, Centeno F, Mendoza O, Parra A (2004) Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. *Rev. Fac. Agron. (LUZ, Venezuela)*, 21:105-115
- Rodríguez-Cerezo E, Moya A, García-Arenal F (1989) Variability and evolution of the plant RNA virus *Pepper mild mottle virus*. *J Virol* 63:2198

- Rogers SM, Payton M, Allen RW, Melcher U, Carver J, Fletcher J. (2012) Method: a single nucleotide polymorphism genotyping method for *Wheat streak mosaic virus*. *Investigative Genetics* 3:1-11.
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11:3-11
- Roossinck MJ, Zhang L, Hellwald KH (1999) Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J Virol* 73:6752-6758
- Roossinck MJ (2002) Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. *J Virol* 76:3382-3387
- Rubio L, Janssen D, Cuadrado IM, Moreno P, Guerri J (2003) Rapid detection of *Cucumber vein yellowing virus* by tissue-print hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J Virol Methods* 114:105-107
- Rubio L, Abou-Jawdah Y, Lin HX, Falk BW (2001a) Geographically distant isolates of the crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* show very low genetic diversity in the coat protein gene. *J Gen Virol* 82:929-933
- Rubio L, Ayllon MA, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P, Falk BW (2001b) Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75:8054-8062
- Rubio L, Ayllón M, Guerri J, Pappu H, Niblett C, Moreno P (1996) Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann Appl Biol* 129:479-489
- Rubio L, Guerri J, Moreno P (2013) Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Front Microbiol* 4:151
- Saade M, Aparicio F, Sanchez-Navarro J, Herranz M, Myrta A, Di Terlizzi B, Pallás V (2000) Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90:1330-1336

- Sacristán S, Diaz M, Fraile A, Garcia-Arenal F (2011) Contact transmission of *Tobacco mosaic virus*: a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. *J Virol* 85:4974
- Sacristán S, Malpica JM, Fraile A, Garcia-Arenal F (2003) Estimation of population bottlenecks during systemic movement of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. *J Virol* 77:9906-9911
- Sacristán S, Fraile A, García-Arenal F (2004) Population dynamics of *Cucumber mosaic virus* in melon crops and in weeds in Central Spain. *Phytopathology* 94:992-998
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Saldarelli P, Barbarossa L, Grieco F, Gallitelli D (1996) Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Dis* 80:1343-1346
- Salomone A, Roggero P (2002) Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *J Plant Pathol* 84:65-68
- Sambade A, Rubio L, Garnsey SM, Costa N, Müller GW, Peyrou M, Guerri J, Moreno P (2002) Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathol* 51:257-265
- Sambrook J, Russell DW, Russell DW (2001). Plasmids and their usefulness in molecular cloning. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanchez-Navarro J, Aparicio F, Herranz M, Minafra A, Myrta A, Pallas V (2005) Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* 111:77-84
- Sánchez-Navarro JA, Cañizares MC, Cano EA, Pallás V (1999) Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J Virol Methods* 82:167-175

- Sanfaçon H, Iwanami T, Karasev A, Van der Vlugt R, Wellink J, Wetzel T, Yoshikawa N (2012) Family *Secoviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp: 881-899. Eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, USA
- Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, van der Vlugt R, Wetzel T (2009) *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order Picornvirales that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Arch Virol* 154:899-907
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-5467.
- Sastry KS (2013) Methods of combating seed-transmitted virus diseases. In *Seed-borne plant virus diseases* pp:185-284. Springer, India
- Satapathy, M.K., 1998. Chemical control of insects and nematode vectors of plant viruses. In *Plant Virus Disease Control* pp. 188–195. Editores Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H, APS Press, St Paul, MN, USA
- Schena M, Davis RW (1999) Genes, Genomes, and Chips. In *DNA Microarrays: A Practical Approach*, pp:1–16. Editor Schena M, Oxford University Press, Oxford, UK
- Schneider WL, Roossinck MJ (2001) Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J Virol* 75:6566
- Scholthof KG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938-954
- Shriner D, Nickle DC, Jensen MA, Mullins JI (2003) Potential impact of recombination on sitewise approaches for detecting positive natural selection. *Genet Res* 81:115-121
- Sin S, McNulty BC, Kennedy GG, Moyer JW (2005) Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5168-5173

- Singh R, Nie X, Singh M, Coffin R, Duplessis P (2002) Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *J Virol Methods* 99:123-131
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792
- Soler S, Prohens J, Diez M, Nuez F (2002) Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in central and southern Peru. *J Phytopathol* 150:49-53
- Stewart CN, Halfhill MD, Warwick SI (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Rev Genet* 4:806-817
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 35:235-270
- Stubbs LL (1960) Aphid transmission of broad bean wilt virus and comparative transmission efficiency of three vector species. *Aust J Agric Res* 11:734-741
- Stubbs LL (1947) A destructive vascular wilt virus disease of broad bean (*Vicia faba* L.) in Victoria. *J Dept Agric Victoria* 46:323-332
- Syller J (2011) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol* 13:204-216
- Syvänen A (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Rev Genet* 2:930-942
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595
- Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, Mori M, Kaido M, Mise K, Tsuda S, Okuno T (2002) Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett* 532:75-79
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739

- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G C-content biases. *Mol Biol Evol* 9:678
- Tentchev D, Verdin E, Marchal C, Jacquet M, Aguilar JM, Moury B (2011) Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *J Gen Virol* 92:961-973
- Thompson J, Wetzel S, Klerks M, Vašková D, Schoen C, Špak J, Jelkmann W (2003) Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J Virol Methods* 111:85-93
- Thresh J, Scorer R, Harrington R, Pedgley D, Nuttall PA, Sellers R (1983) The long-range dispersal of plant viruses by arthropod vectors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc* 302:497-528
- Tian T, Rubio L, Yeh HH, Crawford B, Falk BW (1999) *Lettuce infectious yellows virus*: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol* 80:1111
- Tiberini A, Davino S, Davino M, Tomassoli L (2011) Complete sequence, genotyping and comparative analysis of *Pepino mosaic virus* isolates from Italy. *J Plant Pathol* 93:437-442
- Tiberini A, Barba M (2012) Optimization and improvement of oligonucleotide microarray-based detection of tomato viruses and pospiviroids. *J Virol Methods* 185:43-51
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677
- Tsompana M, Abad J, Purugganan M, Moyer JW (2005) The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Mol Ecol* 14:53-66
- Tumer NE, Hwang DJ, Bonness M (1997) C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3866-3871

- Uga H, Tsuda S (2005) A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology* 95:166-171
- Untiveros M, Perez-Egusquiza Z, Clover G (2010) PCR assays for the detection of members of the genus *Ilarvirus* and family *Bromoviridae*. *J Virol Methods* 165:97-104
- Uyemoto J, Provvidenti R (1974) Isolation and identification of two serotypes of broad bean wilt virus. *Phytopathology* 64:1547-1548
- Vaira A, Accotto G, Vecchiati M, Bragaloni M (2002) *Tomato infectious chlorosis virus* causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica* 30:290-294
- Vallad GE, Goodman RM (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci* 44:1920-1934
- Van der Vlugt, René AA, Berendsen M (2002) Development of a general potexvirus detection method. *Eur J Plant Pathol* 108:367-371
- Van Loon L, Bakker P, Pieterse C (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-483
- Van Wees SC, Pieterse CM, Trijssenaar A, Van't Westende YA, Hartog F, Van Loon LC (1997) Differential induction of systemic resistance in arabidopsis by biocontrol bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:716-724
- Verbeek M, Dullemans A (2012) First Report of *Tomato torrado virus* Infecting Tomato in Colombia. *J Virol Methods* 185:184-188
- Verbeek M, Dullemans A, Van den Heuvel J, Maris P, Van der Vlugt R (2007) Identification and characterisation of *Tomato torrado virus*, a new plant picorna-like virus from tomato. *Arch Virol* 152:881-890
- Verbeek M, Tang J, Ward LI (2012) Two generic PCR primer sets for the detection of members of the genus *Torradovirus*. *J Virol Methods* 185:184-188
- Verchot-Lubicz J, Charkowski A, Halterman D. (2012). Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology*, 6:1-14

- Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237:415-417
- Verhoeven JTJ, Van der Vlugt R, Roenhorst J (2003) High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *Eur J Plant Pathol* 109:419-425
- Verver J, Le Gall O, van Kammen A, Wellink J (1991) The sequence between nucleotides 161 and 512 of *Coupea mosaic virus* M RNA is able to support internal initiation of translation in vitro. *J Gen Virol* 72:2339-2345
- Vives MC, Rubio L, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2002) Low genetic variation between isolates of *Citrus leaf blotch virus* from different host species and of different geographical origins. *J Gen Virol* 83:2587-2591
- Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Rev Genet* 6:206-220
- Vurro M, Bonciani B, Vannacci G (2010) Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Sec* 2:113-132
- Wang M, Metzloff M (2005) RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:216-222
- Wang M, Waterhouse PM (2002) Application of gene silencing in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5:146-150
- Wang RL, Ding LW, Sun QY, Li J, Xu ZF, Peng SL (2008) Genome sequence and characterization of a new virus infecting *Mikania micrantha* HBK. *Arch Virol* 153:1765-1770
- Wei TY, Yang JG, Liao FL, Gao FL, Lu LM, Zhang XT, Li F, Wu ZJ, Lin QY, Xie LH (2009) Genetic diversity and population structure of *Rice stripe virus* in China. *J Gen Virol* 90:1025-1034
- Wei T, Clover G (2008) Use of primers with 5' non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. *J Virol Methods* 153:16-21
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370

- Wijkamp I, van Lent J, Kormelink R, Goldbach R, Peters D (1993) Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* 74:341-349
- Wintermantel WM, Cortez AA, Anchieta AG, Gulati-Sakhuja A, Hladky LL (2008) Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathology* 98:1340-1345
- Wintermantel WM, Wisler GC (2006) Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis* 90:814-819
- Wintermantel, W (2004) Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in north america *APS Net Plant Pathology Online publication*
- Wintermantel W, Wisler G, Anchieta A, Liu H, Karasev A, Tzanetakis I (2005) The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Arch Virol* 150:2287-2298
- Wisler GC, Duffus JE (2000) A century of plant virus management in the Salinas Valley of California, 'East of Eden'. *Virus Res* 71:161-169
- Wisler G, Li R, Liu H, Lowry D, Duffus J (1998) *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402-409
- Wisler G, Liu H, Klaassen V, Duffus J, Falk B (1996) *Tomato infectious chlorosis virus* has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of the closteroviruses. *Phytopathology* 86:622-626
- Wright S (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proceedings of the sixth international congress on genetics*, pp:356-366, Editor EF Jones, Brooklyn Bot Garden, NY, USA
- Xu WX, Hong N, Zhang JK, Wang GP (2006) Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *J Virol Methods* 135:276-280
- Yan Z, Reddy M, Ryu C, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW (2002) Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92:1329-1333

- YaoLiang Z, ZhongJian S, Jiang Z, XiaoLi L, Gong C, RuDuo L (2003) Preliminary characterization of *Pepino Mosaic Virus* Shanghai isolate (PepMV-Sh) and its detection with ELISA. *Acta Agric Shanghai* 19:90-92
- Yarwood C (1979) Host passage effects with plant viruses. *Adv Virus Res* 25:169-190
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-3415

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Juan José y María del Valle; a mis hermanos, Juan Carlos, Tanya del Valle, Juanita del Valle y José Arquímedes, por darme su apoyo incondicional para acometer esta emprendimiento.

A Carmen Teresa y a mi hijo, Ezequiel José, por haber asumido durante estos años con estoicismo el esfuerzo que implica la separación familiar “forzada”, con la certeza del oportuno regreso y basada en la idea del cumplimiento del deber. Espero que el tiempo nos permita entender que el camino seleccionado fue apropiado, a sabiendas que no era fácil.

A todas aquellas personas en el ámbito del INIA-Venezuela que hicieron posible esta enriquecedora experiencia.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, por el otorgamiento del crédito educativo que pese a las vicisitudes hizo posible el viaje y sustento de este servidor en España.

Quiero agradecer de manera especial, al Dr. Luis Rubio, director de mi Tesis doctoral, por haberme dado la oportunidad de participar en el grupo de investigación de virus en cultivos hortícolas del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Por tu amistad y nuestros “internacionales duelos de frontón” para mitigar el estrés de las largas jornadas frente a la bancada del laboratorio, en las cuales “la visión evolucionista” de los virus enriqueció mi experiencia previa en esta fascinante disciplina. También hiciste posible con tu apoyo moral y material, que pudiera completar la última fase de la tesis. Mi agradecimiento y amistad por siempre.

A mis codirectores, los Dres. Antonio Olmos-Castelló y Walter Salvatore Davino, por su apoyo material y logístico, que consolidaron varios de los productos de esta tesis.

A mi tutora, la Dra. Isabel Font San Ambrosio y a la Dra. Ana Alfaro, por su apoyo incondicional desde la Universidad Politécnica de Valencia, muchas veces acudí a vosotras y siempre estuvísteis allí, para lo que hiciera falta. A ustedes, mi afecto y amistad.

A mis compañeras de laboratorio, “las tres mosqueteras” Diana, Inma y Dolores, también a Ana Moreno, por toda la ayuda que me habéis dado a lo largo del trabajo, por todo su apoyo moral cuando la nostalgia familiar me acechaba, y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio. Las extrañaré mucho.

A Jesús, Karelia, Maruja y Pepe, del Laboratorio de Biología molecular del IVIA, vuestro apoyo siempre me acompañó con logística, fraternidad y más de una ocasión con amenas conversaciones y valiosos consejos. A Bertha Alquézar, por su apoyo en casos de emergencia ante alguna contingencia en la bancada.

A Stefano Panno, compañero de piso y de trabajo en algunos capítulos de la tesis, el “espagliano” resultó un buen catalizador de una nueva amistad internacional.

A Pablo y Víctor del equipo de informáticos del IVIA. A Santi y Pepe en recepción.

A los chicos de los invernaderos, el equipo imprescindible y silencioso que hace funcionar en el IVIA los bioensayos.

A mis compañeros y amigos del día a día en sala de becarios del IVIA, posdocs e investigadores incluidos, aquellos con quienes compartí innumerables almuerzos y amenas comidas en el singular horario gastronómico español, las paellas en ocasión de San Isidro, o alguna jornada bien entrada la noche en las bancadas, además de alguna actividad extra IVIA para el recuerdo: Toni Navarro, José Antonio Pina, María T. Gorris, Bertha, Verónica, Ana, Elsa, Regina, Mari Cruz, Montse, Rafa, Andrés, José, Jesús, Martha, Francesc, Frank, Edson, Belén, María Hernández, María Angeles, María Flores, Joseph, Neus, Silvia, Vidal, Daniel, Belén Beillure, Rosa-Mar, Susana, Giovanni, Jorge, Guillermo, Silvia Ambrós, Mari Carmen Vives, Gema Ancillo, Ramón Peñalver, Milagros López, Mariano Cambra, Pedro Moreno, José Guerri, Luis Navarro y Nuria Durán.