

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS.....	3
2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS.....	4
3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.....	5
3.1 Gama de huéspedes y síntomas.....	6
3.2 Diagnóstico.....	8
3.3 Transmisión.....	9
3.4 Control de la enfermedad.....	10
3.5 El virus de la tristeza de los cítricos.....	11
3.5.1 Organización genómica de CTV.....	12
3.5.2 Variabilidad.....	13
3.5.3 Expresión del genoma viral.....	14
3.5.4 Movimiento viral.....	17
3.5.5 Interacción virus-planta.....	19
3.5.5.1 Genes de resistencia.....	20
3.5.5.2 Silenciamiento	21
3.2.5.2.1 Supresores del silenciamiento.....	23
3.2.6 Análisis de las interacciones virus-planta: micromatrices.....	25
OBJETIVOS GENERALES.....	29

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS

1. INTRODUCCIÓN.....	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	38
2.2 Inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA indirecto).....	38
2.3 Cuantificación de RNA genómico.....	39
2.3.1 Extracción de RNA total.....	39
2.3.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	40
2.4 Inmuno-microscopía electrónica.....	41

3. RESULTADOS.....	42
3.1 Estimación de la concentración viral en planta mediante ELISA indirecto.	43
3.2 Estimación de la concentración viral en planta mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	45
3.3 Comparación ELISA vs. RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	53
4. DISCUSIÓN.....	55

CAPÍTULO II. ACTIVIDAD REPLICATIVA Y SILENCIAMIENTO VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS

1. INTRODUCCIÓN.....	63
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	64
2.2 Detección y cuantificación de sgRNAs de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	65
2.2.1 Extracción de RNA total.....	65
2.2.2 Síntesis de ribosondas específicas para cada aislado.....	65
2.2.3 Hibridación molecular tipo Northern blot.....	66
2.3 Detección y cuantificación de los siRNAs mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	67
2.3.1 Extracción de siRNAs.....	67
2.3.2 Hibridación molecular tipo Northern blot.....	68
2.4 RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	68
2.5 Ensayo de la capacidad supresora de la proteína p23 de distintos aislados de CTV.....	68
2.5.1 Clonación del gen <i>p23</i> en un plásmido binario.....	68
2.5.2 Ensayo de supresión de la expresión transitoria de GFP mediante agroinfiltración de <i>p23</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> 16c.....	70
2.5.3 Detección de la expresión del transgén <i>gfp</i> mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	71
2.5.4 Detección de los siRNAs específicos de <i>gfp</i> mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	72

3. RESULTADOS.....	72
3.1 Detección y cuantificación de los sgRNAs de los genes <i>p20</i> y <i>p23</i> en distintas especies infectadas.....	72
3.2 Detección y cuantificación de siRNAs derivados de CTV en plantas infectadas	77
3.3 Evaluación de la capacidad supresora de la proteína p23 de los distintos aislados de CTV.....	82
4. DISCUSIÓN.....	84

CAPÍTULO III. DISTRIBUCIÓN DE CTV EN EL HUÉSPED NARANJO AMARGO

1. INTRODUCCIÓN.....	97
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	98
2.2 Inmunoimpresión-ELISA.....	98
2.3 Estimación de la acumulación viral mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	99
2.4 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV mediante hibridación molecular en formato Northern blot.....	100
2.5 Determinación de la frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones	100
3. RESULTADOS.....	100
3.1 Análisis de la distribución de CTV en naranjo amargo de semilla mediante inmuno-impresión-ELISA.....	100
3.2 Acumulación de CTV en los distintos tejidos de naranjo amargo de semilla.....	103
3.3 Acumulación de CTV en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	104
3.4 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en distintos tejidos de naranjo amargo de semilla.....	110
3.5 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en corteza de naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	112

3.6 Frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	115
4. DISCUSIÓN.....	119

CAPÍTULO IV. CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE NARANJO AMARGO TRAS LA INFECCIÓN CON DOS AISLADOS DE CTV INDUCTORES DE DISTINTA SINTOMATOLOGÍA

1. INTRODUCCIÓN.....	129
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	130
2.1 Material vegetal y aislados de CTV.....	130
2.2 Diseño experimental.....	131
2.3 Preparación de las muestras de Cdna marcadas.....	132
2.3.1 Extracción de RNA total.....	132
2.3.2 Marcaje del cDNA.....	132
2.4 Hibridación con las micromatrices.....	133
2.5 Obtención de los datos de las micromatrices.....	133
2.6 Validación de los datos de expresión de las micromatrices mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	135
2.7 Tinción histológica.....	135
3. RESULTADOS.....	136
3.1 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado asintomático T385.....	137
3.2 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado sintomático T318A.....	140
3.2.1 Antes de la expresión del síndrome de SY (pre-SY).....	140
3.2.2 Tras la expresión del síndrome de SY (4 meses p.i.).....	141
3.2.3 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo inoculado con el aislado T318A asociados a la expresión del síndrome de SY.....	142
3.3 Validación de los resultados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	143

3.4 Histopatología de naranjo amargo infectado con los aislados sintomático y asintomático.....	145
4. DISCUSIÓN.....	146
DISCUSIÓN GENERAL.....	155
CONCLUSIONES GENERALES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	171

