



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



**EL VIRUS DEL MANCHADO FOLIAR DE LOS CÍTRICOS:
CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL RNA
SUBGENÓMICO DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA
Y DEL SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO DE RNA**

Memoria de Tesis doctoral presentada por:

AGUEDA RENOVELL FERRER

Directores:

M^a Carmen Vives García
José Guerri Sirera
Pedro Moreno Gómez

Valencia, 2010

Doña M^a Carmen Vives García, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora postdoctoral, Don José Guerri Sirera, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Investigador, Don Pedro Moreno Gómez, Doctor Ingeniero Agrónomo y Profesor Investigador, pertenecientes al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias,

CERTIFICAN:

que Doña Agueda Renovell Ferrer ha realizado bajo su dirección el trabajo con el título 'El virus del manchado foliar de los cítricos: caracterización del promotor del RNA subgenómico del gen de la proteína de la cápsida y del supresor del silenciamiento de RNA' presenta para el grado de Doctor.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 25 de Enero de 2010

M^a Carmen Vives García

Pedro Moreno Gómez

José Guerri Sirera

A mis padres

INDICE.....	I
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XIII
RESUM.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cultivo de los cítricos: origen e importancia económica.....	3
2. Mejora genética de los cítricos.....	4
3. Silenciamiento génico mediado por RNA.....	6
3.1. Antecedentes y funciones.....	6
3.2. Mecanismo del silenciamiento.....	7
3.3. Silenciamiento génico mediado por RNA en plantas.	11
3.3.1. Regulación de la expresión génica mediante micro RNAs.....	11
3.3.2. Heterocromatina y control de elementos transponibles.....	11
3.3.3. Defensa antiviral.....	12
3.4. Supresores del silenciamiento génico postranscripcional.....	13
3.4.1. Estrategias para la identificación de supresores	16
3.4.2. Mecanismos de acción de los supresores de silenciamiento.....	22
4. Vectores virales.....	25
4.1. Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS)...	25
4.2. Expresión de genes.....	28
5. Clones infecciosos de virus.....	31
6. Expresión génica de virus de RNA de cadena positiva...	33
6.1. Mecanismos de síntesis de sgRNAs.....	34
6.2. Promotores de sgRNAs.....	36
7. El virus del manchado foliar de los cítricos.....	39

7.1. Sintomatología, gama de huéspedes, transmisión e incidencia.....	39
7.2. Taxonomía, organización genómica y características moleculares.....	42
7.3. Diagnóstico de CLB.....	44
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	51
CAPÍTULO 1: Construcción y ensayos de infectividad de clones infecciosos de CLB en protoplastos.....	55
1.1. Introducción y objetivos.....	57
1.2. Resultados.....	58
1.2.1. Construcción de un clon de cDNA del genoma completo de CLB bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.....	58
1.2.2. Desarrollo de sistemas de inoculación de transcritos en protoplastos de <i>N. occidentalis</i> , <i>N. benthamiana</i> y cidro.....	59
1.2.2.1. Aislamiento de protoplastos de <i>N. occidentalis</i>	60
1.2.2.2. Aislamiento de protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	64
1.2.2.3. Aislamiento de protoplastos de cidro Etrog.....	67
1.2.2.4. Inoculación de protoplastos con transcritos de CLB.....	69
1.2.3. Inoculación directa de transcritos generados a partir del clon de CLB en plantas de <i>N. benthamiana</i> y cidro Etrog.....	72
1.3. Discusión.....	73

CAPÍTULO 2: Caracterización de los elementos implicados en el inicio y promoción de la síntesis del RNA subgenómico de la proteína de la cápsida de CLB	81
2.1. Introducción y objetivos.....	83
2.2. Resultados.....	85
2.2.1. Desarrollo de un sistema genético basado en la agroinoculación de hojas de <i>N. benthamiana</i> con un clon de cDNA de CLB.....	85
2.2.2. Determinación de la secuencia mínima promotora del sgRNA de la proteína de cápsida de CLB.....	88
2.2.3. Efecto de la modificación del inicio de transcripción en la síntesis del sgRNA de la cápsida.....	97
2.3. Discusión.....	101
CAPÍTULO 3: Identificación y caracterización de la proteína supresora del silenciamiento génico postranscripcional de CLB	107
3.1. Introducción y objetivos.....	109
3.2. Resultados.....	111
3.2.1. Clonación de los genes del virus en un vector binario.....	111
3.2.2. Identificación de la proteína supresora del silenciamiento de CLB a nivel intracelular.....	113
3.2.3. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento célula-célula por la proteína supresora de CLB.....	119

3.2.4. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento a larga distancia por las proteínas de CLBV.....	122
3.2.5. Ensayo de la supresión de silenciamiento por las proteínas de CLBV expresadas directamente desde su genoma.....	128
3.3. Discusión.....	131
MATERIALES Y MÉTODOS.....	137
1. Material biológico.....	139
1.1. Plantas.....	139
1.2. Bacterias.....	140
1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	140
1.2.1.1. Obtención de células de la cepa DH5 α competentes para su transformación mediante choque térmico.....	140
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	141
1.2.2.1. Obtención de células de la cepa COR 308 competentes para su transformación mediante electroporación.....	141
2. Generación de construcciones de cDNA.....	141
2.1. Obtención de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.....	141
2.2. Obtención de mutantes del clon infeccioso IC-CLBV.	145
2.2.1. Introducción de codones de parada en las proteínas de movimiento y cápsida de CLBV.	145
2.2.2. Delecciones del promotor del sgRNA de la cápsida de CLBV.....	148
2.2.2.1. Delecciones de la región 5' del promotor del CP-sgRNA.....	148

2.2.2.2. Delecciones de la región 3' del promotor del CP-sgRNA.....	150
2.2.2.3. Delecciones de las regiones 5' y 3' del promotor del CP-sgRNA.....	152
2.2.3. Mutaciones del hexanucleótido GAAAAG presente en el inicio de transcripción del CP-sgRNA.....	152
2.3. Clonación de los ORFS de CLB.....	154
3. Aislamiento de protoplastos.....	156
3.1. Protoplastos de <i>N. occidentalis</i>	156
3.2. Protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	157
3.3. Protoplastos de cidro Etrog.....	157
4. Preparación de inóculos.....	158
4.1. Purificación de viriones.....	158
4.2. Transcripción <i>in vitro</i>	159
4.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	159
5. Inoculación de construcciones.....	160
5.1. Inoculación de protoplastos con viriones.....	160
5.2. Inoculación de protoplastos con transcritos.....	161
5.3. Inoculación de plantas con transcritos.....	161
5.4. Inoculación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	162
6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	163
6.1. Extracción de RNA total a partir de protoplastos.....	163
6.2. Extracción de RNA total a partir de tejido agroinfiltrado.....	163
6.3. Extracción de RNAs de pequeño tamaño (siRNAs)...	163
7. Detección de ácidos nucleicos.....	164
7.1. RT-PCR.....	164
7.1.1. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.....	164
7.2. Detección mediante northern blot.....	165

7.2.1 Preparación de muestras.....	165
7.2.2. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.....	165
7.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	165
7.2.4. Electrotransferencia de los RNAs a membranas.....	166
7.2.5. Marcado de las ribosondas.....	166
7.2.6. Hibridación.....	167
8. Detección de GFP.....	168
CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA.....	177
AGRADECIMIENTOS.....	213

RESUMEN

RESUMEN

El trabajo incluido en esta tesis está encuadrado en un proyecto cuyo objetivo general es el desarrollo de un vector viral eficiente de expresión o silenciamiento de genes, basado en el virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV), que se pueda utilizar como una herramienta genética para: 1) evaluar de forma rápida la función de genes de cítricos u otros organismos que pudieran ser útiles para la mejora genética del cultivo y 2) para obtener plantas resistentes o tolerantes a patógenos y plagas de cítricos.

Para desarrollar un vector viral a partir del genoma de CLBV era necesario disponer de un clon infeccioso del virus y de métodos eficientes de inoculación del mismo en plantas de cítricos. Al inicio de este trabajo sólo se disponía de información sobre la construcción de un clon infeccioso del aislado T36 del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza virus*, CTV) y de su inoculación en plantas de cítricos. El único sistema que permitió la infección con este clon fue la inoculación de transcritos de RNA del genoma del virus en protoplastos de *Nicotiana benthamiana*, seguido de una amplificación de los viriones generados en ellos mediante sucesivos pases a nuevos protoplastos y la inoculación mecánica de los mismos en cítricos. Para reproducir el sistema genético desarrollado con CTV, se construyó un clon infeccioso de cDNA del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 del fago lambda y se pusieron a punto protocolos para el aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana*, *N. occidentalis* y cidro Etrog. CLBV replicó en protoplastos de las tres especies transfectados con viriones purificados, aunque el nivel de replicación fue muy bajo y sólo se detectó a partir de 4-5 días post inoculación (dpi), que es el tiempo máximo de supervivencia de los protoplastos en nuestras condiciones de trabajo. La multiplicación del virus en protoplastos inoculados con transcritos de CLBV fue menor, detectándose sólo en algunos experimentos de transfección

de protoplastos de *N. benthamiana*. Finalmente, la inoculación mecánica directa de plantas de cítricos o de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* con transcritos de RNA del virus fue infructuosa, a pesar de que estos transcritos eran capaces de infectar protoplastos.

Antes de modificar el clon infeccioso de CLBV para convertirlo en un vector viral eficiente, era necesario conocer la estrategia de expresión del genoma viral y caracterizar las secuencias implicadas en el reconocimiento y promoción de la síntesis de los RNAs subgenómicos (sgRNAs) para poder duplicar un promotor y expresar genes o fragmentos de genes mediante la formación de un nuevo sgRNA. Los estudios para caracterizar *in vivo* las secuencias implicadas en la promoción de los sgRNAs de virus de plantas se realizaron mediante la inoculación de transcritos del virus en protoplastos. Sin embargo, como el nivel de acumulación de CLBV en protoplastos inoculados con transcritos era muy bajo resultaba imposible utilizar este sistema genético. En el laboratorio se disponía de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor 35S de CaMV (IC-CLBV). Con este clon hemos desarrollado un sistema genético para caracterizar el promotor del sgRNA de la cápsida de CLBV (CP-sgRNA) *in vivo*, introduciendo directamente el cDNA en las células mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*. Para mapear el promotor del CP-sgRNA de CLBV se construyeron varios mutantes a partir del clon IC-CLBV mediante supresión de nucleótidos y mutagénesis dirigida. Los resultados obtenidos indican que la posible secuencia promotora del CP-sgRNA está comprendida entre los nucleótidos -67 y +50 con respecto al inicio de transcripción, por lo tanto sería suficiente una región nucleotídica igual o inferior a 117 nt para controlar la producción del CP-sgRNA. Sorprendentemente, la supresión de segmentos de tamaño creciente entre el inicio de traducción del gen de la CP y el inicio de transcripción del CP-sgRNA indujo mayor acumulación de dicho sgRNA, sugiriendo que esta secuencia podría modular negativamente la transcripción del CP-sgRNA.

En la secuencia de CLB_V, el hexanucleótido GAAAAG está presente en el extremo 5' del gRNA y de los dos sgRNAs 3' coterminales del virus. En este trabajo se estudió la importancia de esta secuencia en la síntesis del CP-sgRNA. Para ello se realizaron sustituciones y supresión de los distintos nucleótidos que la componen mediante mutagénesis dirigida. Las mutaciones del primer y segundo nucleótidos indujeron una disminución drástica en la acumulación del CP-sgRNA, sugiriendo que juegan un papel importante en el reconocimiento por parte de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) de CLB_V para la transcripción del CP-sgRNA. Por otra parte, la supresión de una A en el hexanucleótido o las mutaciones de la G (+6) no alteraron la acumulación del CP-sgRNA, sugiriendo que dichos nucleótidos no son esenciales para el reconocimiento por la RdRp.

Por otro lado, para contrarrestar el mecanismo de defensa de las plantas activado durante la infección viral, que está basado en el silenciamiento génico postranscripcional, muchos virus de plantas expresan proteínas supresoras que inhiben este silenciamiento a distintos niveles. Los virus con supresores muy potentes se pueden usar como vectores de expresión pero no son adecuados para su uso como vectores de silenciamiento porque el supresor podría interferir con la maquinaria de silenciamiento de la planta, impidiendo el silenciamiento del gen a estudiar. El estudio de los supresores de silenciamiento de CLB_V mostró que únicamente la proteína de movimiento del virus fue capaz de suprimir el PTGS (*Post-transcriptional gene silencing*) a nivel intracelular, pero no célula a célula ni a larga distancia. Esta proteína mostró una capacidad de supresión débil en comparación con otras proteínas de actividad supresora conocida. La proteína supresora del silenciamiento de CLB_V actúa interfiriendo con la maquinaria del silenciamiento después de la generación de los siRNAs (pequeños RNAs interferentes).

SUMMARY

The work presented in this PhD memory is included in a project whose main objective is the development of an efficient viral vector based on Citrus Leaf Blotch Virus (CLBV) for expressing or silencing genes in citrus. We expect to use this vector as a genetic tool for: 1) rapid function evaluation of citrus genes or genes from other species that could be useful for the genetic improvement of citrus species, and 2) obtaining resistant or tolerant plants against citrus specific pathogens or diseases.

To develop a viral vector based on CLBV genome it was necessary to have an infectious cDNA clone of the virus, and also efficient methods for inoculating CLBV in citrus plants. At the beginning of this work the only system available for citrus was an infectious clone from the *Citrus tristeza virus* (CTV). The only system allowing infectivity of this clone was inoculation of viral genomic RNA transcripts in *Nicotiana benthamiana* protoplasts, followed by amplification of the virions generated by successive serial passaging to new protoplasts and then mechanical virion inoculation to citrus plants. To reproduce the genetic system developed for CTV, we generated a cDNA infectious clone of the complete genome of CLBV under the T7 promoter of phage lambda, and we developed protocols for protoplast isolation from *N. benthamiana*, *N. occidentalis* and citron. CLBV replicated in protoplasts of these three species when transfected with purified virions, albeit replication level was low and CLBV could only be detected after 4-5 days post inoculation (dpi), which is the maximum time of protoplast survival in our experimental conditions. Viral multiplication in protoplasts inoculated with CLBV RNA transcripts was lower, and viral RNA could be detected only in a few transfections of *N. benthamiana* protoplasts. Finally, direct mechanical inoculation of citrus, *N. benthamiana* and *N. occidentalis* plants with viral RNA transcripts was unsuccessful, even if those transcripts were able to infect protoplasts.

Before converting the CLBV infectious clone into an efficient viral vector, it was necessary a better understanding of the expression strategy of the viral genome and characterizing the sequences involved in promotion of subgenomic RNA (sgRNA) synthesis, to duplicate its promoter and express foreign genes or gene fragments by formation of a new sgRNA. *In vivo* characterization of the sequences involved in sgRNA promotion of plant viruses has been done by inoculating protoplasts with viral RNA transcripts. However, because CLBV accumulation level in protoplasts inoculated with viral transcripts was too low we couldn't use this genetic system. Availability of an infectious cDNA clone of the complete CLBV genome under the CaMV 35S promoter (IC-CLBV) allowed us to develop a genetic system to characterize *in vivo* the sgRNA promoter of the CLBV coat protein gene (CP-sgRNA), by introducing the cDNA directly into the plant cells via *Agrobacterium*-mediated infiltration of *N. benthamiana* leaves. To map the CLBV CP-sgRNA promoter we generated several mutants from the IC-CLBV clone by nucleotide deletion and site-directed mutagenesis. Our results show that the CP-sgRNA promoter is located between nucleotides -67 and +50 from the transcription start site, and thus a 177 nucleotide segment or less would be enough to control the CP-sgRNA synthesis. Surprisingly, deletion of increasing fragments between the translation start site of the CP gene and the transcription start site of the CP-sgRNA induced higher sgRNA accumulation, suggesting that this sequence might modulate CP-sgRNA transcription.

In the CLBV sequence, the GAAAAG hexanucleotide is present at the 5' end of the gRNA and the two 3' coterminal sgRNAs of the virus. To assess the importance of this hexanucleotide in the CP-sgRNA synthesis we generated mutants at different positions by deletion and site-directed mutagenesis. Mutation of the first and second nucleotides induced a drastic reduction in CP-sgRNA accumulation, suggesting that these nucleotides are important in the

recognition by the CLBV RNA polymerase (RdRp) for CP-sgRNA transcription. On the other hand, elimination of an A from the hexanucleotide or mutations of G (+6) did not affect CP-sgRNA accumulation, suggesting that these nucleotides are not essential for RdRp recognition.

Finally, to counteract plant defense mechanism based on posttranscriptional gene silencing, many viruses express proteins that inhibit this silencing at different levels. Viruses with strong silencing suppressors can be used as expression vectors but are not adequate as silencing inducing vectors (VIGS) because the suppressor might interfere with the plant silencing machinery (PTGS), thus impairing silencing of the gene of interest. Analysis of the silencing suppressor proteins of CLBV showed that only its movement protein was able to suppress intracellular PTGS, but not cell to cell- or long distance silencing. This protein showed a weak suppressor activity when compared to other well known silencing suppressor proteins. CLBV silencing suppressor protein acts interfering with host silencing machinery after siRNA (small interfering RNA) generation.

RESUM

El treball inclòs en aquesta tesi està enquadrat dins d'un projecte que té com objectiu principal el desenvolupament d'un vector viral eficient d'expressió o silenciament de gens, basat en el virus del tacat foliar dels cítrics (CLBV), que es puga utilitzar com una ferramenta genètica per : 1) avaluar de forma ràpida la funció de gens de cítrics o altres organismes que pogueren ser útils per a la millora genètica del cultiu i 2) obtindre plantes resistents o tolerants a patògens i plagues de cítrics.

Per al desenvolupament d'un vector viral a partir del genoma de CLBV era necessari disposar d'un clon infecció del virus i de mètodes eficients per la seua inoculació en plantes de cítrics. A l'inici d'aquest treball només es disposava d'informació sobre l'obtenció d'un clon infecció de l'aïllat T36 del virus de la tristesa dels cítrics (CTV) i de la seua inoculació en plantes de cítrics. L'únic sistema que va permetre la infecció amb aquest clon va ser la inoculació de transcrits del genoma del virus en protoplasts de *N. benthamiana*, seguit d'una amplificació dels virions generats en ells per mitjà de successius passes a nous protoplasts i la seua inoculació mecànica en cítrics. Per reproduir el sistema genètic desenvolupat amb CTV, es va construir un clon infecció de cDNA del genoma complet de CLBV sota el promotor T7 del fag lambda i es va posar a punt protocols per l'aïllament de protoplasts de *N. benthamiana*, *N. occidentalis* i cidro Etrog. CLBV va replicar en protoplasts de les tres espècies transfectades amb virions purificats, encara que el nivell de replicació va ser molt baix i només es va detectar a partir de 4-5 dies post inoculació (dpi), coincidint amb el temps màxim de supervivència dels protoplasts en les nostres condicions de treball. La multiplicació del virus en protoplasts inoculats amb transcrits de CLBV va ser menor, detectant-se només en alguna de les transfeccions de protoplasts de *N.*

benthamiana. Finalment, la inoculació mecànica directa de plantes de cítrics o de *N. benthamiana* i *N. occidentalis* amb transcrits del virus va ser infructuosa, encara que aquests eren capaços d'infectar protoplasts.

Abans de modificar el clon infecció de CLBV per a convertir-ho en un vector viral eficient, era necessari conèixer l'estratègia d'expressió del genoma viral i caracteritzar les seqüències implicades en el reconeixement i la síntesi dels RNAs subgenòmics (sgRNAs) per tal de poder duplicar el promotor i expressar gens o fragments de gens per mitjà de la formació d'un nou sgRNA. La majoria dels estudis per a caracteritzar *in vivo* les seqüències implicades en la síntesi dels sgRNAs de virus de plantes han utilitzat la inoculació de transcrits del virus en protoplasts. En el nostre cas, com que el nivell d'acumulació de CLBV en protoplastos inoculats amb transcrits era molt baix resultava impossible utilitzar aquest sistema genètic. En el laboratori es disposava d'un clon infecció del genoma complet de CLBV sota el promotor 35S de CaMV (IC-CLBV). Amb aquest clon hem desenvolupat un sistema genètic per a caracteritzar el promotor del sgRNA de la càpsida de CLBV (CP-sgRNA) *in vivo*, introduint directament el cDNA en les cèl·lules per mitjà d'agroinfiltració de les fulles de *N. benthamiana*. Per al mapatge el CP-sgRNA de CLBV es van construir diversos mutants a partir del clon IC-CLBV per mitjà de supressió de nucleòtids i mutagènesi dirigida. Els resultats obtinguts indiquen que la possible seqüència promotora del CP-sgRNA està compresa entre els nucleòtids -67 i +50 respecte a l'inici de transcripció, per tant seria suficient una regió nucleotídica igual o inferior a 117 nt per a controlar la producció del CP-sgRNA. Sorprenentment, la supressió de segments de grandària creixent entre l'inici de traducció del gen de la CP i l'inici de transcripció del CP-sgRNA va induir major

acumulació del dit sgRNA, suggerint que aquesta seqüència podria modular la transcripció del CP-sgRNA.

En la seqüència de CLBV, l'hexanucleòtid GAAAAG està present en l'extrem 5' del gRNA i en els dos sgRNAs 3' coterminals del virus. En aquest treball es va estudiar la importància d'aquesta seqüència en la síntesi del CP-sgRNA. Per a això es van realitzar mutacions i supressió dels diferents nucleòtids que la componen per mitjà de mutagènesi dirigida. Les mutacions del primer i segon nucleòtid van induir una disminució dràstica de l'acumulació del CP-sgRNA, suggerint que aquests nucleòtids juguen un paper important en el reconeixement per part de la polimerasa (RdRp) de CLBV per a la transcripció del CP-sgRNA. D'altra banda, la supressió d'una A en l'hexanucleòtid o les mutacions de la G (+6) no van alterar l'acumulació del CP-sgRNA, suggerint que aquests nucleòtids no són essencials per al reconeixement de la RdRp.

Com a contradefensa al mecanisme de defensa de les plantes davant de la infecció viral basat en el silenciament gènic postranscripcional, molts virus de plantes expressen proteïnes que inhibeixen aquest silenciament a diferents nivells. Els virus que codifiquen supressors molt potents es poden usar com a vectors d'expressió però no són adequats per al seu ús com a vectors de silenciament (VIGS) ja que el supressor podria interferir amb la maquinària de silenciament de la planta (PTGS), impedint el silenciament del gen a estudiar. L'estudi dels supressors de silenciament de CLBV va mostrar que únicament la proteïna de moviment del virus era capaç de suprimir el PTGS a nivell intracel·lular, però no cèl·lula a cèl·lula ni a llarga distància. Aquesta proteïna va mostrar una capacitat de supressió dèbil en comparació amb altres proteïnes d'activitat supressora coneguda. La proteïna supressora del silenciament de CLBV actua interferint amb la maquinària del

silenciament després de la generació dels siRNAs (xicotets RNAs interferents).

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

1. Origen e importancia económica.

El término cítricos engloba al conjunto de especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, que están incluidos en la subfamilia *Aurantioidea* de la familia *Rutaceae*. Los cítricos son originarios del sudeste asiático y su cultivo probablemente se inició en China. Actualmente el cultivo de los cítricos se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del mundo comprendidas entre los paralelos 40º N y S. En España, se cultivan principalmente en las zonas costeras del Este y del Sur de la península, localizándose sobre todo en lugares próximos al litoral y en los valles de los ríos.

Las especies cítricas cultivadas se pueden englobar en cuatro grandes grupos: las naranjas, que incluyen naranjas dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y amargas (*C. aurantium* L.); las mandarinas, que incluyen satsumas (*C. unshiu* (Mak.) Marc.) y clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.); los limones (*C. limon* (L.) Burm. F.) y limas (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.); y los pomelos (*C. paradisi* Macf.).

Los cítricos constituyen el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo, con una superficie cultivada superior a los 7,6 millones de hectáreas y una producción en torno a los 115 millones de toneladas (FAO, 2007). España, con una superficie dedicada a este cultivo cercana a las 300.000 Ha y una producción anual que supera los 5 millones de toneladas, ocupa el quinto puesto en cuanto a producción total entre los países productores a nivel mundial, por detrás de Brasil, Estados Unidos, China y México.

España es el primer país productor de fruta fresca. Actualmente, más del 50% de la producción se dedica a la exportación, lo que convierte a los cítricos en una de las principales fuentes de entrada de divisas. Al valor directo de la producción hay que añadir el de una fuerte actividad económica secundaria dependiente de este

cultivo en forma de empresas de viveros, fertilizantes, confección de la fruta, etc. Si a ello se añade su valor social debido a la fuerte demanda de mano de obra que el cultivo y comercialización de los frutos generan a lo largo del año, se comprenderá la importancia de la producción cítrica en España.

Debido a lo anteriormente expuesto es de vital importancia el mantenimiento de la producción y competitividad de este sector y ello depende en gran medida de la disponibilidad de material vegetal de alta calidad, tanto en variedades como en patrones.

2. Mejora genética de los cítricos.

La mejora genética de cítricos presenta importantes limitaciones debido a su compleja biología reproductiva. La mayoría de especies y variedades son poliembriónicas debido a la apomixis o embrionía nucelar, es decir producen embriones nucleares idénticos a la planta madre, por ello en muchos casos no hay desarrollo del embrión sexual.

Por otra parte, muchos genotipos de interés presentan esterilidad parcial o total del polen y/o de los óvulos, además de autoincompatibilidad y de incompatibilidad entre ellos, lo que complica su utilización como parentales.

Además, los cítricos presentan largos periodos juveniles. En zonas subtropicales necesitan hasta 8 años para empezar a florecer y fructificar, y unos años más para tener características plenamente adultas.

Otro problema de los cítricos es su elevada heterocigosis. Las progenies presentan una gran segregación de caracteres lo que hace muy complicada la recuperación de individuos con las características deseadas. Tampoco se conoce el modo de herencia de la mayoría de los caracteres de interés agronómico.

Debido a estos problemas, la realización de programas de mejora clásica similares a los existentes en otras especies, obligaría a evaluar durante muchos años una gran cantidad de hectáreas de árboles individuales lo que es irrealizable en la práctica. Esta es la causa de que los patrones y variedades comerciales de cítricos que se han obtenido mediante programas de mejora sean muy escasos en el mundo, limitándose a alguna variedad de mandarino y algún portainjerto. La práctica totalidad de las variedades cultivadas proceden de la selección de mutaciones espontáneas que se producen en los cítricos con relativa frecuencia.

Todas estas dificultades, unidas a la falta de marcadores moleculares apropiados, complican la mejora de los cítricos por métodos clásicos. Una forma de acelerar la mejora de cítricos es la aproximación genómica, cuyo objetivo es la identificación de genes responsables de caracteres de interés agronómico. Con este objetivo, en un proyecto conjunto IVIA, Universidad Politécnica de Valencia y CSIC, dentro de la Acción Estratégica de Genómica y Proteómica financiado por la CICYT y la Conselleria d'Agricultura i Peixca (<http://genomica.ibmcp.upv.es>) se obtuvieron 52 genotecas de cDNA de distintos tejidos y estadios del desarrollo y de plantas sometidas a diferentes estreses bióticos y abióticos (Forment et al., 2005 y datos no publicados). La secuenciación de los clones obtenidos en estas genotecas ha generado una colección de 230.000 ESTs (Expressed Sequence Tags). La posible función de algunos ESTs se ha inferido por homología con genes de otros organismos, pero más del 50% de ellos no presentan homología con otros genes conocidos. Con estas colecciones de ESTs se ha elaborado una micromatriz que contiene 21081 unigenes (Martinez-Godoy et al., 2008) y que está siendo utilizada por distintos grupos de investigación para definir patrones de expresión génica en distintos tejidos, estadios del desarrollo del fruto (floración, fructificación, maduración) (Cercós et al., 2006; Alós et al., 2008) como respuesta a diversos tratamientos de estrés abiótico (salinidad, sequía, deficiencia en hierro, etc.) (Agustí et al., 2008;

Huerta et al., 2008) o biótico (virus, hongos, etc.) (Gandía et al., 2007) y para distinguir variedades (Ancillo et al., 2007).

La disponibilidad de secuencias y de perfiles de expresión génica permite la identificación de genes candidatos a participar en un determinado proceso biológico, pero no aporta información sobre su función ni identifica cuáles son los genes responsables de un determinado proceso. Una estrategia utilizada en los últimos años para determinar la función de genes es la genética reversa utilizando el silenciamiento génico postranscripcional inducido por virus (VIGS) (*Virus-induced gene silencing*). Esta estrategia consiste en la sobre-expresión de un gen de la planta incluido en el genoma de un virus (vector viral), lo que induce el PTGS de la planta produciendo la degradación del RNA homólogo, y como consecuencia de ello la planta muestra el fenotipo de la pérdida de función del gen analizado.

3. Silenciamiento génico mediado por RNA.

3.1. Antecedentes y funciones.

Las primeras evidencias de la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA se obtuvieron en la década de los 90 al estudiar la sobreexpresión del gen que codifica la chalcona sintetasa en plantas de petunia. Dos grupos de investigación independientes comprobaron que la sobreexpresión de este gen en petunias transgénicas provocaba en sus pétalos una disminución de la pigmentación debido a una inesperada reducción en los niveles de expresión del correspondiente RNA mensajero (mRNA) (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al., 1990). Más adelante este mecanismo se identificó en otros organismos eucariotas, (Fire et al., 1998; Kennerdell y Carthew, 1998; Zamore et al., 2005) lo que permitió su caracterización.

El silenciamiento génico es un mecanismo presente en los cuatro reinos eucariotas (protozoos, hongos, plantas y animales) a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Baulcombe, 2004). Las moléculas efectoras del silenciamiento génico son pequeñas moléculas de RNA (sRNAs) de 21 a 30 nt. Hay tres tipos de sRNAs bien caracterizados que son los miRNAs (microRNAs), los siRNAs (small interfering RNAs) y los piRNAs (piwiRNAs) aunque estos últimos sólo están presentes en animales. Se diferencian entre sí por su mecanismo de biogénesis ya que cada clase de sRNAs tiene distintos tipos de transcritos primarios o precursores (Kutter y Svoboda, 2008).

En los últimos años se han descubierto distintas funciones en las que está implicado el silenciamiento génico mediado por RNA y que consisten en: i) control de la expresión de genes en momentos clave del desarrollo y proliferación (Carthew, 2006; Zhang et al., 2006; Chapman y Carrington, 2007; Jones-Rhoades et al., 2006; Wang y Li, 2007), ii) defensa frente a virus, transposones y transgenes (Voinnet, 2005a; Li y Ding, 2006; Valli et al., 2009), y iii) regulación de la estabilidad del genoma (Baulcombe, 2004; Lippman y Martienssen, 2004; Wassengger, 2005; Vaucheret, 2006; Rodríguez-Campos y Azorín, 2007). El silenciamiento puede ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células (Matzke y Birchler, 2005). La relevancia de cada una de las funciones del silenciamiento génico mediado por RNA es variable entre los distintos organismos ya que, mientras la regulación de la expresión génica y el control de elementos transponibles pueden funcionar en multitud de organismos eucariotas, la defensa frente a virus parece tener mayor relevancia en plantas e insectos (Baulcombe, 2004).

3.2. Mecanismo del silenciamiento.

El silenciamiento génico mediado por RNA se desencadena a partir de RNAs bicatenarios (dsRNAs) o monocatenarios (ssRNAs)

muy estructurados que pueden originarse a partir de la transcripción en el núcleo, durante las infecciones virales o por la acción de RNA polimerasas dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDR) que lo sintetizan a partir de ssRNA. Estos RNAs son reconocidos por enzimas tipo Dicer (Dicer-like, DCLs), que poseen dominios tipo RNasa III (Fire et al., 1998; Bernstein et al., 2001; Molnár et al., 2005; Liu et al., 2009). Dichas ribonucleasas generan fragmentos pequeños de dsRNA (siRNAs) de 21 a 30 nucleótidos, que contienen dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3' de sus cadenas de ambas polaridades (Zhang et al., 2004). Una helicasa separa estos siRNAs y sólo una de las cadenas se incorpora a un complejo efector llamado RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Hammond et al., 2000). Dicho complejo contiene proteínas de la familia Argonauta (AGO) (Hock y Meister, 2008; Vaucheret, 2008), formadas por un dominio PAZ y un dominio Piwi con actividad RNasa. El dominio PAZ, al igual que en la proteína Dicer, participa en el reconocimiento de los nucleótidos protuberantes de los extremos 3' de los siRNAs, mientras que el dominio Piwi reconoce el extremo 5' del mRNA (Parker et al., 2004). En el silenciamiento génico transcripcional (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) el complejo efector RITS (RNA-induced transcriptional silencing complex) es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une, induciendo su metilación, bloqueando su transcripción, participando en la formación de la heterocromatina (Verdel et al., 2004). En el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), el complejo efector RISC es guiado hasta un RNA de secuencia complementaria bloqueando su traducción o degradándolo (Hammond et al., 2000).

Al mecanismo de silenciamiento se suman otros elementos que no están presentes en todos los organismos, como son la amplificación y diseminación de la señal de silenciamiento. La señal de silenciamiento puede verse amplificada mediante la síntesis de nuevos dsRNAs por la acción de una RNA polimerasa celular

dependiente de RNA ('RNA-dependent RNA polymerase', RdRp) (Wassenegger y Krczal, 2006). Esta polimerasa utiliza como cebador la cadena negativa de los siRNAs primarios generados en la primera respuesta, para formar más dsRNAs a partir del mRNA. Estos dsRNAs son reconocidos por la enzima Dicer formándose nuevos siRNAs secundarios (Sijen et al., 2001, 2007) y amplificando así el proceso de PTGS (Baulcombe, 2004).

En las plantas, la respuesta del silenciamiento génico no se limita a las células donde se inicia sino que es capaz de propagarse célula-célula a través de los plasmodesmos (Himber et al., 2003) y a larga distancia por el sistema vascular (Crete et al., 2001; Voinnet, 2005b; Kalantidis et al., 2008) mediante el movimiento de los siRNAs de 21 nt (Parrish y Fire, 2001). Cuando estos siRNAs penetran en las nuevas células, pueden inducir el silenciamiento mediante su incorporación al complejo RISC o pueden servir de cebadores para la síntesis de nuevos dsRNAs que darían lugar a siRNAs secundarios (Fig. 1).

La evolución del silenciamiento como un mecanismo regulador en eucariotas ha supuesto una proliferación y diversificación de todos los componentes clave de las rutas del silenciamiento. Las proteínas Dicer y las RdRps, en algunos linajes se han especializado para producir distintos tipos de sRNAs. En este contexto, las proteínas Argonautas también han evolucionado y desarrollado una serie de funciones relacionadas con la amplificación y la biogénesis de los siRNAs secundarios, el corte específico de RNAs diana o el bloqueo de su traducción, y el reclutamiento de factores que modifican la cromatina. También numerosos loci que codifican miRNAs han surgido y evolucionado como elementos reguladores transcripcionales de la expresión génica. Por lo tanto, tras los procesos de especialización que han experimentado estos mecanismos de silenciamiento mediados por RNA, se han constituido un conjunto de diversas rutas reguladoras basadas en

siRNAs cuya función principal es el control de la expresión génica (Chapman y Carrington, 2007).

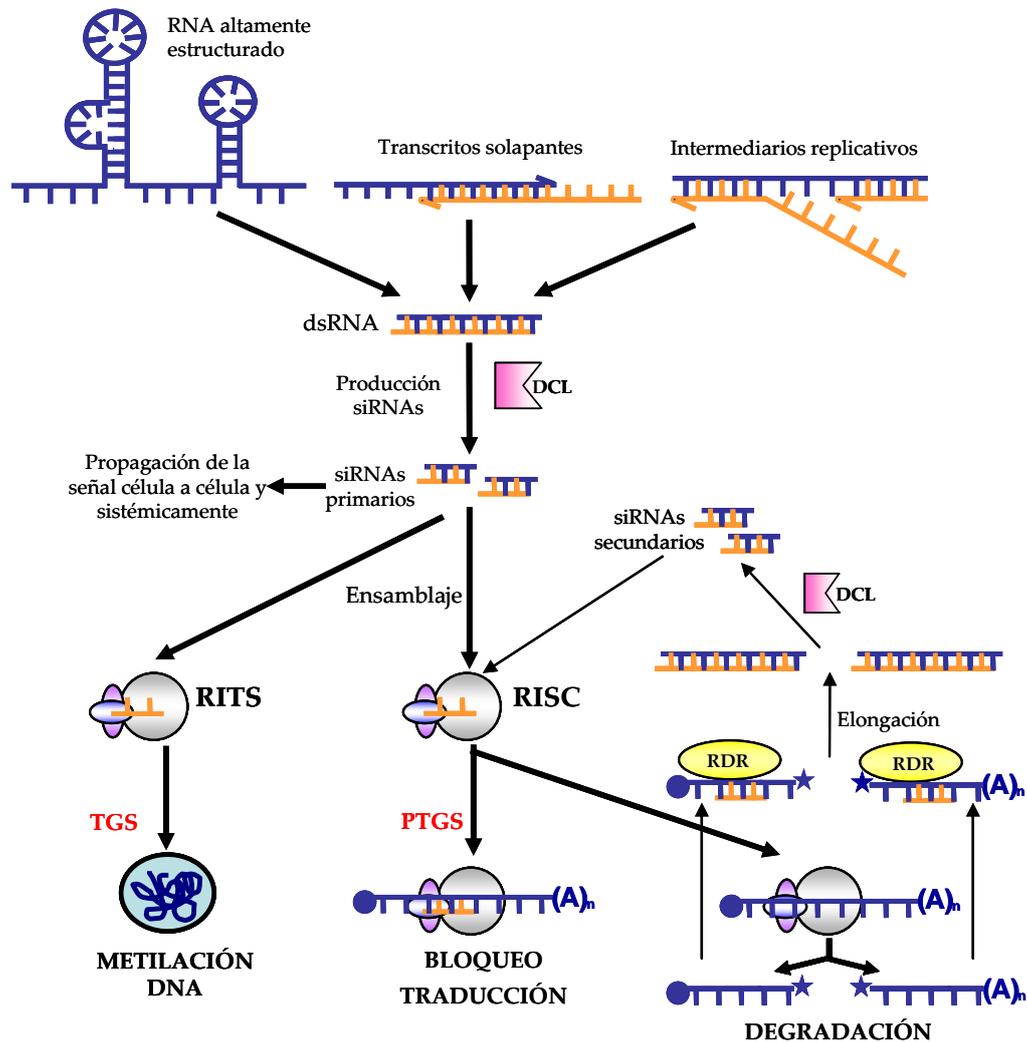


Figura 1. Mecanismo del silenciamiento génico mediado por RNA. El proceso se inicia a partir de la formación de dsRNA o ssRNA con estructura secundaria. El dsRNA es procesado por enzimas Dicer (DCL) para formar siRNAs. Estos se incorporan a complejos proteicos (RITS o RISC) desencadenando i) la metilación de un DNA (TGS) o ii) el bloqueo de la traducción o la degradación de mRNAs (PTGS), respectivamente. La señal de silenciamiento puede ser amplificada mediante la formación de los siRNAs secundarios generados por la acción de DCL

sobre dsRNAs producidos por una RdRp utilizando como cebador la cadena negativa de los siRNAs primarios y el mRNA. La propagación de la señal de silenciamiento puede ocurrir célula a célula o a larga distancia por el sistema vascular.

3.3. Silenciamiento génico mediado por RNA en plantas.

3.3.1. Regulación de la expresión génica mediante micro-RNAs.

En las plantas existen genes que codifican RNAs altamente estructurados con porciones de doble cadena, que son procesados por enzimas tipo Dicer para dar lugar a RNAs de 21 a 24 nt denominados micro-RNAs (miRNAs) (Bartel, 2004). Cada precursor suele dar lugar a un miRNA mediante la acción de DCL1 y éste último se incorpora a un complejo RISC donde induce su acción. Los miRNAs tienen secuencias complementarias a los RNAs mensajeros de diversos genes con los que hibridan, promoviendo su corte y posterior degradación (Jones-Rhoades et al., 2006). Los genes descritos cuya expresión está regulada por miRNAs son con frecuencia factores de transcripción y genes implicados en el desarrollo (Baulcombe, 2004).

La regulación de los genes mediante miRNAs presenta ventajas respecto a otros mecanismos de regulación génica, es mucho más rápida que la regulación mediante una disminución de la transcripción, lo que facilita que se produzcan cambios rápidos en el metabolismo o cambios muy localizados en tejidos concretos. Además, un único miRNA puede regular varios genes de una misma o de distintas rutas metabólicas, siempre que éstos contengan secuencias complementarias al miRNA, lo que facilita la coordinación en los cambios de expresión de varios genes.

3.3.2. Heterocromatina y control de elementos transponibles.

Una de las funciones del silenciamiento mediado por RNA es el control de la actividad de elementos transponibles a través de la

formación de la heterocromatina. Los elementos transponibles, transposones y retrotransposones, son secuencias de DNA muy abundantes en el genoma de eucariotas que tienen la capacidad de moverse de un punto a otro del genoma. La actividad de estos elementos implica la posibilidad de que se produzcan mutaciones o reorganizaciones perniciosas del genoma que pueden ser controladas a través de la formación de la heterocromatina. La heterocromatina está constituida por DNA altamente condensado y mayoritariamente inactivo. Su formación da lugar a ciertas modificaciones como la metilación del DNA y de ciertos aminoácidos de las histonas. En este proceso el silenciamiento mediado por RNA juega un papel importante ya que los siRNAs son capaces de provocar la metilación del DNA con el que tienen homología de secuencia. También se ha observado que la alteración de ciertos genes implicados en el silenciamiento mediado por RNA causa una reducción en la metilación del DNA y una mayor actividad de elementos transponibles, lo que implica a este mecanismo en el control de la actividad de estos elementos potencialmente dañinos para la estabilidad del genoma (Hull, 2002; Xie et al., 2004).

3.3.3. Defensa antiviral.

Los virus son parásitos intracelulares capaces de transmitirse de un organismo huésped a otro y de utilizar la maquinaria celular del huésped al que infectan para replicarse, causándole alteraciones en el metabolismo y el desarrollo. En las plantas, una de las funciones del silenciamiento mediado por RNA es la defensa frente a virus. Muchos virus, en alguna etapa de su replicación, utilizan como intermediarios replicativos moléculas de dsRNA a partir de las cuales se desencadena el silenciamiento génico postranscripcional induciendo la formación de siRNAs (Tenllado y Diaz-Ruiz, 2001; Voinnet, 2005a). Los dsRNAs se pueden formar por distintos mecanismos: i) en virus cuyo genoma está constituido por RNA,

durante la replicación producen RNAs complementarios al RNA viral, ii) en algunos virus, algunas regiones de su genoma poseen alta estructura secundaria que induce la formación de siRNAs correspondientes a esas zonas concretas de su genoma, iii) en virus cuyo genoma está constituido por DNA se pueden formar dsRNAs durante la transcripción de sus mRNAs mediante la acción de enzimas RpRd dependientes del huésped, iv) en el caso de los viroides, éstos patógenos están formados por un RNA monocatenario, aunque su alto grado de estructura secundaria les otorga algunas características moleculares más propias de moléculas bicatenarias, y además durante su replicación sintetizan moléculas de polaridad negativa, dando lugar a moléculas de dsRNA.

3.4. Supresores del silenciamiento génico postranscripcional.

Como hemos indicado anteriormente, las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa que degrada el RNA viral. Sin embargo, muchos virus son capaces de sintetizar proteínas que inhiben este mecanismo a distintos niveles, disminuyendo, por tanto, la defensa del huésped frente a la infección viral.

Las proteínas supresoras del PTGS tienen un origen evolutivo distinto, aunque comparten una función en común, que es contrarrestar este mecanismo de defensa de la planta. La mayoría de estas proteínas suelen ser determinantes de patogenicidad del virus y están relacionadas con la multiplicación y movimiento del mismo dentro de la planta.

Los primeros trabajos en los que se identificaron proteínas virales como supresoras del silenciamiento del RNA se realizaron en plantas. Se observó que la expresión estable de la proteína HC-Pro del virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) en plantas transgénicas de tabaco permitía una mayor acumulación de diferentes virus debido a que esta proteína bloqueaba el mecanismo de defensa de la planta (Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau y

Carrington, 1998). Posteriormente se descubrieron proteínas supresoras en virus de otros organismos eucariotas como *Drosophila melanogaster* (Li et al., 2002; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006a), *Caenorabditis elegans* (Lehner et al., 2006), hongos (Segers et al., 2006) y animales (Li et al., 2002; Li y Ding, 2005). Las proteínas supresoras del silenciamiento génico postranscripcional identificadas hasta el momento en virus de plantas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Supresores del silenciamiento de virus de plantas (adaptada de Valli et al., 2009).

Genero virus	*Virus	Proteína supresora	Referencias
Virus RNA de cadena positiva			
Bromoviridae			
<i>Cucumovirus</i>	CMV	2b	(Brigneti et al.,1998; Goto et al., 2007; Zhang et al., 2006)
	TAV	2b	(Chen et al., 2008; Li et al., 1999)
Closteroviridae			
<i>Closterovirus</i>	BYV	P21	(Chapman et al., 2004; Reed et al., 2003; Ye y Patel, 2005)
	BYSV	P22	(Reed et al., 2003)
	CTV	P20	(Lu et al., 2004)
		P23	
		CP	
GLRaV-2	P24	(Chiba et al., 2006)	
<i>Crinivirus</i>	SPCSV	P22	(Kreuze et al., 2005)
	ToCV	P22	(Cañizares et al., 2008)
		CP	
		CPm	
Comoviridae			
<i>Comovirus</i>	CPMV	S-CP	(Liu et al., 2004b)
Flexiviridae			
<i>Potexvirus</i>	PVX	P25	(Voinnet et al., 2000)
<i>Trichovirus</i>	ACLSV	P50	(Yaegashi et al., 2007)
<i>Vitivirus</i>	GVA	P10	(Chiba et al., 2006; Zhou et al., 2006)
Luteoviridae			
<i>Polerovirus</i>	BMV	P0	(Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Pazhouhandeh et al., 2006; Pfeffer et al., 2002)
	ICTVdB	P0	(Pfeffer et al., 2002)
	PLRV	P0	(Pfeffer et al., 2002)
Potyviridae			
<i>Ipomovirus</i>	CUYV	P1b	(Valli et al., 2009)
<i>Potyvirus</i>	TEV	HCPPro	(Anandalakshmi et al., 2000; Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau y Carrington, 1998; Lakatos et al., 2006; Mérai et al., 2006)
	TMV	HCPPro	(Brigneti et al.,1998)
	TUMV	HCPPro	(Kasschau et al., 2003)

	PPV	HCP _{ro}	(Tenllado et al., 2003)
	ZYMV	HCP _{ro}	(Lin et al., 2007; Shibolet et al., 2007)
	SCMV	HCP _{r0}	(Zhang et al., 2008a)
Tombusviridae			
<i>Aureusvirus.</i>	PoLV	P14	(Méraï et al., 2005)
<i>Carmovirus</i>	TCV	CP(P38)	(Deleris et al., 2006; Méraï et al., 2006; Qu et al., 2003; Thomas et al., 2003)
	HCRSV	CP	(Meng et al., 2006)
<i>Tombusvirus</i>	CyRSV	P19	(Lakatos et al., 2004; Silhavy et al., 2002)
	TBSV	P19	(Omarov et al., 2006; Voinnet et al., 1999)
Tymoviridae			
<i>Tymovirus</i>	TYMV	P69	(Chen et al., 2004)
No asignados			
<i>Benyvirus</i>	BNYVV	P14	(Dunoyer et al., 2002a)
		P31	(Rahim et al., 2007)
<i>Furovirus</i>	SBWMV	19K	(Te et al., 2005)
<i>Hordeivirus</i>	BSMV	γb	(Yelina et al., 200)
	PSLV		
<i>Pecluvirus</i>	PCV	P15	(Dunoyer et al., 2002b; Méraï et al., 2006)
<i>Sobemovirus</i>	RYMV	P1	(Voinnet. et al., 1999)
	CoMV	P1	(Sarmiento et al., 2007)
<i>Tobamovirus</i>	TMV	126K	(Csorba et al., 2007; Ding et al., 2004; Méraï et al., 2006)
	ToMV	130K	(Kubota et al., 2003)
	PMMoV	130K	(Tsuda et al., 2007)
<i>Tobravirus</i>	TRV	16K	(Liu et al., 2002; Martínez-Hernández y Baulcombe, 2008; Martínez-Priego et al., 2008)
Virus RNA de cadena negativa			
Bunyaviridae			
<i>Tospovirus</i>	TSWV	NS _s	(Bucher et al., 2003; Takeda et al., 2002)
No asignados			
<i>Tenuivirus</i>	RHBV	NS3	(Bucher et al., 2003; Hemmes et al., 2003; Schnettler et al., 2008)
Virus RNA doble cadena			
Reoviridae			
<i>Phytoreovirus</i>	RDV	Pns 10	(Cao et al., 2005)
Virus DNA			
Caulimoviridae			
<i>Caulimovirus</i>	CaMV	P6	(Haas et al., 2008; Love et al., 2007)
Geminiviridae			
<i>Begomovirus</i>	ACMV	AC4	(Chellappan et al., 2005; Love et al., 2007)
	EACMV-CM	AC2	(Vanitharani et al., 2004)
	ICMV	AC2	(Vanitharani et al., 2004)
	MYMV	AC2	(Trinks et al., 2005; Vanitharani et al., 2004)
	SLCMV	AC2	(Vanitharani et al., 2004)
	TGMV	AC2	(Wang et al., 2003; Wang et al., 2005)
	ToLCJAV	AC2, βC1	(Kon et al., 2007)
	TYLCCNV	AC2	(van Wezel et al., 2002)
<i>Curtovirus</i>	TYLCV	V2	(Glick et al., 2008)
	BCTV	C2	(Wang et al., 2003; Wang et al., 2005)

*Virus: CMV, *Cucumber mosaic virus*; TAV, *Tomato aspermy virus*; BYV, *Beet yellows virus*; BYSV, *Beet yellows stunt virus*; CTV, *Citrus tristeza virus*; GLRaV-2, *Grapevine leafroll-associated virus-2*; SPCSV, *Sweet potato chlorotic stunt virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; CPMV, *Cowpea mosaic virus*; PVX, *Potato virus X*; ACLSV, *Apple chlorotic leaf spot virus*; GVA, *Grapevine virus A*; BWYV, *Beet western yellows virus*; CABYV, *Cucurbit aphid-born yellows virus*; PLRV, *Potato leafroll virus*; CVYV, *Cucumber vein yellowing virus*; TEV, *Tobacco etch virus*; TMV, *Tobacco mosaic virus*; TuMV, *Turnip mosaic virus*; PPV, *Plum plox virus*; ZYMV, *Zucchini yellow mosaic virus*; SCMV, *Sugarcane mosaic virus*; PoLV, *Pothos latent virus*; TCV, *turnip crinkle virus*; HCRSV, *Hibiscus chlorotic ringspot virus*; CyRSV, *cymbidium ringspot virus*; TBSV, *tomato bushy stunt virus*; TYMV, *Turnip yellow mosaic virus*; BNYVV, *Beet necrotic yellow vein virus*; SBWMV, *Soil-borne wheat mosaic virus*; BSMV, *Barley stripe mosaic virus*; PSLV, *Poa semilatifolia virus*; PCV, *Peanut clump virus*; RYMV, *Rice yellow mottle virus*; CoMV, *Cocksfoot mottle virus*; ToMV, *Tomato mosaic virus*; PMMoV, *Pepper mild mottle virus*; TRV, *Tobacco rattle virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; RHBV, *Rice hoja blanca virus*; RDV, *Rice dwarf virus*; CaMV, *Cauliflower mosaic virus*; ACMV-CM, *African cassava mosaic virus-Cameroon*; EACMV-CM; ICMV, *Indian cassava mosaic virus*; MYMV, *Mungbean yellow mosaic virus*; SLCMV, *Sri lanka cassava mosaic virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; ToLCJAV, *Tomato leaf curl Java virus*; TYLCCNV, *Tomato yellow leaf curl China*; TYLCV, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*; BCTV, *Beet curly top virus*.

3.4.1. Estrategias para la identificación de supresores.

Se han empleado diferentes estrategias para identificar proteínas supresoras de silenciamiento codificadas por virus:

- 1) Expresión de la proteína desde un vector viral.

En este ensayo se emplean plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan constitutivamente el gen de la proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) y las hojas se agroinfiltran simultáneamente con el vector binario que expresa GFP y un vector viral que contiene el gen de la proteína candidata a suprimir el silenciamiento. Si la proteína candidata tiene actividad supresora en la zona agroinoculada se observa fluorescencia verde mientras que en las hojas co-inoculadas con GFP y el vector vacío se desencadena el silenciamiento de GFP y no se observa fluorescencia verde.

(Cañizares et al., 2008). Como hemos indicado anteriormente, los supresores del silenciamiento suelen ser determinantes de patogenicidad, por lo que su expresión desde un vector viral suele inducir síntomas en las plantas inoculadas (Brigneti et al., 1998; Voinnet et al., 1999; Saenz et al., 2001; Cañizares et al., 2008; Martínez-Turiño y Hernández 2009) (Fig. 2.1).

2) Expresión estable.

En este sistema se realiza un cruzamiento entre una planta transgénica que expresa constitutivamente la proteína candidata y otra planta transgénica que contiene un gen delator que está silenciado (el más utilizado es el gen GUS que codifica para la proteína β -glucuronidasa) (Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau y Carrington 1998; Dunoyer et al., 2004). Alternativamente, la proteína candidata se puede expresar desde un vector viral. Si la proteína candidata tiene actividad supresora del silenciamiento se produce la expresión del gen delator (Fig. 2.2.A). Esta estrategia también permite determinar si la proteína supresora inhibe el movimiento de la señal de silenciamiento a larga distancia. Para ello se utiliza como patrón una planta transgénica que expresa el GUS y la proteína viral candidata a suprimir el silenciamiento. Como control se utilizan plantas que contienen sólo el gen delator silenciado. Sobre los dos patrones se injerta una línea transgénica que expresa GUS. En las plantas donde el patrón no tiene supresor de silenciamiento a larga distancia, la señal de silenciamiento se mueve silenciando el GUS del injerto. Por el contrario, si la proteína supresora del patrón inhibe el silenciamiento o el movimiento de la señal a larga distancia, el GUS del injerto no se silencia (Guo y Ding, 2002; Mallory et al., 2001, 2003) (Fig. 2.2.B).

3) Complementación heteróloga.

Este método se basa en la complementación funcional de una proteína candidata por una proteína con actividad supresora conocida. La proteína candidata del virus estudiado se elimina, lo

que conduce a una reducción en la acumulación sistémica y una disminución de los síntomas. La complementación en *cis*- o en *trans*- con una proteína supresora conocida restablece los síntomas y/o la multiplicación del virus, lo que sugiere que la proteína candidata tiene actividad supresora (Yelina et al., 2002; Chiba et al., 2006; Powers et al., 2008) (Fig. 2.3).

4) Silenciamiento inverso.

La estrategia consiste en infectar plantas que contienen un gen delator silenciado (normalmente GFP) con el virus candidato y determinar si el fenotipo silenciado revierte. Habitualmente se utilizan plantas transgénicas de *N. benthamiana* línea 16C que expresan GFP [color verde bajo luz ultravioleta (U.V.)]. Estas plantas se infiltran con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un plásmido que expresa el gen *gfp* lo que desencadena en la planta el silenciamiento de GFP mediante degradación de su mRNA, produciendo una disminución de la fluorescencia verde (color rojo bajo luz ultravioleta). En este momento se inocula el virus y se observa el fenotipo de las plantas. Si se restaura la expresión de GFP, indica que el virus probablemente codifica un supresor de silenciamiento (Voinnet et al., 1999) (Fig. 2.4).

5) Expresión transitoria mediante coinfiltración con *Agrobacterium*.

Es el método más empleado por la facilidad y la rapidez con las que se identifica la actividad supresora de una proteína (Voinnet et al., 2000; Johansen y Carrington, 2001).

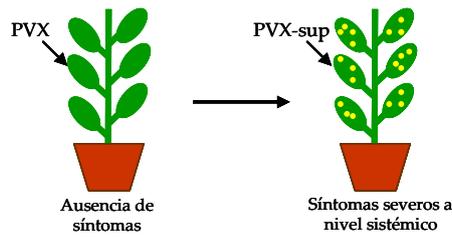
En este ensayo se agroinoculan simultáneamente plantas transgénicas que expresan GFP (línea 16C) con dos vectores binarios que portan el gen *gfp* y el gen candidato, respectivamente. En ausencia de supresor del silenciamiento, la sobre-expresión de GFP por agroinoculación del gen *gfp* genera un incremento de la transcripción que desencadena en la planta el silenciamiento de GFP mediante degradación de su mRNA. Este puede visualizarse bajo luz U.V con un aumento de la fluorescencia roja de la clorofila, mientras

que en presencia del supresor, el mRNA del GFP se acumula más observándose un aumento de la fluorescencia verde (Llave et al., 2000; Qu et al., 2003; Cañizares et al., 2008; Martínez-Turiño y Hernández, 2009) (Fig. 2.5.A).

Una variación de este ensayo puede proporcionar información sobre el mecanismo de acción del supresor. La agroinfiltración de una construcción que expresa una secuencia en tandem invertido del gen delator junto con otra que expresa la proteína supresora permite distinguir entre supresores que interfieren con la síntesis de dsRNAs a partir de un ssRNA y aquellos que actúan en una etapa posterior a la producción de dsRNAs (Johansen y Carrington, 2001).

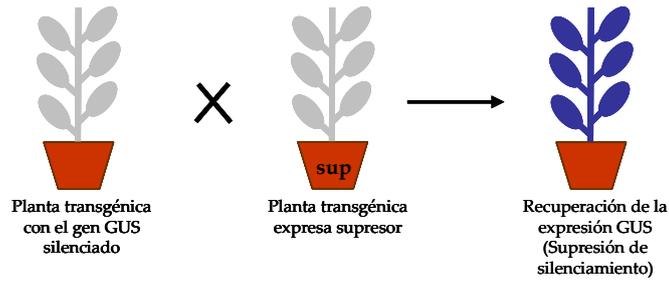
Este ensayo también permite discernir si la proteína ensayada es capaz de suprimir la señal de silenciamiento célula a célula y/o a larga distancia (Cañizares et al., 2008). Dicho ensayo se puede realizar de dos maneras distintas: una en la que las dos construcciones se agroinfiltran simultáneamente en la misma zona de la hoja (Fig. 2.5.B) y otra en la que las dos construcciones se agroinfiltran en la misma hoja pero por separado, una en el ápice de la hoja y la otra en la base. A continuación se observa la evolución a lo largo del tiempo de la fluorescencia de las hojas superiores no agroinfiltradas. Si la proteína no es un supresor de la señal de silenciamiento a larga distancia, ésta se mueve sistémicamente induciendo el silenciamiento del GFP de las hojas superiores, que se observa por un aumento de la fluorescencia roja, mientras que si el supresor de silenciamiento actúa a larga distancia la señal de silenciamiento está bloqueada y las hojas superiores no se silencian.

2.1) Expresión de la proteína supresora desde un vector viral

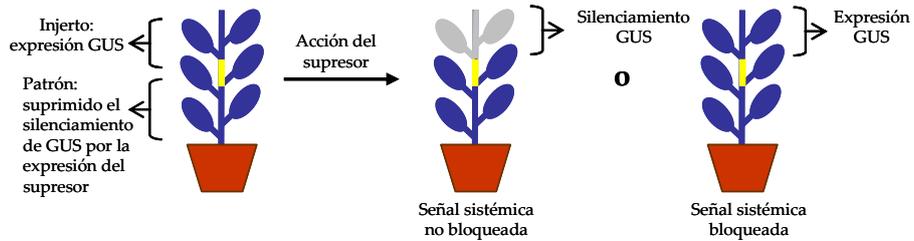


2.2) Expresión estable

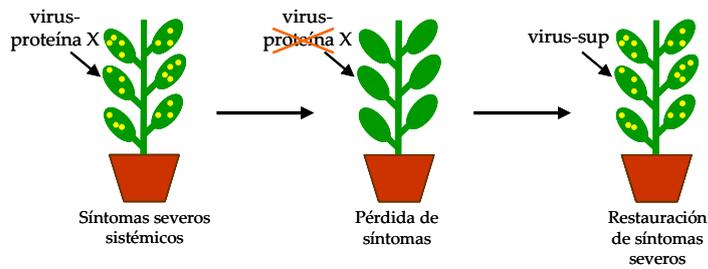
A)



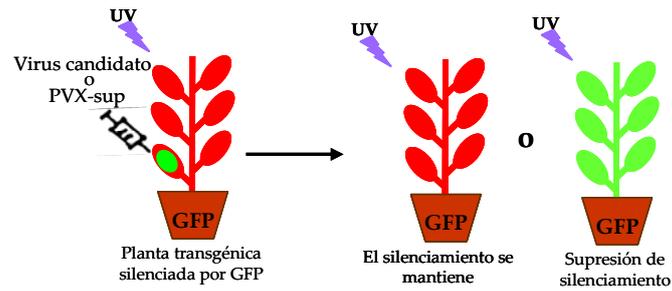
B)



2.3) Complementación heteróloga



2.4) Silenciamiento inverso



2.5) Expresión transitoria mediante *Agrobacterium*

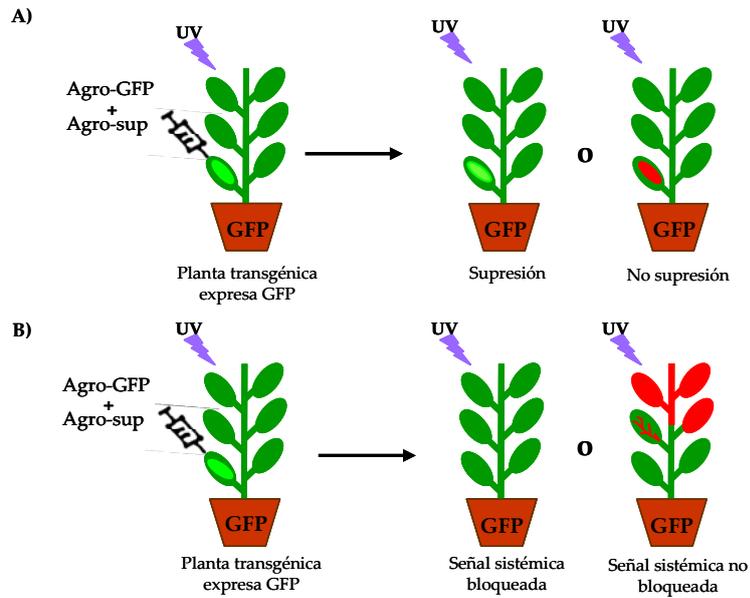


Figura 2. Representación esquemática de los ensayos que permiten identificar los supresores virales del silenciamiento génico mediado por RNA (Fig. adaptada de Moissiard y Voinnet, 2004). 2.1) Expresión de la proteína supresora desde un vector viral. 2.2) Expresión estable. 2.3) Complementación heteróloga. 2.4) Silenciamiento inverso. 2.5) Expresión transitoria mediante *Agrobacterium*: A) Supresión a nivel local B) Supresión a nivel sistémico.

3.4.2. Mecanismo de acción de los supresores del silenciamiento.

Los supresores identificados hasta el momento no comparten secuencias aminoacídicas conservadas ni características estructurales comunes. Estas diferencias tan grandes sugieren que los supresores de silenciamiento virales se han originado recientemente y de forma independiente. La actividad supresora del silenciamiento se ha identificado en proteínas de cápsida y de movimiento, en proteínas asociadas a la transmisión del virus por vectores, en factores de replicación de RNA y en activadores transcripcionales. Sin embargo, aunque los supresores estén alejados filogenéticamente, han adoptado mecanismos de acción similares.

El mecanismo molecular de la supresión del silenciamiento por proteínas se ha determinado en un número limitado de virus pero se sabe que es muy específico y que actúa a distintos niveles de la ruta del silenciamiento (Valli et al., 2009). Algunos supresores boquean el proceso en etapas clave, ya que afectan a la actividad de Dicer o RISC, sin embargo otros actúan en etapas menos importantes (Takeda et al., 2002; Ding y Voinnet, 2007). Otros supresores no afectan al silenciamiento intracelular pero suprimen el silenciamiento a larga distancia, como la P50 del virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACSLV) (Yaegashi et al., 2007) y la CP del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Lu et al., 2004). Por otro lado, existen supresores que pueden actuar en más de una etapa del silenciamiento, como la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), que inhibe la actividad RISC y evita la propagación de la señal de silenciamiento sistémica (Zhang et al., 2006; Guo y Ding, 2002) (Fig. 3).

Teniendo en cuenta el nivel en el que actúan los supresores, éstos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

En un primer grupo se incluyen los supresores que interaccionan con RNA. Dentro de este grupo existen supresores que

interaccionan (i) con moléculas de dsRNA independientemente del tamaño que tengan éstas (Méraï et al., 2006), como la proteína P38 del virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) (Qu et al., 2003) y la P14 del virus latente del pothos (*Pothos latent virus*, PoLV) (Méraï et al., 2005) o (ii) con pequeños siRNAs, que es la estrategia más frecuente entre los supresores, como por ejemplo las proteínas P19 del virus de las manchas anulares del cymbidium (*Cymbidium ringspot virus*, CyRSV) (Lakatos et al., 2004), P21 del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV) (Reed et al., 2003) y HcPro del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) (Méraï et al., 2006) (Fig. 3).

En un segundo grupo se incluyen los supresores que interaccionan con proteínas de la planta implicadas en el mecanismo de silenciamiento. Estos supresores pueden (i) interferir en la actividad endonucleolítica de Dicer, como la proteína P38 de TCV (Deleris et al., 2006) y la P6 del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) (Haas et al., 2008), (ii) interferir en la acción endonucleolítica del complejo RISC, como por ejemplo la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus* CMV) (Zhang et al., 2006) y la proteína PO del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet western yellows virus*, BWYV) (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007), (iii) impedir el paso de amplificación del RNA, como las proteínas P69 del virus del amarilleo del nabo (*Turnip yellow virus*, TuYV) (Chen et al., 2004) y la V2 del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Glick et al., 2008), (iv) interactuar con otras proteínas que no son reconocidas como componentes de la maquinaria del silenciamiento de RNA, como la proteínas AC2 del virus del mosaico dorado del tomate (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) y la C2 del virus del ápice rizado de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV) (Wang et al., 2003; Wang et al., 2005), y (v) inducir la expresión o activación de reguladores negativos endógenos del silenciamiento, como la proteína AC2 del virus del mosaico amarillo del “frijol mungo”

(*Mungbean yellow mosaic virus-Vigna*, MYMV-vig.) (Trinks et al., 2005) (Fig. 3).

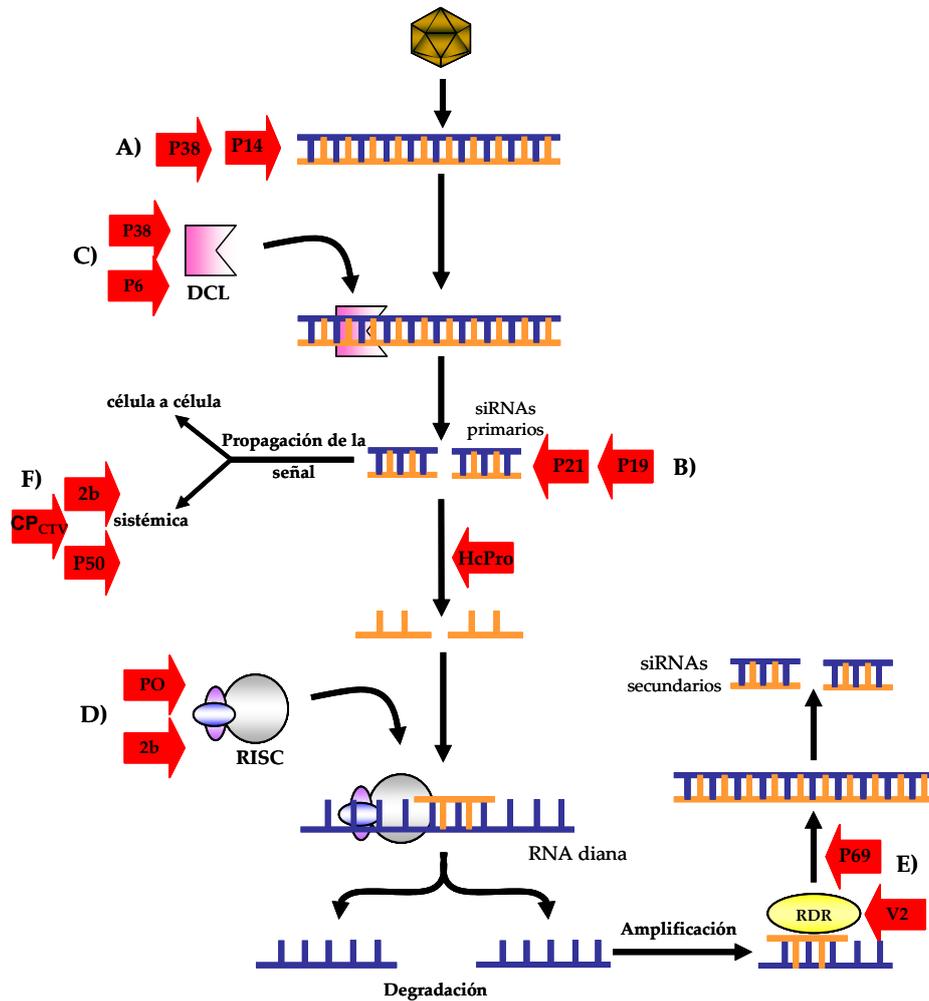


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de silenciamiento y de los niveles en los que interfieren los supresores virales. A) Captura de dsRNAs largos por parte del supresor evitando que actúe la enzima Dicer. B) Secuestro de las moléculas de siRNAs mediante interacción directa entre el supresor y los siRNAs. C) Interfiere en la actividad endonucleotídica de Dicer D) Interacción directa entre el supresor y RISC. E) Bloqueo de la amplificación de la señal de silenciamiento. F) Inhibición de la señal de silenciamiento intercelular sistémica.

4. Vectores virales.

Recientemente se ha empezado a utilizar el genoma de diversos virus como vector para silenciar o expresar genes heterólogos en plantas.

4.1. Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS).

Como hemos comentado anteriormente, una estrategia muy atractiva utilizada en los últimos años para determinar la función de genes es la genética reversa utilizando el silenciamiento génico postranscripcional inducido por virus (VIGS). Se sabe que cuando un virus infecta una planta se forman, en el proceso de replicación del mismo, intermediarios de doble cadena que activan el mecanismo de PTGS que degrada el genoma del virus. Además se sabe que estructuras secundarias del genoma del virus también pueden actuar como diana para la activación del PTGS (Scitty et al., 2002; Molnar et al., 2005). El VIGS es una tecnología que explota ese mecanismo de silenciamiento. Para ello, el genoma de un virus se utiliza como vector en el que se introducen genes o fragmentos de genes de la planta. Cuando se inocula el virus modificado, el procesamiento de dsRNA del genoma del virus por la nucleasa Dicer da lugar también a la degradación del gen insertado en su genoma, originando los siRNAs que dirigen la degradación de los RNAs mensajeros del gen homólogo o conjunto de genes homólogos a la secuencia que se ha clonado en el virus y la planta muestra el fenotipo de la pérdida de función del gen ensayado (Burch-Smith et al., 2004; Robertson, 2004; Caplan y Dinesh-Kumar, 2006; Unver y Budak, 2009; Velásquez et al., 2009).

La utilización de los vectores virales tiene ventajas sobre la mutagénesis o la transformación genética ya que permite ensayar la función de numerosos genes en un corto periodo de tiempo. Esto es especialmente crítico en el caso de los cítricos, que poseen largos periodos juveniles (normalmente 6-8 años), donde la transformación

de plantas adultas es muy difícil y son necesarios largos periodos de tiempo entre la transformación y la fructificación. Otra ventaja es que permite estudiar la función de genes que son esenciales para el crecimiento o el desarrollo de la planta. En los estudios mediante mutagénesis o transformación genética, la falta de función hace que ésta pueda morir durante la germinación o la regeneración, mientras que con el vector viral el RNA diana sólo se silencia cuando el virus infecta la planta (Peele et al., 2001). Además, con el VIGS se reduce el problema de la redundancia funcional. Debido a la alta homología de secuencia que presentan los genes pertenecientes a una misma familia entre sí, al expresar uno de ellos desde un vector viral se suelen silenciar todos a la vez. Por otro lado, debido a que algunos virus puede infectar distintas especies vegetales, esta tecnología permite determinar rápidamente la función de un mismo gen en diferentes especies. Un ejemplo es el vector viral basado en el virus del cascabeleo del tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV), que se ha empleado para estudiar la función de genes en *N. benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* y tomate (Liu et al., 2002, 2004; Valentine et al., 2007).

Como inconveniente de la estrategia VIGS está la posibilidad de que los síntomas inducidos por la infección viral enmascaren el fenotipo originado por el silenciamiento del gen de interés.

La tecnología VIGS se ha usado con unos pocos virus en un número limitado de cultivos (Burch-Smith et al., 2004; Robertson, 2004; Godge et al., 2008) (Tabla 2). Se ha empleado para conocer la función de genes relacionados con: defensa de la planta frente a patógenos (virus, bacterias y hongos), estrés abiótico, señalización celular, procesos del metabolismo o del desarrollo (revisado en Godge et al., 2008) y para inducir resistencia frente a virus (Culver, 1996; Goregaoker et al., 2000) y nemátodos (Valentine et al., 2007).

Tabla 2. Virus de plantas empleados como vectores virales de silenciamiento (adaptada de Godge et al., 2008).

*Virus/ Satélite	Género	Hospedadores naturales	Hospedadores silenciados	Genes silenciados	Referencia
ACMV	Begomovirus	<i>Manihot esculenta</i>	<i>N.benthamiana</i> , <i>M.esculenta</i>	<i>pds, su, cyp</i> <i>79d2</i>	Fofana et al. (2004)
BSMV	Hordeivirus	Cebada, trigo, avena, maiz, espinacas	Cebada, trigo	<i>pds</i>	Holzberg et al.(2002); Scofield et al. (2005)
BPMV	Comovirus	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Glycine max</i>	<i>G.max</i>	<i>pds</i>	Zhang y Chabrial (2006)
BMV	Bromovirus	Cebada	Cebada, trigo, maiz	<i>pds, actin 1</i> , <i>rubisco</i> <i>activaasa</i>	Ding et al. (2006)
CLCV	Begomovirus	Col, brócoli, coliflor	<i>Arabidopsis</i>	<i>gfp, CH42</i> , <i>pds</i>	Turnage et al. (2002)
PEBV	Tobravirus	<i>Pisum sativum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>P.sativum</i>	<i>Pspds, uni</i> , <i>kor</i>	Constantini et al. (2004)
PopMV	Carlavirus	Álamo	<i>N.benthamiana</i>	<i>gfp</i>	Naylor et al. (2005)
PVX	Potexvirus	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Brassica campestris</i> <i>ssp.rapa</i>	<i>N.benthamiana</i> , <i>S. tuberosum</i>	<i>gfp, pds</i>	Ruiz et al. (1998); Faivre-Rampant et al.(2004)
STMV	RNA satélite virus	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>N.tabacum</i>	Varios genes	Gossele et al. (2002)
TMV	Tobamovirus	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>N.benthamiana</i> , <i>N.tabacum</i>	<i>Pds, psy</i>	Kumagai et al. (1995)
TRV	Tobravirus	Amplio rango hospedadores	<i>N.benthamiana</i> , <i>Arabidopsis</i> , tomate, especies solanum, pimienta Chilli, apio poppy, <i>Aquilegia</i>	<i>Rar1, EDS1</i> , <i>NPR1/NIM1</i> , <i>pds, rbcS, gfp</i>	Liu et al. (2002b); Ratcliff et al.(2001) Brigneti et al.(2004) Chung et al.(2004) Hileman et al.(2005) Gould y Kramer (2007)
TBSV	Tombusvirus	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>N.benthamiana</i>	<i>gfp</i>	Hou y Qiu (2003)
TGMV	Begomovirus	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>N.benthamiana</i>	<i>su, luc</i>	Peele et al. (2001)
TYLCV asociado con β DNA satélite	---	Tomate	<i>N.benthamiana</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>N.glutinosa</i> , <i>N.tabacum</i>	<i>pcna, pds, su</i> , <i>gfp</i>	Tao y Zhou (2004)

*ACMV, *African cassava mosaic virus*; BSMV, *Barley stripe mosaic virus*; BPMV, *Bean pod mottle virus*; BMV, *Brome mosaic virus*; CLCV, *Cabbage leaf curl virus*; PEBV, *Pea early browning virus*; PopMV, *Poplar mosaic virus*; PVX, *Potato virus X*; STMV, *Satellite tobacco mosaic virus*; TMV, *Tobacco mosaic virus*; TRV, *Tobacco rattle virus*; TBSV, *Tomato bushy stunt virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; TYLCV, *Tomato yellow leaf curl China virus* asociados con β DNA satélite.

4.2. Expresión de genes.

Las plantas se han empleado para expresar genes de interés de manera constitutiva mediante el uso de plantas transgénicas o de forma no constitutiva mediante el empleo de vectores virales.

La expresión constitutiva de genes se realiza mediante transformación genética y requiere de la integración dentro del genoma nuclear o cloroplástico de las células vegetales de un T-DNA de transferencia (*T-DNA transfer*, T-DNA) que incluye el gen de interés (Chilton et al., 1977).

Por otro lado, la expresión no constitutiva de genes mediante vectores virales consiste en la infección de la planta con un virus recombinante que contiene la secuencia del gen que se desea expresar. El virus infecta la planta y utiliza su maquinaria de síntesis proteica para expresar la secuencia que se ha introducido sin necesidad de que ésta se integre en el genoma de la planta.

Los vectores virales presentan numerosas ventajas respecto a la transformación genética para expresar genes foráneos: su genoma es pequeño y fácilmente manipulable, la inoculación en plantas es sencilla, la expresión del gen de interés es rápida, la alta tasa de replicación viral permite obtener una elevada producción de la proteína de interés y, se trata de una tecnología de reducido coste.

Se han utilizado diferentes estrategias para expresar proteínas en plantas usando vectores virales:

- 1) Sustitución de una secuencia viral por la del gen de interés. Esta estrategia tiene la ventaja de reducir los efectos perjudiciales que

pueden aparecer por el aumento del tamaño del genoma viral tras la inserción del gen de interés. Si es posible, las secuencias virales sustituidas no deben estar asociadas con la replicación del virus. En aquellos vectores en los que sólo se puede sustituir la proteína de movimiento, pueden presentar limitaciones ya que el virus no puede moverse célula-célula (French et al., 1986) o sistémicamente dentro de la planta (Dawson et al., 1989; Donson et al., 1991). Esta estrategia se ha empleado con el virus del enanismo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) (Scholthof et al., 1993) y con el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Musiychuk et al., 2007) (Fig. 4.1).

2) Inserción del gen de interés. Con esta estrategia se duplica un promotor de un RNA subgenómico (sgRNA) del virus y se inserta a continuación el gen que se quiere expresar induciendo la formación de un nuevo sgRNA. De esta forma se evitan los problemas de la estrategia anterior. Tiene el inconveniente del aumento de tamaño del genoma del virus y además pueden surgir recombinaciones homólogas causando inestabilidad del vector. Este método se ha empleado con TMV (Pérez-Filgueira et al., 2003; Karasev et al., 2005), con PVX (Chapman et al., 1992; Nemchinov y Natilla, 2007), y con el virus A de la vid (*Grapevine virus A*, GVA) (Haviv et al., 2006) (Fig. 4.2).

3) Fusión de péptidos de interés con la proteína capsídica del virus. Con esta estrategia los péptidos quedan expuestos junto a la proteína de la cápsida en la superficie de las partículas virales (Johnson et al., 1997; Porta y Lomonossoff, 1998). Es muy importante que dichas fusiones no interfieran en las funciones normales del virus. Existen numerosos ejemplos en los que se ha empleado esta estrategia, como los virus del mosaico del chícharo (*Cowpea mosaic virus*, CPMV) (Cañizares et al., 2005; Liu et al., 2005), TMV (Santi et al., 2006; Mett et al., 2007), PVX (Marconi et al., 2006), ToMV (Dohi et al., 2006), y CMV (Nuzzaci et al., 2007) (Fig. 4.3).

4) División del genoma del virus en dos fragmentos: uno contiene el gen de interés y el otro incluye todos los componentes necesarios para la replicación del vector viral. Esta estrategia se ha empleado con CPMV (Liu et al., 2005; Sainsbury et al., 2009) (Fig. 4.4).

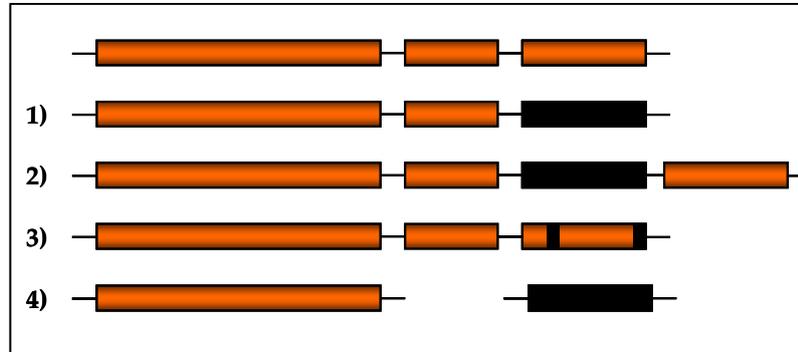


Figura 4. Representación esquemática de las estrategias empleadas para expresar genes desde un vector viral. 1) Sustitución de un gen. 2) Adición de un gen. 3) Fusión de péptidos a la proteína capsídica. 4) División del genoma en dos fragmentos. Los rectángulos naranjas representan secuencias de genes virales y los negros representan secuencias de genes foráneos.

Los vectores virales de expresión se han empleado para obtener proteínas de interés biosanitario, como anticuerpos (McCormick et al., 1999, 2003; Monger et al., 2006) y antígenos para fabricar vacunas para humanos y animales (Streatfield y Howard, 2003; Perez-Filgueira et al., 2004; Wagner et al., 2004; Yusibov et al., 2005; Santi et al., 2006; Chichester y Yusibov, 2007; Golovkin et al., 2007; Saejung et al., 2007; Nemchinov y Natilla, 2007). En el ámbito de la agricultura dichos vectores se emplean para expresar genes que controlan caracteres de interés de la planta (Kumagai et al., 1998, 2000; Bouvier et al., 2000), para obtener cultivos resistentes a patógenos (Tavladoraki et al., 1993; Shibolet et al., 2001; Nolke et al., 2003; Peschen et al., 2004; Villani et al., 2005) y para estudiar rutas metabólicas de la planta (Nolke et al., 2005). Una de las aplicaciones más recientes es en el campo de la nanotecnología, donde los

vectores se utilizan para expresar biopolímeros y nanopartículas (Manchester y Singh, 2006; Lewis et al., 2006; Steinmetz et al., 2006; Miller et al., 2007; Mao et al., 2003).

5. Clones infecciosos de virus.

La posibilidad de obtener clones de cDNA del genoma completo de virus que permitan infectar plantas o protoplastos ha resultado muy útil para estudiar aspectos relacionados con la replicación, expresión génica o identificación de los determinantes de patogenicidad de los virus, y es un paso imprescindible para la construcción de un vector viral (Bujarski y Miller, 1992).

En los virus de RNA, la obtención de un clon infeccioso implica la síntesis previa de un cDNA complementario del genoma completo del virus, que se inserta en un vector para su mantenimiento y amplificación en bacterias (Boyer y Haenni, 1994). El cDNA obtenido se puede clonar bajo el promotor de la RNA polimerasa DNA dependiente de un fago, como SP6 (Melton et al., 1984), T3 y principalmente T7 (Dunn y Studier, 1983) para obtener transcritos infecciosos de RNA, o bajo el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) para ensayar la inoculación directa del DNA en planta (Fig. 5).

Los transcritos de RNA funcionan como mRNAs y pueden ser traducidos en el citoplasma de las células transfectadas (Fig. 5). Para introducir el RNA del genoma del virus en las células, a partir del clon de cDNA se sintetizan *in vitro* los transcritos de RNA y se inoculan en la planta hospedadora utilizando distintos métodos, como inoculación mecánica, electroporación, lipofección, bombardeo con partículas de oro o tungsteno impregnadas con los transcritos, etc. La infectividad de los transcritos es muy variable, llegando en algunos casos a alcanzar el 100% de las plantas inoculadas. Existen numerosos parámetros que pueden determinar la infectividad de los transcritos de RNA como son: i) la heterogeneidad de la población de

los transcritos (Sarnow, 1989; Hayes y Buck, 1990; Hearne et al., 1990), ii) la presencia de mutaciones puntuales como consecuencia de la baja fidelidad de copia de las enzimas que se utilizan para la construcción del clon infeccioso o en el proceso de transcripción del RNA viral (Kuhn et al., 1990), iii) la presencia de la estructura CAP en el extremo 5' o de una cola poli-A en el extremo 3' del virus, iv) el tamaño del genoma del virus, v) el huésped donde se realiza la inoculación, y vi) el método de inoculación de los transcritos.

Las construcciones bajo el promotor 35S se transcriben en el núcleo de las células mediante la RNA polimerasa II celular y los transcritos del RNA viral se traducen en el citoplasma, donde se induce la replicación del genoma del virus mediante la replicasa viral (Fig. 5). Se han utilizado distintos métodos para introducir el cDNA en las células, como la transmisión mecánica, el bombardeo con partículas, etc., pero el más utilizado consiste en la clonación del genoma en un plásmido binario e inoculación mediante la bacteria *A. tumefaciens*. Este método tiene las siguientes ventajas sobre la inoculación de transcritos: i) la infectividad es menos dependiente de la degradación del RNA ya que éste se sintetiza dentro de las células (Van Bokhoven et al., 1993), ii) los clones de cDNA son estables durante mucho tiempo ya que se conservan en forma de plásmido, y iii) no requiere de la transcripción *in vitro*, lo que es importante en algunos virus de RNA por la dificultad de obtener un alto rendimiento de transcritos infecciosos.

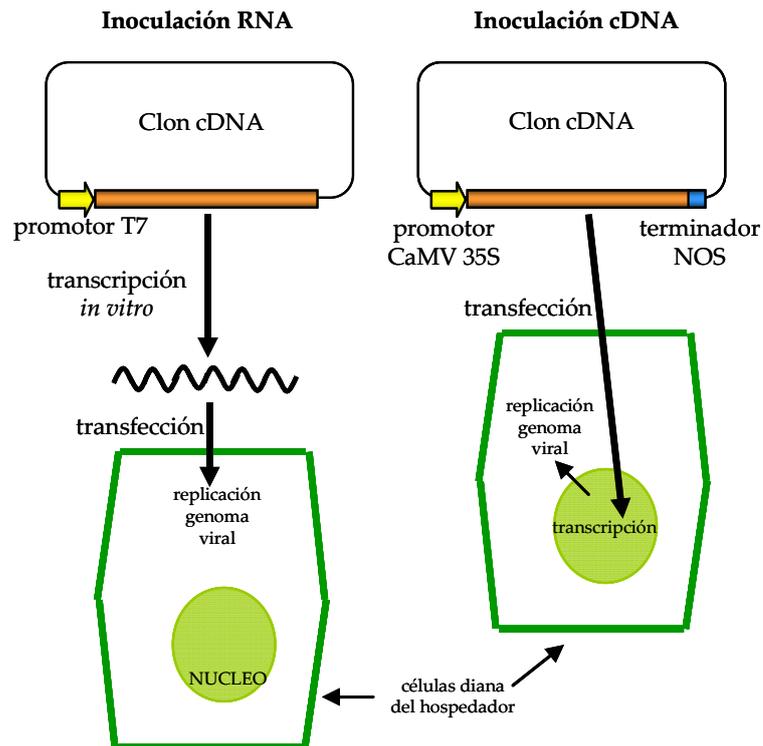


Figura 5. Esquema de la obtención de clones infecciosos de virus y mecanismos de replicación en células vegetales. Las barras naranjas representan el genoma de cDNA completo del virus.

6. Expresión génica de virus de RNA de cadena positiva.

Para construir un vector viral eficiente a partir de un virus es necesario conocer previamente la estrategia de expresión de su genoma y los mecanismos que la regulan (Shivprasad et al., 1999). La mayoría de los virus de RNA de cadena positiva contienen en su genoma varios marcos de lectura abierta (ORFs) que se expresan de forma diferente. Éstos emplean una amplia variedad de estrategias de expresión y regulación de sus genes, como la segmentación del genoma, el procesamiento de poliproteínas, el desplazamiento de la pauta de lectura durante la traducción, la supresión del codón de

terminación de un gen y la síntesis de RNAs subgenómicos (sgRNAs) (Maia et al., 1996; Dreher y Miller, 1996).

En el caso de los virus de RNA que emplean esta última estrategia sólo el primer ORF, que suele contener los genes relacionados con la replicación del virus, se traducen directamente a partir del RNA genómico (gRNA) ya que sus productos son necesarios para la replicación y para la síntesis de los sgRNAs. El resto de genes se transcribe mediante la formación de sgRNAs 3' coterminales, que permiten situar a cada uno de los genes en una posición próxima al extremo 5' para su traducción. La producción de los sgRNAs es una estrategia desarrollada por los virus para subsanar la escasa o nula eficiencia de la traducción de ORFs internos o situados en el extremo 3' terminal, originada por la dependencia que tienen los ribosomas eucarióticos del extremo 5' del mRNA (Kozak et al., 1989). Esto permite regular a cada gen de forma independiente, controlando tanto su expresión a nivel temporal como cuantitativo (Koev y Miller, 2000).

6.1. Mecanismos de síntesis de sgRNAs.

La transcripción de los sgRNAs se lleva a cabo por la RNA polimerasa RNA dependiente del virus, que reconoce secuencias promotoras situadas en la cadena negativa del RNA viral. Se han descrito varios mecanismos para la producción de sgRNAs 3' coterminales (Miller y Koev, 2000; White, 2002):

- 1) **Iniciación interna.** El virus sintetiza la cadena negativa del gRNA y a partir de ella la polimerasa reconoce secuencias internas iniciando la síntesis de la cadena positiva de los sgRNAs. Dichas secuencias internas son los promotores de los sgRNAs y su reconocimiento por la polimerasa permite generar RNAs mensajeros colineales al gRNA que presentan extremos 5' diferentes y extremos 3' idénticos (Miller et al., 1985) (Fig. 6.1).

2) Terminación prematura. La síntesis de la cadena negativa del gRNA se interrumpe dando lugar a un sgRNA de cadena negativa que sirve de molde para la síntesis de la cadena positiva del sgRNA (Sit et al., 1998; White, 2002) (Fig. 6.2).

3) Síntesis discontinua. Incluye dos variantes; en la primera, un RNA líder de cadena positiva derivado del extremo 5' del gRNA puede disociarse del mismo, unirse a otras regiones de la cadena negativa de dicho RNA y servir como cebador para la síntesis de la cadena positiva del sgRNA con extremos 5' y 3' idénticos al gRNA (Zhang y Lai, 1994; van Marle et al., 1999a) (Fig. 6.3.a). En la segunda variante, la polimerasa se suelta del molde durante la síntesis de la cadena negativa del gRNA sin soltar la cadena que estaba sintetizado y se une al extremo 5' del molde, donde termina su síntesis generando un sgRNA de cadena negativa. Este RNA sirve de molde para la síntesis de la cadena positiva del sgRNA, que contiene los mismos extremos 5' y 3' que el gRNA (Sawicki y Sawicki, 1990) (Fig. 6.3.b). Este mecanismo no se ha identificado todavía en ningún virus de plantas (Miller y White, 2006).

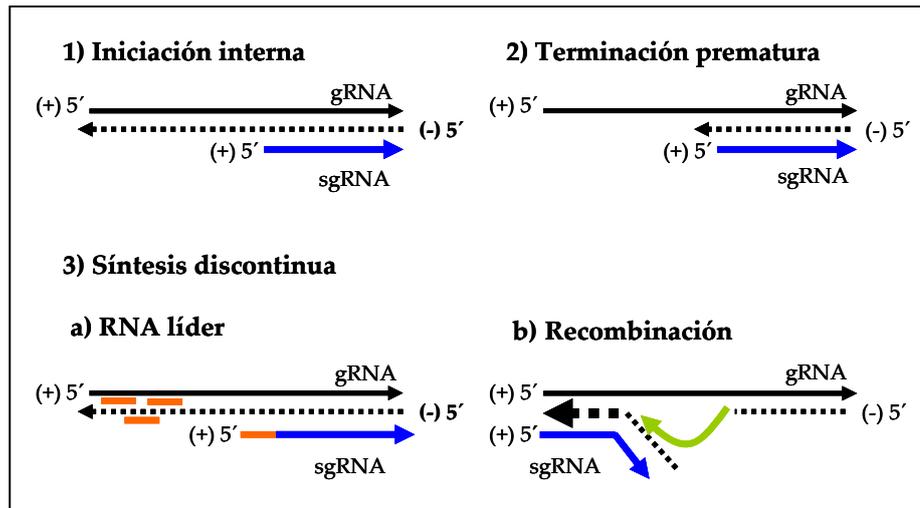


Figura 6. Representación esquemática de los modelos de transcripción de los sgRNAs (Fig. adaptada de White, 2002). 1) Iniciación interna. 2) Terminación prematura. 3) Síntesis discontinua: a) mediante un RNA líder, b) mediante recombinación. El gRNA de cadena positiva (+) está representado por una flecha negra y el gRNA de cadena negativa (-) por una flecha negra discontinua. Los sgRNAs (+) están representados por flechas azules. La flecha verde representa el salto realizado por la polimerasa. Las líneas naranjas representan las secuencias líderes.

6.2. Promotores de sgRNAs.

Hasta la fecha se han caracterizado diversos promotores de sgRNAs de varios virus cuyos tamaños oscilan entre 24 (Johnston y Rochon, 1995; Wang y Simon, 1997) y más de 100 nt (Balmori et al., 1993; van der Vossen et al., 1995; Grdzlishvili., et al, 2000; Koev y Miller, 2000). En los virus que utilizan el mecanismo de iniciación interna para la síntesis de los sgRNAs, como norma general, la mayor parte de la secuencia promotora se localiza inmediatamente antes del inicio de transcripción del sgRNA (French y Ahlquist, 1988; Levis et al., 1990; Boccard y Baulcombe, 1993; Johnston y Rochon 1995; van der Vossen et al., 1995; Wang y Simon, 1997; Koev et al., 1999; Wang et al., 1999; Miller y Koev, 2000). Sin embargo, hay

algunos virus en los que la secuencia promotora puede estar situada antes del inicio de transcripción pero alejada físicamente del mismo, después del inicio de transcripción o incluso puede estar situada en otra molécula de RNA (Balmori et al., 1993; Sit et al., 1998; Koev y Miller, 2000). Los promotores que son reconocidos por la RdRp para iniciar la síntesis de los sgRNAs pueden ser tanto estructuras primarias (Gowda et al., 2001; Johnson et al., 2003) como secundarias (Grdzlishvili et al., 2000; Li y Wong, 2006) y se localizan en la cadena negativa del gRNA del virus. Hay virus que presentan diferentes promotores para los diferentes sgRNAs, lo que permite regular la transcripción de los distintos genes codificados por el mismo, como ocurre con el virus de la tristeza de cítricos (CTV) (Ayllón et al., 2003). Por otro lado, algunos virus como BMV (Marsh y Hall, 1987; Marsh et al., 1988), CMV (Boccard y Baulcombe, 1993), el virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (van der Kuyl et al., 1990), el virus del mosaico del trébol rojo (*Red clover mottle virus*, RCMV) (Zavriev et al., 1996), el virus del moteado clorótico del maíz (*Maize chlorotic mottle virus*, MCMV) (Lommel et al., 1991), TCV (Wang y Simon, 1997), el virus baciliforme del champiñón (*Mushroom bacilliform virus*, MBV) (Revill et al., 1999), el virus del enanismo amarillo de la cebada (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) (Kelly et al., 1994) y el virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV) (Vives et al., 2002), presentan secuencias conservadas en el extremo 5' tanto del gRNA como de sus sgRNAs.

En algunos virus que utilizan el mecanismo de terminación prematura para la transcripción de sus sgRNAs, se han identificado interacciones RNA-RNA a larga distancia entre sitios cercanos al inicio de transcripción y sitios más alejados del mismo. Estas interacciones son necesarias para la formación de una estructura secundaria que permite la terminación prematura de la síntesis de la cadena negativa. Esta cadena negativa contiene en el extremo 3' una secuencia que es utilizada por la RdRp para iniciar la transcripción de la cadena positiva del sgRNA. Dicha estrategia solamente se ha

descrito en el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mottle virus*, RCNMV) (Sit et al., 1998), en TBSV (Zhang et al., 1999; Choi et al., 2001; Choi y White 2002; Lin y White 2004; Lin y White, 2007; Wang et al., 2008), y en el virus de las manchas de las hojas del pepino (*Cucumber leaf spot virus*, CLSV) (Xu y White, 2008), aunque también se ha propuesto para otros virus de los géneros *Torovirus*, *Nodavirus*, *Closterovirus* y *Tombusvirus* (Price et al., 2000; Gowda et al., 2001; Lindenbach et al., 2002; Smits et al., 2005).

En los virus que producen múltiples sgRNAs, los más cercanos al extremo 3' tienden a acumularse en mayor proporción que los restantes (Kelly et al., 1994). Este fenómeno también se pone de manifiesto cuando se duplica artificialmente un promotor de un virus en el extremo 3' del mismo (French y Ahlquist, 1988; Koev et al., 1999). Se desconoce el mecanismo por el cual se produce este fenómeno y aunque se han propuesto varias teorías, hasta la fecha no se ha podido demostrar ninguna (Koev y Miller, 2000).

Para determinar el mecanismo de síntesis de sgRNAs en ausencia de replicación del virus, se han realizado estudios *in vitro* utilizando extractos de RdRp purificados y fragmentos del genoma del virus. El promotor del sgRNA mejor caracterizado es el del RNA 4 de BMV, que se transcribe a partir del RNA 3 (Miller et al., 1985; French y Ahlquist, 1998). Utilizando esta técnica se ha conseguido caracterizar la secuencia mínima capaz de promover la síntesis de dicho sgRNA y se han podido determinar qué nucleótidos de esa secuencia son esenciales (Adkins et al., 1997; Marsh et al., 1988). De la comparación de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se ha observado que los requerimientos mínimos determinados para la síntesis de un sgRNA *in vitro* normalmente son insuficientes para su síntesis *in vivo* (French y Ahlquist, 1988).

Existen evidencias de que en el proceso de transcripción de los sgRNAs, además de la RdRp están implicadas otras proteínas del virus. Un ejemplo descrito es el de AMV, en el que se vio que

mutaciones en el extremo 3' del RNA 3 impedían la unión específica de la proteína de cápsida al RNA y como consecuencia, se producía una disminución drástica de la síntesis del RNA 4 (Reusken et al., 1997). Por otra parte, la RdRp de este virus es capaz de reconocer los diferentes tipos de promotores presentes en su genoma ya que posee sitios específicos de unión para cada uno de ellos (Suopanki et al., 1998).

Además de los promotores, se han descrito elementos estimuladores de la replicación (conocidos como replication enhancers), que potencian la síntesis de cadenas positivas y elementos supresores de la replicación, que disminuyen la síntesis de las cadenas negativas. Probablemente, ambos tipos de elementos son en gran parte los responsables de la asimetría entre la acumulación de cadenas negativas y positivas que caracteriza la replicación viral (Ray y White, 1999; Nagy et al., 1999, 2001; Pogany et al., 2003; Zhang et al., 2003, 2004; Panavas y Nagy, 2005; Na y White, 2006).

7. El virus del manchado foliar de los cítricos

7.1. Sintomatología, gama de huéspedes, transmisión e incidencia

El virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) se detectó por primera vez en un kumquat Nagami (*Fortunella margarita* (Lour.) Swing.) que procedía de Córcega (clon SRA-153). Este clon mostraba síntomas de mala unión patrón/injerto cuando se propagaba sobre el patrón citrange Troyer (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.), pero no sobre limonero rugoso (*C. jambhiri* Lush) (Navarro et al., 1984) (Fig. 7). Además, en los ensayos de infectividad realizados para caracterizar biológicamente esta nueva enfermedad mediante la inoculación por injerto de fragmentos de corteza del clon SRA-153 en distintas especies de cítricos, se observaron los siguientes síntomas: 1) acanaladuras en la madera en cidro Etrog (*C. medica* L.), 2) clorosis nervial en las hojas de naranjo amargo (*C. aurantium* L.), pomelo Marsh (*C. paradisi* Macf.), tangelo Orlando (*C. paradisi* Macf. x *C.*

reticulata Tan.), naranjo dulce Pineapple (*C. sinensis* (L.) Osb.), citrange Troyer y tangor Dweet (*C. reticulata* Tan. x *C. sinensis* (L.) Osb.), y 3) manchado clorótico en hojas de tangor Dweet (Navarro et al., 1984; Galipienso et al., 2000).



Figura 7. Síntomas inducidos por Kumquat Nagami SRA-153: mala unión patrón-injerto en propagaciones sobre citrange Troyer.

Para ver si esta enfermedad podía inducir incompatibilidad patrón-injerto en variedades comerciales de cítricos se inocularon plantas de clementino de Nules, limonero Eureka, pomelo Marsh y naranjo dulce Pineapple con el clon SRA-153 y estas plantas se propagaron sobre citrange Troyer. Las plantas de clementino y limonero mostraron síntomas de mala unión patrón-injerto a los seis meses de la propagación mientras que en pomelo y naranjo dulce la unión era normal (Galipienso et al., 2000). Además, las variedades que mostraban síntomas de mala unión también inducían clorosis nervial en naranjo dulce Pineapple, manchado foliar en tangor Dweet y acanaladuras en la madera en cidro Etrog, mientras que las variedades que no presentaban mala unión sólo inducían manchado foliar en tangor Dweet y acanaladuras en la madera en cidro Etrog. Estos resultados sugerían la presencia de más de un virus o cepas de un mismo virus en el kumquat SRA-153 que se podían separar al pasar por ciertos hospedadores. A la misma conclusión se llegó al caracterizar biológicamente las líneas de kumquat 38-1 y 497-2, obtenidas por microinjerto a partir del clon SRA-153, ya que éstas

sólo inducían acanaladuras en la madera en cidro Etrog y manchado foliar en tangor Dweet (Navarro et al., 1984; Galipienso et al., 2000).

Recientemente se ha obtenido un clon infeccioso del genoma completo de CLBV (IC-CLBV) a partir del aislado SRA-153. Dicho clon induce acanaladuras en la madera en cidro Etrog y manchado foliar en hojas de tangor Dweet (Fig. 8), pero no produce clorosis nervial en hojas de naranjo dulce Pineapple ni mala unión patrón-injerto al propagarse sobre citrange. Estos resultados indican que CLBV sólo es responsable de la inducción de los síntomas en cidro Etrog y tangor Dweet, y que la mala unión sobre citrange y la clorosis nervial en hojas de naranjo dulce están causados por otro patógeno o por la interacción de CLBV y otro factor biótico (Vives et al., 2008).

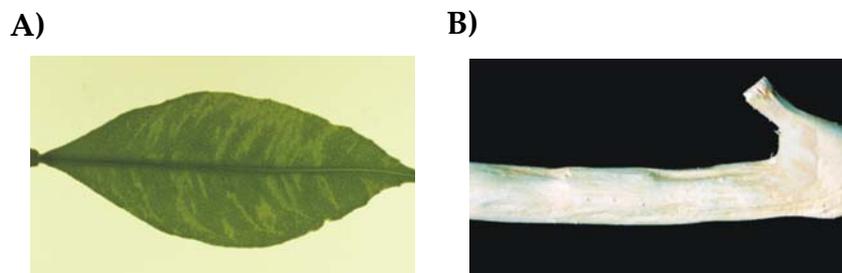


Figura 8. Síntomas inducidos por CLBV. A) Manchado foliar en Tangor Dweet. B) Acanaladuras en la madera en cidro Etrog.

CLBV infecta todas las especies y variedades de cítricos ensayadas pero sólo induce síntomas en cidro Etrog y tangor Dweet, especies que no son comerciales en España. Además, experimentalmente se ha conseguido transmitir a *N. benthamiana* y *N. occidentalis* y *N. cavicola* (Guardo et al., 2009), huéspedes en los que el virus tampoco induce síntomas.

El virus se trasmite de forma natural por injerto al utilizar yemas infectadas. Además, recientemente se ha observado que CLBV

también se transmite por semilla, aunque en una proporción muy baja (Guerra et al., 2004). El virus puede transmitirse experimentalmente a cítricos sanos mediante cortes en el tallo con una cuchilla mojada con extracto de planta enferma. No se tienen evidencias de su transmisión por vectores (Vives et al., 2008).

CLBV se ha detectado en España (Galipienso et al., 2000; Galipienso et al., 2001; Vives et al., 2002b), Japón, Florida, Nueva Gales del Sur (Australia), Italia (Guardo et al., 2007) y Nueva Zelanda (Harper et al., 2008), en árboles que presentaban mala unión del injerto con patrones trifoliados. La importancia económica del virus es desconocida ya que no se ha determinado su incidencia en las distintas regiones geográficas donde se ha localizado ni se ha podido demostrar su participación junto a otros patógenos en la incompatibilidad de ciertas variedades de cítricos sobre patrones trifoliados.

7.2. Taxonomía, organización genómica y características moleculares

CLBV pertenece a la familia *Flexiviridae* (Adams et al., 2005; Martelli et al., 2007). Por sus características biológicas, estructurales y moleculares no se pudo encuadrar en ninguno de los géneros establecidos en dicha familia, por lo que se propuso su asignación a un nuevo género denominado *Citriovirus* y fue aceptado por el comité internacional para la taxonomía de virus (ICTV) (Vives et al., 2001).

Los viriones de CLBV son partículas con una morfología filamentosa y flexuosa, con una longitud media de 960 nm y un diámetro de 14 nm, formadas por una molécula de RNA monocatenario de cadena positiva y subunidades de una proteína capsídica de 41 kDa (Fig. 9).

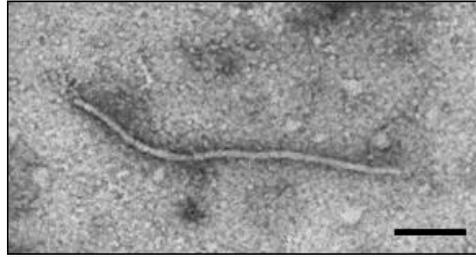


Figura 9. Partícula viral de CLBV purificada a partir del kumquat SRA-153. Tinción con acetato de uranilo al 1%. La barra corresponde a 200 nm.

El genoma del virus contiene 8.747 nt y está poliadenilado en el extremo 3'. Se han identificado 3 marcos de lectura abierta (ORFs) y dos regiones no codificantes de 73 y 541 nucleótidos en los extremos 5' y 3', respectivamente. El ORF 1 codifica una poliproteína de 227 KDa que contiene los dominios metil-transferasa, proteasa, helicasa y RNA polimerasa, conservados en el supergrupo de los alfavirus. El ORF 2 codifica una proteína de movimiento (MP) de 40 KDa que presenta similitud de secuencia con las proteínas de movimiento célula-célula de la "superfamilia 30K". Y por último el ORF 3 codifica la proteína capsídica (CP) de 41 KDa (Vives et al., 2001).

El ORF1 se traduce directamente a partir del RNA genómico (gRNA), mientras que los genes de la MP y CP se expresan mediante la síntesis de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3'coterminal que actúan como RNAs mensajeros a partir de los cuales se traduce el gen que ocupa la posición 5' terminal. Tanto el gRNA como los sgRNAs 3'coterminal están encapsidados y comienzan en su extremo 5' con el hexanucleótido GAAAAG, que podría ser un elemento implicado en el reconocimiento de la polimerasa viral. Los sgRNAs de la MP y CP tienen en su extremo 5' una región no codificante de 123 y 284 nt, respectivamente (Vives et al., 2002) (Fig. 10). Además de los sgRNAs 3'coterminal el virus sintetiza 2 sgRNAs 5' terminales cuya función es desconocida.

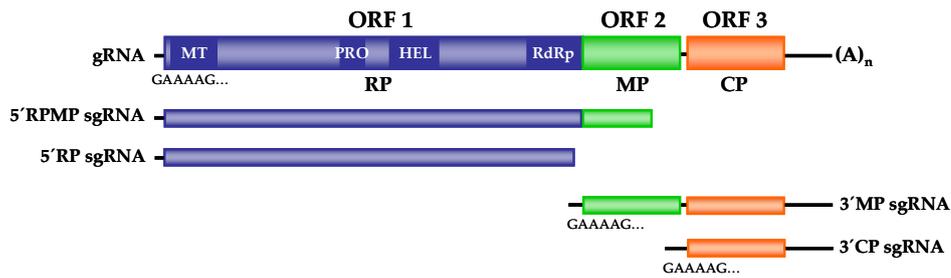


Figura 10. Representación gráfica de la organización genómica del gRNA de CLBv y los sgRNAs que produce. Las cajas representan los ORFs y dentro de ellas se indica la proteína que codifican. En el ORF 1 se muestran los dominios funcionales de la metiltransferasa (MT), la proteasa (PRO), la helicasa (HEL) y la RNA polimerasa (RdRp). En la parte inferior de la figura están representados los sgRNAs 5'coterminales (5'RP y 5'RPMP) y los sgRNAs 3'coterminales (3'MP y 3'CP).

7.3. Diagnóstico de CLBv

La presencia del virus en plantas infectadas se puede diagnosticar mediante métodos biológicos y métodos moleculares. Como se ha indicado anteriormente, CLBv induce síntomas en tangor Dweet y cidro Etrog, por lo que estas dos especies se pueden utilizar para el diagnóstico biológico del virus. Debido a que el síntoma de moteado clorótico en tangor Dweet es más fácil de observar y aparece más pronto que las acanaladuras en la madera en cidro Etrog, este ensayo es el que se utiliza para el diagnóstico rutinario del virus. La inoculación a partir de kumquat SRA-153 siempre causa síntomas muy intensos en todas las plantas inoculadas. Sin embargo, la inoculación a partir de otras especies de cítricos como naranjo dulce Pineapple inoculadas previamente con SRA-153 da lugar a síntomas foliares más suaves y la transmisión del virus es más errática, detectándose en menos del 40% de las plantas inoculadas. Ello obliga a utilizar al menos seis plantas indicadoras

con seis piezas de inóculo para un diagnóstico fiable de la enfermedad y hace que el método sea inadecuado para procesar un gran número de muestras (Galipienso et al., 2000).

Los métodos moleculares que se han desarrollado para el diagnóstico del virus se basan en la detección de la proteína de cápsida o del RNA viral. Debido a la baja concentración en que se encuentra CLBv en las plantas infectadas, no se pudieron obtener anticuerpos a partir de viriones purificados. Por ello se preparó un suero a partir de la proteína capsídica expresada en bacterias. Con este suero se pudo detectar el virus mediante Western blot utilizando extractos semipurificados de viriones, pero no se pudo detectar mediante ELISA utilizando extractos vegetales, por lo que su uso para el diagnóstico rutinario de la enfermedad es muy limitado (Vives et al., 2001).

El conocimiento de la secuencia del genoma de CLBv permitió el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en la detección del RNA viral mediante hibridación molecular o retrotranscripción y amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Galipienso et al., 2004). La hibridación molecular con sondas de cDNA marcadas con digoxigenina permite la detección del virus en plantas de invernadero utilizando improntas de tejido o extractos de RNA total o de RNA bicatenario de brotes jóvenes. La técnica de RT-PCR es más sensible que la hibridación molecular y permite la detección a partir de cualquier tejido infectado. Estos métodos permiten el diagnóstico fiable del virus utilizando hojas jóvenes de plantas infectadas de numerosas variedades de cítricos, sin embargo, en otras variedades como el naranjo dulce Pineapple el virus se distribuye irregularmente dentro de la planta y sólo se detecta en un 20% de las muestras analizadas, por lo que es necesario utilizar un mínimo de diez muestras individuales por árbol para un diagnóstico fiable. Además, en condiciones de campo la detección de CLBv es menos consistente que en invernadero debido a que el título viral es

más bajo y la distribución más errática. Así, en variedades como el naranjo dulce cv. Navelina, el virus se detecta en la mayoría de las muestras analizadas de plantas cultivadas en invernadero tanto por hibridación molecular como RT-PCR, pero en condiciones de campo sólo dan reacción positiva entre el 10 y el 20% de las muestras analizadas de un mismo árbol infectado. Recientemente se ha puesto a punto la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real usando sondas Taqman para la detección del virus. Esta técnica resulta 1000 veces más sensible que la RT-PCR convencional y es la técnica que se está empleando actualmente para la detección rutinaria de CLBV (Ruiz-Ruiz et al., 2009).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El empleo de vectores virales es una estrategia muy útil para la expresión o el silenciamiento de genes de plantas o para inducir resistencia frente a otros virus u otros patógenos. La utilización de los vectores virales tiene la ventaja sobre la mutagénesis o la transformación genética de que permite ensayar la función de numerosos genes en un corto periodo de tiempo. Esto es especialmente crítico en cítricos, que poseen largos periodos juveniles (entre 6 y 8 años) y donde la transformación genética de material adulto es muy compleja. Por todo ello, el laboratorio donde se ha realizado este trabajo de tesis está interesado en el desarrollo de un vector viral basado en el virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV), virus que ha sido caracterizado biológica (Galipienso et al., 2000, 2001; Vives et al., 2001, 2008) y molecularmente (Vives et al., 2001; 2002).

Este virus tiene las siguientes ventajas para ser utilizado como vector viral: i) infecta a todas las especies y variedades de cítricos ensayadas sin inducir síntomas en la mayoría de ellas, lo que evita interferencias con la expresión fenotípica del gen o genes a estudiar, ii) se multiplica en todos los tejidos de la planta, al contrario de lo que ocurre con otros virus de cítricos como el de la tristeza, que está limitado a células del floema, iii) se acumula preferentemente en los meristemos, lo que lo hace especialmente interesante para el estudio de la expresión de genes implicados en el desarrollo de hojas y frutos, iv) al ser un virus filamentoso, admite en su genoma secuencias exógenas de mayor tamaño que los virus isométricos, v) su genoma es de RNA monocatenario y relativamente pequeño (8747nt), por lo que resulta fácilmente manipulable, y vi) dos de sus proteínas se expresan mediante la formación de RNAs subgenómicos (sgRNAs).

Para poder desarrollar un vector viral a partir del genoma de CLBV es necesario disponer de un clon infeccioso del virus y de

métodos eficientes de inoculación del mismo en plantas de cítricos. Al inicio de este trabajo sólo se disponía de información sobre la construcción de un clon infeccioso del aislado T36 de CTV y de su inoculación en plantas de cítricos. De todos los sistemas de inoculación de este clon infeccioso de CTV a cítricos, el único que dio resultado fue la inoculación de transcritos del genoma del virus en protoplastos de *N. benthamiana*, purificación y amplificación de viriones generados en ellos mediante sucesivos pases en protoplastos e inoculación mecánica de los mismos en plantas de cítricos (Satyanarayana et al., 1999). Para reproducir el sistema genético desarrollado para CTV, era necesario obtener un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 del fago lambda y poner a punto la obtención de protoplastos de cidro Etrog, *N. benthamiana* y *N. occidentalis*, que son huéspedes del virus.

Antes de modificar el clon infeccioso de CLBV para convertirlo en un vector viral eficiente, era necesario conocer la estrategia de expresión del genoma viral y caracterizar las secuencias implicadas en el reconocimiento y promoción de la síntesis de los sgRNAs para poder duplicar este promotor con el objetivo de expresar genes o fragmentos de genes mediante la formación de un nuevo sgRNA.

Por otro lado, las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa frente a la infección por virus basado en el silenciamiento génico postranscripcional, que degrada el RNA viral impidiendo o limitando su acumulación o invasión sistémica. Por su parte, como estrategia de contradefensa, muchos virus de plantas expresan proteínas supresoras que inhiben este silenciamiento a distintos niveles. La mayoría de estas proteínas coinciden con los determinantes de patogenicidad del virus y están relacionadas con la multiplicación y movimiento del mismo dentro de la planta (Moissiard y Voinnet, 2004; MacDiarmid, 2005). Con el objetivo de desarrollar un vector viral eficiente y seguro basado en el genoma de CLBV, era interesante determinar la presencia de supresores del

silenciamiento del virus y ensayar su eficiencia en comparación con la de los supresores de otros virus conocidos. Se sabe que los virus con supresores muy potentes no son adecuados para su uso como vectores de silenciamiento (VIGS) porque pueden interferir con el mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) de la planta impidiendo el silenciamiento del gen a estudiar, pero en cambio son útiles para la expresión de genes (Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau y Carrington, 1998; Pignatta et al., 2007).

En consecuencia, los objetivos establecidos para esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- 1) Construir un clon infeccioso de CLBV y ensayar la infectividad del mismo en protoplastos.
- 2) Caracterizar los elementos implicados en el inicio y promoción de la síntesis del RNA subgenómico de la proteína de la cápsida.
- 3) Identificar y caracterizar a la proteína supresora del silenciamiento génico postranscripcional de CLBV.

CAPÍTULO 1:

CONSTRUCCIÓN DE CLONES INFECCIOSOS DE CLBV Y ENSAYOS DE INFECTIVIDAD EN PROTOPLASTOS

CAPITULO 1

1. 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

El virus del manchado foliar de los cítricos posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva de 8.747 nt, organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs). El ORF 1 codifica una poliproteína de 227 kD que contiene los dominios funcionales característicos de la replicasa viral que se traduce desde el gRNA, mientras los ORFs 2 y 3 codifican la proteínas de movimiento (MP) y cápsida (CP), respectivamente, que se traducen mediante la síntesis de dos sgRNAs 3' coterminales (Vives et al., 2001, 2002).

Como hemos indicado anteriormente la disponibilidad de un clon infeccioso es un paso previo imprescindible para: i) desarrollar un vector viral, ii) caracterizar las secuencias implicadas en el reconocimiento y promoción de la síntesis de los sgRNAs, y iii) determinar los motivos de secuencia relacionados con la manifestación de síntomas. Al comienzo de esta tesis el único clon de cDNA que se había obtenido de un virus de RNA de cítricos era el del aislado T36 del virus de la tristeza de los cítricos. A partir de ese clon se obtuvieron transcritos que eran infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. Los viriones generados en estos protoplastos se inocularon mecánicamente en cítricos. Para reproducir el sistema genético desarrollado para CTV era necesario obtener un clon infeccioso de cDNA de CLBv y desarrollar sistemas eficientes de inoculación de protoplastos con los transcritos obtenidos del mismo.

Por ello, los objetivos concretos planteados en este capítulo fueron:

- Construir un clon de cDNA del genoma completo de CLBv bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.
- Desarrollar sistemas de inoculación de transcritos en protoplastos de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog.

- Inocular directamente los transcritos en plantas de *N. benthamiana* y cidro Etrog.

1.2. RESULTADOS

1.2.1. Construcción de un clon de cDNA del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.

Debido al tamaño del genoma de CLBV (~9 kb) (Fig. 1A), no fue posible amplificar el cDNA completo del virus en un solo paso. Por ello, mediante retrotranscripción y amplificación a partir de extractos de RNA total del aislado SRA-153, se obtuvieron tres fragmentos solapantes (f5', fC y f3') que abarcaban el genoma del virus, empleando cebadores específicos basados en la secuencia de CLBV del mismo aislado (Vives et al., 2001) (Tabla 1 en materiales y métodos) (Fig. 1B). Los fragmentos amplificados se utilizaron para ensamblar el cDNA completo de CLBV en un plásmido pUC bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda, mediante tres pasos de ligación y transformación utilizando puntos de corte únicos presentes en la secuencia del genoma (Fig. 1C). Además, se añadió una cola poli A al extremo 3' del virus para estabilizar su secuencia y un punto de corte único (*Bam* HI) para poder abrir el plásmido y obtener transcritos del genoma completo del virus. A esta construcción la denominaremos T7-CLBV. Como todos los virus de plantas, los aislados de CLBV contienen una población de variantes de secuencia (Vives et al., 2002) que pueden tener distinta eficiencia en la multiplicación o movimiento. Para minimizar la influencia de este factor o la debida a posibles errores durante la amplificación mediante RT-PCR en la eficiencia del clon infeccioso obtenido, en cada paso de ligación se purificaron 10 clones independientes y se mezclaron para ligar el siguiente fragmento. Al final se ensayó la infectividad de 10 clones completos independientes.

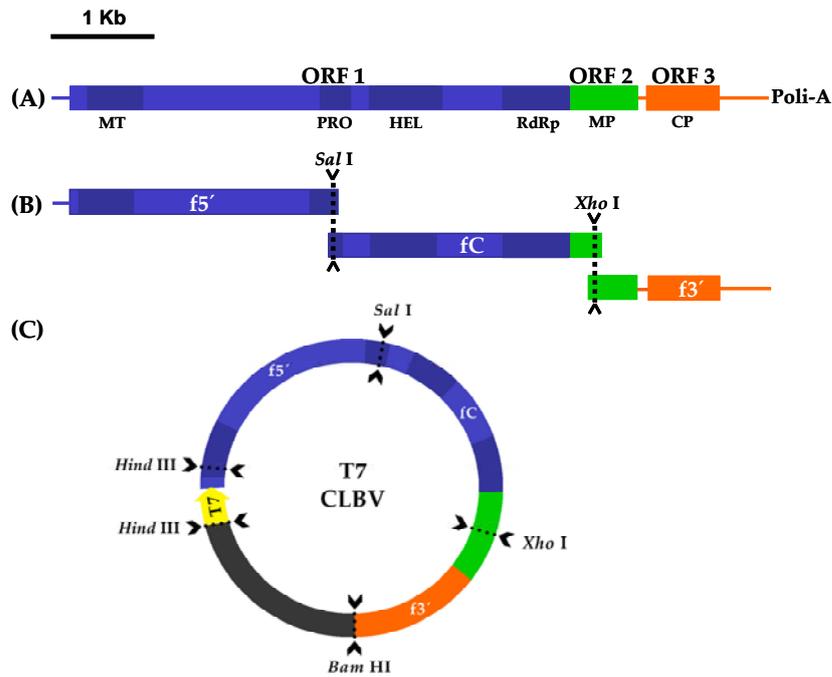


Figura 1. Representación esquemática de la construcción de un clon de cDNA del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7. (A) Diagrama de la organización genómica de CLBV. Los rectángulos de colores representan los marcos de lectura abierta (ORFs). Las proteínas que codifican los ORFs 2 (MP, proteína de movimiento) y 3 (CP, proteína de la cápsida.) y los dominios funcionales del ORF 1 (MT, metil-transferasa; PRO, proteasa; HEL, helicasa; RdRp, RNA polimerasa RNA-dependiente) están indicados en la parte inferior de los rectángulos; (B) Fragmentos obtenidos mediante retrotranscripción y amplificación a partir del gRNA de CLBV y sitios de restricción empleados para ensamblar el clon de cDNA completo. (C) Esquema del clon T7-CLBV con el genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 (flecha amarilla) insertado el vector pUC 119 (sector negro).

1.2.2. Desarrollo de sistemas de inoculación de transcritos en protoplastos de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog.

Tanto la obtención de protoplastos como su inoculación con transcritos son procesos muy ineficientes. No todos los virus o aislados de un virus son capaces de multiplicarse en protoplastos

purificados de cualquier especie. Así, se ha visto que el aislado T36 de CTV es capaz de multiplicarse en protoplastos de *N. benthamiana* (Satyanarayana et al., 1999, 2001), mientras que el aislado T385 del mismo virus no infecta protoplastos de dicha especie, pero sí los de naranjo dulce Washington navel (*C. sinensis* (L.) Osb.) (Dra. Albiach-Martí, comunicación personal). Los únicos huéspedes naturales de CLBV son los cítricos, pero experimentalmente se ha transmitido a *N. occidentalis* y *N. benthamiana*. Por ello, decidimos ensayar simultáneamente la inoculación de transcritos en protoplastos de las tres especies.

El aislamiento de protoplastos es un proceso complejo que se divide en tres etapas: i) selección del material vegetal de partida, ii) tratamiento con enzimas fúngicas para eliminar la pared celular, y iii) limpieza y purificación de los protoplastos obtenidos. El rendimiento del proceso está influenciado por numerosos factores como las condiciones de cultivo de las plantas, el tipo de material vegetal que se emplea, la concentración de las enzimas utilizadas para la digestión de la pared celular, el tiempo de digestión, etc. (Liang et al., 2002; Kanchanaree et al., 2006; Andreu et al., 2009), por lo que los protocolos de purificación desarrollados en otros laboratorios deben optimizarse para cada condición de trabajo.

1.2.2.1. Aislamiento de protoplastos de *N. occidentalis*.

Para poner a punto el método de aislamiento de protoplastos de *N. occidentalis* (Fig. 2) se partió del protocolo descrito previamente por Navas-Castillo (1997) para la obtención de protoplastos de *N. benthamiana*. El proceso consiste básicamente en la digestión de trozos de hoja durante 12-18 horas en una solución que contiene las enzimas: celulasa Onozuka 1% y pectinasa macerada 0.8% en tampón MM 0.7% (manitol 0.7 M, MES 5 mM [2-(N-ácido morfolino etano sulfónico), pH 5.8), filtración a través de una malla de acero y centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. Los protoplastos

sedimentados se resuspenden en tampón MM 0.5%, se colocan sobre un colchón de sacarosa 0.7 M y se centrifugan a 1000 rpm durante 10 min. Los protoplastos, que quedan localizados en una banda situada en la interfase entre el tampón MM y el colchón de sacarosa, se recogen, se lavan dos veces con tampón MM 0.7 M y se cuentan en una cámara cuentaglóbulos Fusch-Rosenthal. A continuación se resuspenden en un volumen adecuado de tampón MM 0.7 M para obtener una densidad final de $0.6-1 \times 10^6$ protoplastos/ml, adecuada para la transfección.

Uno de los factores que influye en el rendimiento del aislamiento de protoplastos es el estado fisiológico del material de partida. Para conocer cuál era el estado fisiológico óptimo en las plantas de *N. occidentalis*, se cultivaron plantas de esta especie en una cámara de cultivo a una temperatura de 24° C día y 18° C noche, con 16 horas de luz (3500-4400 luxes). A las 4, 6 y 8 semanas desde su trasplante se recolectaron hojas jóvenes completamente expandidas que se incubaron en la solución enzimática descrita por Navas-Castillo et al., 1997. La observación al microscopio de la mezcla de digestión indicó que las hojas procedentes de las plantas de 4 semanas presentaban el mayor número de protoplastos liberados.

Otro factor crítico en el aislamiento de protoplastos es la concentración de las enzimas empleadas en la solución de digestión y el tiempo de incubación en la misma. Para realizar este experimento se partió de una mezcla de hojas que se dividió en cinco fracciones idénticas y se incubaron durante 16 horas en las mezclas enzimáticas mostradas en la tabla 1.

Tabla 1.- Concentraciones enzimáticas ensayadas para la obtención de protoplastos de *N. occidentalis*.

Enzimas	A	B	C	D	E
Celulasa (%)	1	0.9	0.8	0.7	0.6
Macerasa (%)	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4

La observación al microscopio de las distintas mezclas de digestión mostró que las soluciones enzimáticas C y D fueron las únicas que daban lugar a protoplastos liberados, siendo la solución D la que proporcionaba un número mayor de protoplastos.

El siguiente parámetro que se estudió fue el tiempo de incubación en la solución enzimática. Para ello se incubaron dos fracciones de hojas en la solución D durante 14 y 18 horas. En la incubación realizada durante 18 h se observó un mayor número de protoplastos rotos, por lo que se estableció en 14 h el tiempo óptimo de incubación en la solución de digestión.

Una vez establecida la concentración enzimática apropiada y la duración del tratamiento, se modificaron otros factores que podrían afectar al rendimiento en la purificación de los protoplastos:

La adición de un estabilizador osmótico a la solución enzimática es esencial para evitar la rotura de los protoplastos a medida que son liberados, siendo éstos más estables si la solución es ligeramente hipertónica. En un primer ensayo se probaron concentraciones decrecientes de manitol (0.7, 0.6, 0.5 y 0.4 M) en tampón MM. La observación al microscopio no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de 0.5 y 0.4 M de manitol. Sin embargo las concentraciones de 0.7 y 0.6 M provocaron la rotura de todos los protoplastos liberados.

En un segundo experimento, además de las concentraciones de manitol de 0.4 y 0.5 M se ensayó una intermedia de 0.45 M. En paralelo se prepararon las mismas soluciones aunque suplementadas con CaCl_2 10 mM, ya que se ha descrito que el calcio incrementa la estabilidad de las membranas. El rendimiento (número de protoplastos obtenido por gramo de tejido) se calculó haciendo un recuento de protoplastos viables en la cámara cuantaglobulos. Los rendimientos obtenidos oscilaron entre $0.48\text{-}0.52 \times 10^6$, $0.32\text{-}0.38 \times 10^6$ y $0.19\text{-}0.25 \times 10^6$ protoplastos/g tejido usando 0.45, 0.5 y 0.4 M de manitol, respectivamente. El aporte de CaCl_2 no aumentó el

rendimiento final, aunque los protoplastos aislados mostraron un aspecto más compacto.

Con el objetivo de aumentar el rendimiento, se ensayó la agitación de los matraces durante la incubación en la mezcla de digestión, buscando un equilibrio entre el posible daño producido por la agitación y la mayor liberación de protoplastos que ésta podría proporcionar. El número de protoplastos liberados con agitación fue significativamente inferior al obtenido sin agitación, ya que la agitación favoreció la rotura de los mismos. Para aumentar el rendimiento también se ensayó la aplicación de vacío a la mezcla de digestión durante 10 min antes de la incubación, sin embargo no se observaron diferencias significativas con los rendimientos ya obtenidos. La solución enzimática optimizada para *N. occidentalis* se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de la solución enzimática optimizada para la obtención de protoplastos de *N. occidentalis*.

Solución enzimática	Concentración
Celulasa (%)	0.7
Macerasa (%)	0.5
Manitol (M)	0.45
MES (mM)	5
CaCl ₂ (mM)	10

Una vez puesta a punto la digestión del material vegetal se procedió a optimizar la purificación de los protoplastos. Una vez establecida la concentración adecuada de manitol (0.45 M) en la solución de digestión, esta misma concentración se utilizó en todas las soluciones empleadas en el proceso de purificación y transfección.

Como los protoplastos de *N. occidentalis* son más frágiles que los de *N. benthamiana*, para aumentar el rendimiento se ensayaron tiempos más cortos de centrifugación y fuerzas centrífugas más

bajas. Las condiciones óptimas se consiguieron centrifugando los protoplastos a 100g durante 7 min.

Por último, se ensayó la concentración adecuada del colchón de sacarosa. Para ello, se probaron dos concentraciones: 0.47 y 0.5 M obteniéndose rendimientos de $0.64-0.68 \times 10^6$ y $0.5-0.54 \times 10^6$ (protoplastos/g tejido), respectivamente. Por tanto, en todos los experimentos posteriores de purificación de protoplastos se empleó la concentración óptima de sacarosa de 0.47 M.

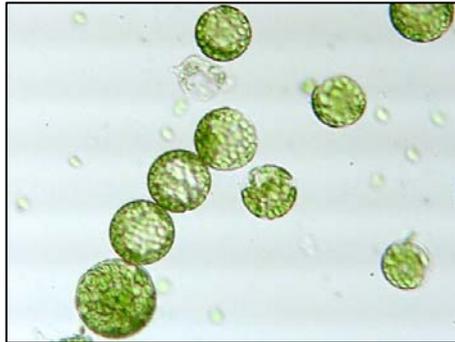


Figura. 2. Protoplastos aislados del mesófilo de *N. occidentalis*.

1.2.2.2. Aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana*.

Para poner a punto el protocolo de aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* (Fig. 3) se partió del descrito previamente por Navas-Castillo (1997). Los experimentos que se plantearon fueron similares a los descritos para la obtención de protoplastos de *N. occidentalis*.

Las plantas se incubaron en una cámara de cultivo en condiciones controladas, a una temperatura de 24° C día y 18° C noche, con 16 horas de luz de una intensidad de 2300-2800 luxes. Se ensayaron digestiones con hojas jóvenes completamente expandidas de plantas de 3, 5 y 7 semanas de edad, obteniéndose una digestión

óptima cuando se utilizaban hojas de plantas recolectadas a las 3 semanas.

Para conocer la combinación óptima de la mezcla de digestión se ensayaron las concentraciones enzimáticas indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones enzimáticas ensayadas para la obtención de protoplastos de *N. benthamiana*.

Enzimas	A	B	C
Celulasa (%)	1	0.9	0.8
Macerasa (%)	0.8	0.7	0.6

Con las condiciones B y C no se produjo una digestión completa del material vegetal, observándose al microscopio una gran cantidad de restos vegetales sin digerir y un número pequeño de protoplastos liberados, mientras que con la mezcla A la digestión de la hoja fue casi completa observándose un número de protoplastos liberados significativamente superior.

El segundo ensayo realizado fue la modificación de la concentración de manitol en la solución enzimática. Las concentraciones probadas fueron de 0.7, 0.6 y 0.5 M añadiéndose a todas ellas CaCl₂ 10 mM. El mayor rendimiento se obtuvo con las soluciones que contenían manitol 0.7 M (0.6-0.8x10⁶ protoplastos/g tejido) y 0.6 M (1.0-1.4x10⁶ protoplastos/g tejido).

Al igual que sucedió en el aislamiento de protoplastos de *N. occidentalis*, la aplicación de vacío antes de la incubación o la agitación suave de los matraces durante la misma no aumentó el rendimiento final del proceso. La composición de la solución enzimática adoptada figura en la tabla 4.

Tabla 4. Solución enzimática optimizada para la obtención de protoplastos de *N. benthamiana*.

Solución enzimática	Concentración
Celulasa (%)	1
Macerasa (%)	0.8
Manitol (M)	0.6
MES (mM)	5
CaCl ₂ (mM)	10

Todas las soluciones del proceso de purificación y transfección de protoplastos se ajustaron a una concentración de manitol de 0.6 M.

Finalmente, las modificaciones realizadas en la concentración del colchón de sacarosa empleado en la etapa de purificación de protoplastos, no mejoraron el rendimiento respecto a la utilizada en el protocolo original.

En general, los rendimientos obtenidos en el aislamiento de protoplastos a partir del mesófilo de *N. benthamiana* oscilaron entre $1.0-1.4 \times 10^6$ protoplastos/g tejido, superiores a los obtenidos a partir de hojas de *N. occidentalis*. Además, los protoplastos de *N. benthamiana* tenían un tamaño mayor y eran más resistentes que los de *N. occidentalis* (Fig. 3).

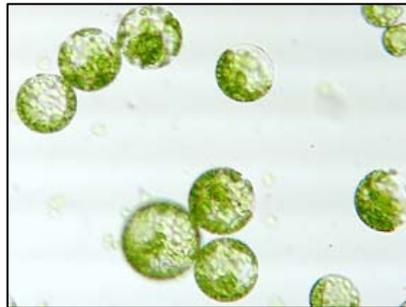


Figura 3. Protoplastos aislados del mesófilo de *N. benthamiana*.

1.2.2.3. Aislamiento de protoplastos de cidro Etrog.

Para aislamiento de protoplastos de cidro (Fig. 4) se partió del protocolo descrito por Grosser y Chandler (1987) con modificaciones (véase materiales y métodos). El proceso es similar al descrito para *N. occidentalis* pero difiere principalmente en los tampones empleados. De la misma manera, se digieren las hojas troceadas durante 15-17 horas en una solución enzimática que contiene: celulasa Onozuka 1%, pectinasa macerasa 1% y pectoliasa 0.2%, disueltas en un tampón con manitol 0.7 M, CaCl₂ 0.77 M, NaH₂PO₄·H₂O 0.032 M, MES 0.25 M, pH 5.8. Después de filtrar y centrifugar la mezcla de incubación, los protoplastos liberados se recogen y se resuspenden en tampón MCPW (manitol 0.7 M, KH₂PO₄ 0.02 M, KNO₃ 0.1M, MgSO₄·7H₂O 0.1 M, KI 0.1 mM, CuSO₄·5H₂O 0.1μM, CaCl₂ 0.1M, MES 6.25 mM) colocándose sobre un colchón de sacarosa 0.5 M. La banda formada por los protoplastos en la interfase de las dos soluciones se recoge y se somete a dos lavados consecutivos con tampón MCPW. Finalmente, los protoplastos se cuentan y se resuspenden en un volumen de MCPW adecuado para dejarlos a la concentración necesaria para la transfección de los mismos.

Para conocer cual era el material idóneo se cultivaron plantas de cidro Etrog en una cámara a 24° C día y 18° C noche con una intensidad lumínica de 7000-8000 luxes y 16 h de luz. Se recolectaron hojas jóvenes en crecimiento y hojas jóvenes completamente expandidas que se incubaron en la mezcla enzimática descrita. En todos los ensayos realizados, la observación al microscopio mostró un mayor número de protoplastos liberados en las digestiones de hojas en crecimiento que en las hojas completamente expandidas.

Para optimizar la mezcla de digestión se ensayaron las combinaciones enzimáticas indicadas en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones enzimáticas ensayadas para la obtención de protoplastos de cidro Etrog.

Enzimas	A	B	C
Celulasa (%)	1	0.85	1.15
Macerasa (%)	1	0.85	1.15
Pectoliasa(%)	0.2	0.16	0.24

La digestión con las diferentes mezclas reveló que la solución B era la que mostraba un mayor número de protoplastos enteros. Las digestiones con la soluciones A y C, aunque presentaban un gran número de protoplastos liberados, la mayoría de ellos estaban rotos, posiblemente debido a una excesiva digestión del material vegetal.

Para ensayar el efecto del manitol en la estabilidad de los protoplastos se ensayaron tres concentraciones 0.7, 0.6 y 0.5 M en la solución enzimática y se comparó con el medio complejo BH3 (manitol y sacarosa suplementado con sales y vitaminas) descrito por Grosser y Gmitter (1990). Los rendimientos más elevados se obtuvieron con la concentración de 0.7 M de manitol. La observación al microscopio de las soluciones enzimáticas con manitol 0.7 M y con medio BH3 no presentaron diferencias significativas en el aspecto de los protoplastos liberados, sin embargo el rendimiento fue mayor utilizando la solución BH3 ($8.3-8.75 \times 10^6$ protoplastos/g tejido) que con la solución de manitol ($6.4-7.0 \times 10^6$ protoplastos/g tejido). La composición de la nueva solución enzimática figura en la tabla 6.

Tabla 6. Solución enzimática optimizada para la obtención de protoplastos de cidro Etrog.

Solución enzimática	Concentración
Celulasa (%)	0.85
Macerasa (%)	0.85
Pectoliasa (%)	0.16
BH ₃ (%)	33
MES (mM)	0.25
CaCl ₂ (mM)	0.77
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (mM)	0.032

Todas las soluciones empleadas en los procesos de purificación y transfección se prepararon con de BH3 (0.7M).

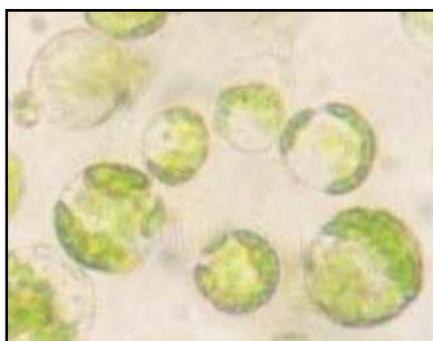


Figura 4. Protoplastos aislados del mesófilo de cidro Etrog.

1.2.2.4. Inoculación de protoplastos con transcritos de CLBV

Para determinar si CLBV era capaz de multiplicar en protoplastos, se obtuvo un extracto semipurificado de viriones (Galipienso et al., 2001) que se inoculó en protoplastos de *N. benthamiana*, *N. occidentalis* y cidro Etrog. La transfección se realizó empleando polietilenglicol (PEG) 8000 al 30% (Cassells y Barlass, 1978), un agente que promueve la fusión celular. Para cada transfección se utilizaron $1-1.5 \times 10^6$, $0.6-1 \times 10^6$, $1-2 \times 10^6$ protoplastos de

cidro, *N. occidentalis* y *N. benthamiana*, respectivamente. Los protoplastos transfectados se incubaron durante cinco días en oscuridad a una temperatura de 28°C. A los días 1, 2, 3, 4 y 5 post-transfección (dpt) se recolectaron los protoplastos y se extrajo el RNA total de los mismos. La replicación viral se detectó mediante hibridación tipo northern blot utilizando una ribosonda de polaridad negativa de CLBV complementaria a la región de la cápsida localizada entre los nucleótidos 7685 y 8044 del gRNA.

Los viriones de CLBV replicaron en protoplastos de las tres especies empleadas, tanto en cidro, que es un huésped natural de CLBV, como en las dos especies de *Nicotiana*, que son huéspedes experimentales. Además, el análisis northern blot también mostró que la acumulación del virus fue mayor en los protoplastos de *N. benthamiana* y *N. occidentalis* que en los de cidro. La presencia de los RNAs genómico y subgenómicos del virus se detectó únicamente a partir de 4-5 dpt, que es el tiempo máximo de supervivencia de los protoplastos en nuestras condiciones de trabajo (Fig. 5).

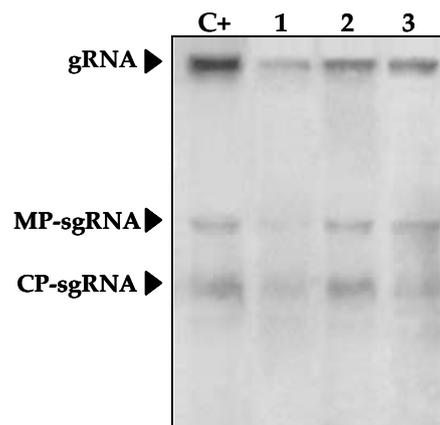


Figura 5. Hibridación northern blot del RNA total extraído a los 4 dpt a partir de protoplastos de cidro (1), *N. occidentalis* (2), y *N. benthamiana* (3) transfectados con viriones semipurificados de CLBV. C+, dsRNA de plantas infectadas con CLBV. La membrana se hibridó con una ribosonda de polaridad negativa marcada con digoxigenina de la región de la cápsida. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de las proteínas de movimiento (MP) y cápsida (CP).

Para determinar si los transcritos obtenidos a partir de los clones de cDNA de CLBV construidos eran infecciosos en protoplastos, se realizó la transcripción *in vitro* de 10 clones independientes de la construcción T7-CLBV en presencia o ausencia de estructura CAP. Para determinar la calidad de los transcritos, éstos se visualizaron en un gel de agarosa estéril al 1% (Fig. 6).

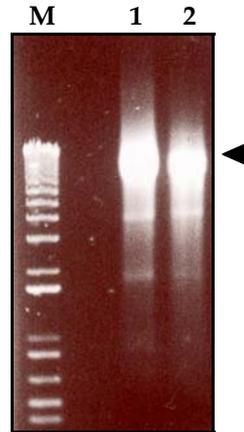


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de transcritos obtenidos *in vitro* a partir de dos clones independientes (1 y 2) de la construcción T7-CLBV. M, marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

La concentración de RNA obtenida en las diferentes transcripciones se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop™) y se utilizaron 10 µg de cada una de ellas para la transfección de protoplastos de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog en presencia de PEG 1540 40%. Como control positivo del bioensayo se transfectaron protoplastos con viriones de CLBV.

Los protoplastos transfectados se incubaron en oscuridad a una temperatura de 28° C. A los 1, 2, 3, 4 y 5 dpt se extrajo el RNA total de los protoplastos y se analizó mediante hibridación northern blot. Sólo en algunas de las transfecciones de protoplastos de *N. benthamiana* se observó acumulación de gRNA y de sgRNAs del virus mediante hibridación tipo northern blot a los 5 dpt, aunque ésta fue

menor que la detectada en protoplastos transfectados con viriones. Únicamente los transcritos a los que se añadió la estructura CAP fueron infecciosos y además no se encontraron diferencias entre los distintos clones ensayados (Fig. 7).

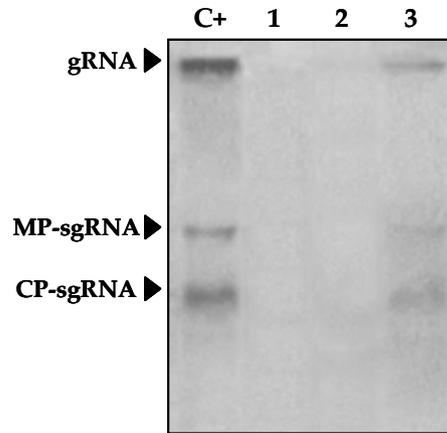


Figura 7. Hibridación northern blot del RNA total extraído a los 5 dpt de protoplastos de cidro (1), *N. occidentalis* (2), y *N. benthamiana* (3) transfectados con transcritos de un clon de T7-CLBV. C+, RNA total de protoplastos transfectados con viriones semipurificados de CLBV. La membrana se hibridó como en la fig. 5. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de las proteínas de MP y CP.

1.2.3. Inoculación directa de transcritos generados a partir del clon de CLBV en plantas de *N. benthamiana* y cidro Etrog.

Con el objetivo de determinar si los transcritos de CLBV eran infecciosos en plantas, se realizó la transcripción *in vitro* de 4 clones independientes de la construcción T7-CLBV en presencia de estructura CAP. Estos transcritos se inocularon mecánicamente en hojas de 4 plantas de *N. benthamiana* previamente espolvoreadas con carborundo, utilizado como agente abrasivo, y en 4 plantas de cidro Etrog mediante 25 cortes en la corteza del tallo con una cuchilla mojada en la solución de transcripción. Las inoculaciones se

realizaron en presencia o ausencia de Lipofectina^R (Invitrogen), detergente catiónico que aumenta la eficiencia de la inoculación. La presencia del virus se estudió mediante extracción del RNA total de las hojas superiores a los 7, 14, 21, 30, 60 y 90 días de la inoculación y amplificación mediante RT-PCR utilizando iniciadores específicos del virus (Galipienso et al., 2004). En ninguna de las plantas inoculadas se detectó la presencia de CLBV.

1.3. DISCUSIÓN

La obtención de un clon infeccioso basado en el genoma de CLBV y el desarrollo de métodos eficaces de inoculación del mismo en cítricos, es un paso imprescindible para la obtención de un vector viral eficiente. Además, la disponibilidad de un clon viral infeccioso permite estudiar aspectos relacionados con la replicación del virus, la expresión génica de sus proteínas o la identificación de los determinantes de patogenicidad virales (Boyer y Haenni 1994; Nagyová y Subr, 2007). El desarrollo de un sistema genético eficaz para manipular CLBV es más complicado que para otros virus de plantas hortícolas debido a factores como: i) el bajo título que alcanza el virus en la planta, ii) el largo período que requieren los ensayos biológicos (hasta un año), iii) CLBV sólo se transmite en cítricos por injerto y experimentalmente mediante cortes en la corteza utilizando extractos semipurificados, si bien este método tiene baja eficiencia, y iv) el único huésped natural del virus son los cítricos, aunque experimentalmente se ha transmitido a plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis*. Al inicio de esta tesis sólo se disponía de información sobre la construcción de un clon infeccioso del aislado T36 de CTV y de su inoculación en plantas de cítricos. De todos los sistemas ensayados de inoculación de este clon infeccioso en cítricos (agroinoculación, inoculación directa de transcritos de RNA en planta, etc.), el único que dio resultado fue la inoculación de transcritos del genoma del virus en protoplastos de *N. benthamiana*,

seguida de una amplificación de los viriones generados en éstos mediante sucesivos pases a nuevos protoplastos, y finalmente, inoculación mecánica de los viriones en plantas de cítricos (Satyanarayana et al., 1999).

En este trabajo hemos intentado reproducir el sistema genético desarrollado para CTV construyendo un clon de cDNA de CLBV y poniendo a punto un protocolo para la inoculación de transcritos de RNA del genoma completo del virus en protoplastos de *N. benthamiana*, *N. occidentalis* y cidro Etrog. El aislamiento de protoplastos de hojas de dichas especies se había descrito anteriormente (Grosser y Chandler, 1987; Navas-Castillo et al., 1997; Albiach-Martí et al., 2004). Sin embargo dichos protocolos deben optimizarse para las condiciones experimentales de cada laboratorio. Se sabe que son tres los factores que más influyen en el aislamiento de protoplastos (Liang et al., 2002; Kanchanaree et al., 2006; Andreu et al., 2009). El primer factor es el estado fisiológico y la edad del material vegetal de partida. El mayor rendimiento (número de protoplastos aislados/g de tejido inicial) en cidro se obtuvo a partir de hojas jóvenes en crecimiento y en *N. occidentalis* y *N. benthamiana* se obtuvo con hojas completamente expandidas de plantas con edades máximas de 4 y 3 semanas, respectivamente. El rendimiento obtenido a partir de hojas de plantas de tabaco más adultas fue mucho menor debido a que se acumula más lignina en las paredes celulares dificultando su digestión. Idénticos resultados se observaron al aislar protoplastos de *Allium ampeloprasum* (Buiteveld y Creemers-Molenaar, 1994), *Medicago Sativa* (Levee et al., 2005) y *Sesbania bispinosa* (Zhao et al., 1995). El segundo factor es la combinación entre la concentración y el tiempo de incubación de las hojas con la mezcla enzimática. Las concentraciones enzimáticas óptimas fueron de: i) celulasa 0.7% y macerasa 0.5%, para *N. occidentalis*, ii) celulasa 1% y macerasa 0.8% para *N. benthamiana*, y iii) celulasa 0.85%, macerasa 0.85%, y pectoliasa 0.16% para cidro. El tiempo de incubación fue de 14h para las dos especies del género

Nicotiana y de 15-17 h para cidro. El uso de concentraciones enzimáticas más elevadas causó toxicidad y rotura de los protoplastos, mientras que utilizando concentraciones más bajas se obtuvieron digestiones incompletas. Cada especie vegetal necesita una combinación diferente de enzimas y de tiempos de incubación necesaria para optimizar el rendimiento de obtención de protoplastos. Por ejemplo, para obtener protoplastos de arroz las hojas se incuban durante 4 h en la mezcla enzimática que contiene celulasa 1% y funcelasa 1% (Toyama, 1989) y para obtener protoplastos de ciruelo hay que incubar las plantas en oscuridad durante 7 días antes de la digestión y ésta se realiza con celulasa 1%, pectoliasa 0.1% y macerozima 0.5% (Andreu et al., 2009), lo que confirma que las condiciones deben ser puestas a punto para cada sistema. Por último, el tercer factor determinante es el efecto de la concentración de manitol, ya que éste proporciona el potencial osmótico adecuado para la supervivencia de los protoplastos (Maeda y Hagiwara, 1974; Ohshima y Toyama, 1989). La concentración óptima de manitol para la extracción de protoplastos de *N. occidentalis* se estableció en 0.45 M una concentración similar a la utilizada por Satoh (2000), 0.6 M para protoplastos de *N. benthamiana* y 0.7 M para los de cidro. En el caso de los cidros, los mejores rendimientos se obtuvieron utilizando BH_3 como solución osmótica, confirmando los resultados obtenidos previamente por Grosser y Gmitter (1990). Las condiciones de obtención de protoplastos puestas a punto en esta tesis diferían de las descritas en los protocolos originales (Grosser y Chandler, 1987; Navas-Castillo et al., 1997; Albiach-Martí et al., 2003) confirmando la hipótesis inicial de que es necesario optimizar las mismas para las condiciones experimentales de cada laboratorio.

CLBV replicó en protoplastos de las tres especies transfectadas con viriones purificados a partir de material vegetal infectado (Galipienso et al., 2001), aunque el nivel de replicación fue bajo y variable. La máxima tasa de replicación se detectó en protoplastos de

N. benthamiana, a pesar de no ser un huésped natural del virus. Idénticos resultados se observaron al transfectar protoplastos de *N. benthamiana* y naranjo dulce Washington Navel con viriones de CTV, donde la mayor tasa de replicación viral se observó en los protoplastos de tabaco (Navas-Castillo et al., 1997). El mayor nivel de replicación de CLBV observado en los protoplastos de *N. benthamiana* podría ser debido a que la tasa de multiplicación del virus por protoplasto en este huésped sea mayor o a que se consiga transfectar un mayor número de protoplastos. Lo más probable es la primera hipótesis, ya que se sabe que *N. benthamiana* es deficiente en la RNA polimerasa I por lo que el sistema de silenciamiento de esta especie es menos eficiente y permite una mayor acumulación del virus (Yang et al., 2004). El virus se detectó a los 4 dpt, un periodo cercano al límite de supervivencia de los protoplastos. Este periodo de incubación es superior al necesario cuando se inoculan protoplastos con otros virus como CTV (Navas-Castillo, 1997), el virus del moteado amarillo del arroz (RYMV) (Brugidou et al., 1995), el virus del amarilleo de las cucurbitáceas (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) (Prüfer et al., 1995), el virus del amarilleo infeccioso de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV) (Klassen et al., 1996), el virus del rizado moteado de la alcachofa (*Artichoke mottle crinkle virus*, AMCV) (Tavazza et al., 1994) y el virus de los anillos cloróticos del hibiscus (*hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV) (Liang et al., 2002), donde la infección viral se detecta a los 2 dpt. Esto puede ser debido a que CLBV tenga una tasa de multiplicación menor que otros virus de plantas o a que el método de transfección empleado en este trabajo sea menos eficiente. Aunque no son métodos comparables, en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con clones de cDNA de CLBV, el virus se detecta mediante análisis northern blot a partir de 5 días postinoculación (dpi) (ver capítulo siguiente). Esto sugiere que la primera hipótesis es la más probable, ya que en la agroinoculación de clones infecciosos de otros virus la acumulación

viral se detecta a tiempos más tempranos (Martinez-Priego et al., 2008).

En los protoplastos de *N. benthamiana* transfectados con transcritos a los que se les había añadido la estructura CAP, se detectó replicación viral a los 5 dpt mientras que nunca se detectó en inoculaciones con transcritos sin esta estructura. Este resultado sugiere que la estructura CAP contribuye a la infectividad aumentando la traducción inicial del transcrito (Shih et al., 1976; Contreras et al., 1982), y/o aumentando su estabilidad al limitar la degradación mediada por las nucleasas del hospedador (Furuichi et al., 1977; Shimotohno et al., 1977; Green et al., 1983). De la misma manera, en CTV y LIYV sólo los transcritos virales a los que se les añadió una estructura CAP resultaron infecciosos (Satyanarayana et al., 1999; Klaassen et al., 1996), mientras que en el caso de RYMV y AMCV, ambos tipos de transcritos (con y sin CAP), resultaron infecciosos (Tavazza et al., 1994; Brugidou et al., 1995).

La acumulación detectada a los 5 dpt en protoplastos transfectados con viriones de CLBV fue superior a la observada al emplear transcritos. Esta diferencia de acumulación también se observó con CTV, donde la multiplicación viral se detectó a los 2 dpt al inocular viriones y a los 3 dpt al inocular transcritos (Satyanarayana et al., 1999), pero no con la mayoría de virus, que se acumulan de forma similar en protoplastos transfectados con viriones o transcritos (Tavazza et al., 1994; Brugidou et al., 1995; Klassen et al., 1996).

Los aislados de CLBV, al igual que otros virus de genoma de RNA, están compuestos por una población de variantes de secuencia. El hecho de que los 10 clones ensayados fuesen infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y multiplicasen de forma similar, sugiere que no debe haber grandes diferencias de infectividad entre las distintas variantes de secuencia del aislado SRA 153, a partir del cual se obtuvo el clon de cDNA. En estudios previos donde se

analizó la diversidad genética de la población de CLBV dentro de aislados y entre aislados de diferentes países, se observó que ésta era de las más bajas en comparación con otros virus de RNA estudiados (Vives et al., 2002).

La inoculación mecánica directa en plantas de cidro Etrog o de *N. benthamiana* con transcritos del genoma de CLBV fue infructuosa a pesar de que éstos sí eran capaces de infectar protoplastos. Intentos previos de inocular cítricos con transcritos o RNA purificados de viriones de CTV utilizando distintos aditivos o procedimientos tampoco tuvieron éxito (Satyarayana et al., 1999, 2001).

Los resultados obtenidos sugieren que, aunque los clones de la construcción T7-CLBV son infecciosos en protoplastos, el RNA del virus no es un inóculo eficiente para infectar plantas.

CAPÍTULO 2:

CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL INICIO Y PROMOCIÓN DE LA SÍNTESIS DEL RNA SUBGENÓMICO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE CLBV.

CAPÍTULO 2

2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Para emplear un clon infeccioso como vector viral, es necesario modificar su genoma introduciendo puntos de corte únicos que permitan insertar los genes cuya función se desea determinar. La secuencia del gen a estudiar se puede introducir en distintas zonas del genoma del virus, sin embargo se ha observado que se obtienen niveles más altos de expresión si el gen a ensayar se clona bajo el promotor de un sgRNA que si se clona en otras regiones del genoma viral (Liu et al., 2002; Ratcliff et al., 2001). Para clonar una secuencia bajo el promotor de un sgRNA se pueden emplear diversas estrategias, pero la más utilizada consiste en la duplicación de dicho promotor en una región no codificante del genoma viral, lo que permite transcribir genes o fragmentos de genes induciendo la formación de un nuevo sgRNA. Además, se sabe que el tamaño de la secuencia que se inserta en el genoma del virus puede influir en la replicación y/o movimiento del mismo. Por todo ello, es importante localizar y caracterizar la secuencia mínima implicada en el reconocimiento y promoción de la síntesis de los sgRNAs de CLBV, para obtener un vector viral eficiente que nos permita silenciar o expresar genes foráneos mediante la duplicación de uno de los promotores de los sgRNAs del virus.

La localización y caracterización de los posibles elementos involucrados en la síntesis de los sgRNAs requiere introducir supresiones de nucleótidos y mutaciones en la región del genoma del virus que se quiere estudiar. En la mayoría de virus de RNA, los elementos de secuencia que regulan la expresión de los sgRNAs normalmente están localizados antes del inicio de transcripción de los mismos (Miller y Koev, 2000). En CLBV, el extremo 5' terminal del RNA subgenómico 3'coterminar de la proteína de movimiento (MP-sgRNA) se localizó en la posición nucleotídica 5839 de la cadena

positiva del gRNA, 124 nt antes del codón de parada del ORF que codifica la poliproteína implicada en la replicación del virus (Vives et al., 2002). Por ello, es posible que la secuencia promotora del MP-sgRNA esté localizada dentro de los dominios funcionales de la polimerasa del virus (nt 5066-5752 del gRNA), por lo que las supresiones en dicha región podrían impedir la replicación del virus. Sin embargo, el extremo 5' del sgRNA de la proteína de cápsida (CP-sgRNA) de CLBV se localizó en la posición nucleotídica 6831 del gRNA, dentro del ORF que codifica la MP (Vives et al., 2002), proteína que no debe ser imprescindible para la replicación del virus. Por dicho motivo y porque el CP-sgRNA se acumula en mayor proporción que el MP-sgRNA, decidimos mapear el promotor del primero en su contexto natural.

Hasta la fecha, todos los estudios realizados para caracterizar *in vivo* las secuencias implicadas en la promoción de los sgRNAs de virus de plantas, se han realizado mediante la inoculación de transcritos del virus en protoplastos (Gowda et al., 2001; Ayllón et al., 2003, 2004; Sivakumaran et al., 2004; Li y Wong, 2006). Sin embargo, como se ha visto en el capítulo anterior, en protoplastos de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog transfectados con viriones o con transcritos infecciosos de CLBV generados *in vitro*, sólo se detectaron pequeñas cantidades de RNA viral (gRNA y sgRNAs), por lo que es imposible utilizar este sistema genético para caracterizar el promotor del CP-sgRNA.

Por todo ello, los objetivos concretos de este de este capítulo fueron:

- Desarrollar un sistema genético basado en la agroinoculación de hojas de *N. benthamiana* con un clon de cDNA de CLBV.
- Determinar la secuencia mínima promotora del sgRNA de la proteína de cápsida de CLBV.

- Evaluar el efecto de la modificación del inicio de transcripción en la síntesis del sgRNA de la cápsida.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Desarrollo de un sistema genético basado en la agroinoculación de hojas de *N. benthamiana* con un clon de cDNA de CLBV.

Los promotores de los sgRNAs de los virus con genoma de polaridad positiva están localizados en la cadena negativa del RNA genómico (Miller y Koev, 2000), sin embargo por comodidad emplearemos la numeración de los nucleótidos referidos a la cadena positiva. Así, nos referiremos al nucleótido 5´ terminal de la cadena positiva del sgRNA como el nucleótido +1.

En el laboratorio se disponía de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el control del promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (IC-CLBV). En hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas con dicho clon se observó una buena acumulación tanto del gRNA como de los dos sgRNAs del virus (Vives et al., 2008). Ello nos hizo pensar que la inoculación de construcciones derivadas de IC-CLBV con supresiones o mutaciones en el gen de la MP podrían inducir la formación de viriones defectivos capaces de multiplicarse en las células agroinoculadas, independientemente de que el virus fuera capaz o no de moverse célula a célula o a larga distancia. Para ensayar esta hipótesis se sintetizó el mutante M1, en el que se introdujo un codón de parada en el aminoácido 118 de la MP mediante la sustitución en el clon IC-CLBV de los nucleótidos GAA, localizados en la posición 6313-6315 nt del genoma viral, por TGA. Para estudiar si el mutante M1 era capaz de multiplicarse y moverse, se agroinocularon hojas de *N. benthamiana* con esta construcción utilizando como control el clon IC-CLBV. Se realizaron 3 ensayos independientes en los que se utilizaron 3 plantas para cada

una de las construcciones y en cada planta se agroinocularon 3 hojas. Para hacer un seguimiento temporal de la cinética de acumulación del virus en las hojas agroinoculadas con el mutante M1 y con el clon IC-CLBV, se extrajo el RNA total de la zona agroinoculada a los 5, 7, 9, 12 y 19 días postinoculación (dpi) y se analizó mediante hibridación northern blot empleando ribosondas de las cadenas positiva y negativa del ORF de la cápsida. La ribosonda de polaridad negativa hibridó tanto con el gRNA como con los dos sgRNAs 3' coterminales, mientras que la hibridación con la ribosonda de polaridad positiva no dio señal alguna. Estos resultados sugieren que los RNAs de cadena positiva se acumulan en los tejidos infectados en mucha mayor proporción que los de cadena negativa. Además de las bandas correspondientes al gRNA y los sgRNAs, también se observaron bandas adicionales de tamaño inferior al CP-sgRNA que no se observaban en extractos idénticos de RNA de planta sana. Sin embargo, estas bandas no aparecían en todas las extracciones y su intensidad variaba incluso entre diferentes extracciones de la misma planta, por lo que se consideró que debían ser productos de degradación. El análisis mediante northern blot mostró que a 5 dpi la acumulación del gRNA y de los sgRNAs fue similar en las hojas agroinoculadas con el clon IC-CLBV y en las inoculadas con el mutante M1. Sin embargo, a tiempos más largos la acumulación fue mayor en las hojas inoculadas con el clon IC-CLBV (Fig. 1). Estos resultados sugieren que el mutante M1 sólo se multiplica en las células agroinoculadas mientras que el clon IC-CLBV, además de multiplicarse en las células agroinoculadas, es capaz de moverse y multiplicarse en las células adyacentes. Por otro lado, los resultados obtenidos indican que los mutantes defectivos en el movimiento viral son capaces de replicarse en células agroinoculadas, detectándose tanto el gRNA como ambos sgRNAs a un nivel aceptable mediante hibridación northern blot, por lo que la agroinoculación directa de las construcciones en hojas de *N. benthamiana* constituye un sistema genético adecuado para mapear *in vivo* el promotor del CP-sgRNA.

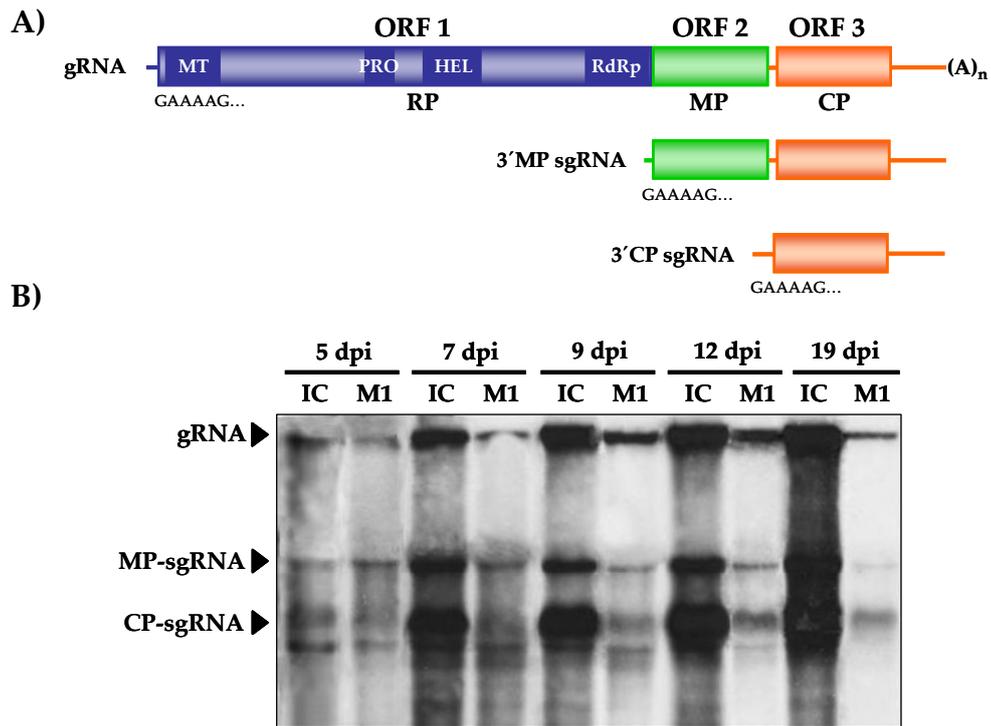


Figura 1. Dinámica de acumulación de CLBV en hojas de *N.benthamiana*. (A) Representación esquemática del RNA genómico (gRNA) y de los RNAs subgenómicos 3' coterminales de las proteínas de movimiento (3'MP-sgRNA) y cápsida (3'CP-sgRNA) de CLBV. Los rectángulos representan los marcos de lectura abierta (ORFs). (B) Análisis northern blot a los 5, 7, 9, 12 y 19 dpi del RNA total de hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas con el clon IC-CLBV (IC) y el mutante M1, que contiene un codón de parada en la proteína de movimiento. La membrana se hibrida con una ribsonda de polaridad negativa de la cápsida marcada con digoxigenina. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLBV.

Para estudiar si el mutante M1 era capaz de moverse a larga distancia, a los 30 dpi se analizó la presencia de CLBV en las hojas nuevas no agroinfiltradas mediante RT-PCR utilizando iniciadores específicos e hibridación northern blot con la ribsonda de la cápsida. Solamente se detectó infección sistémica en las plantas

agroinoculadas con el clon IC-CLBV pero no con el mutante M1. La identificación del ORF 2 como la posible proteína de movimiento del virus se había sugerido previamente al inferir su función mediante comparación de la secuencia aminoacídica con proteínas de movimiento de otros virus disponibles en la base de datos y localizar los dominios característicos de las proteínas de movimiento de la familia 30K (Vives et al., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la proteína codificada por el ORF 2 de CLBV es necesaria para el movimiento del virus, tanto célula a célula como a larga distancia.

2.2.2. Determinación de la secuencia mínima promotora del sgRNA de la proteína de cápsida de CLBV.

En el RNA genómico de CLBV, los ORFs que codifican las proteínas MP y CP están organizados en tandem y separados por una UTR de 64 nt (Vives et al., 2001). El inicio de transcripción del CP-sgRNA se localizó en la posición 6831 del genoma del virus, 284 nt antes del codón de inicio de la CP (nt 7115) y dentro del marco de lectura de la MP, 220 nt antes del codón de parada de este ORF (Vives et al., 2002). Para delimitar la secuencia mínima promotora del CP-sgRNA por el extremo 5' se realizaron supresiones progresivas en el clon IC-CLBV desde la posición -520 hacia el inicio de transcripción de dicho sgRNA. Los mutantes generados presentaban deleciones que se extendían desde el nucleótido -520 hasta los nucleótidos -202 (mutante M2), -112 (mutante M3), -67 (mutante M4), -22 (mutante M5) y +1 (mutante M6), respectivamente (Fig. 2A). Para estudiar la multiplicación del virus y su capacidad de producir los distintos sgRNAs, estas construcciones se agroinocularon en hojas de *N. benthamiana* utilizando como controles positivos el mutante M1 y el clon IC-CLBV. Para cada construcción se emplearon 3 plantas de 3 semanas de edad y se realizaron 4 ensayos independientes. En cada ensayo se recolectó la zona agroinfiltrada a los 12 dpi y se extrajo el

RNA total a partir de la mezcla de hojas inoculadas con cada construcción. En el análisis del RNA total mediante hibridación northern blot se detectó la presencia del CP-sgRNA en las hojas agroinfiltradas con los mutantes M2, M3 y M4, pero no en aquellas agroinoculadas con los mutantes M5 y M6 (Fig. 2B). En estos últimos mutantes no se observaron niveles detectables de CP-sgRNA, incluso utilizando mayor cantidad de RNA total para el análisis mediante northern blot. Estos resultados sugieren que el extremo 5' del promotor del CP-sgRNA está localizado entre los nucleótidos -67 y -22 antes del inicio de transcripción.

La hibridación northern blot también reveló que la acumulación del CP-sgRNA respecto al gRNA o MP-sgRNA en las hojas agroinoculadas con los mutantes M2, M3 y M4 era menor que en las hojas agroinoculadas con el mutante M1 o con el clon IC-CLBV (Fig. 2B). La disminución en la acumulación del CP-sgRNA en estos mutantes podría ser debida a la presencia de una secuencia potenciadora de la actividad promotora del CP-sgRNA entre las posiciones -520 y -202 o a que las supresiones realizadas dentro del ORF de la MP afectasen la capacidad de replicación o la estabilidad del virus induciendo cambios en la acumulación del CP-sgRNA. Para descartar la primera hipótesis se construyó el mutante M7, en el que el segmento comprendido entre los nucleótidos -520 y -202 se fusionó al extremo 5' del mutante M4, que teóricamente contiene la región promotora mínima por el extremo 5' (Fig. 2A). La hibridación northern blot mostró una acumulación de CP-sgRNA similar en los mutantes M4 y M7 (Fig. 2B), lo que sugiere que cualquier supresión en esta región genómica puede afectar la capacidad de replicación o la estabilidad del virus.

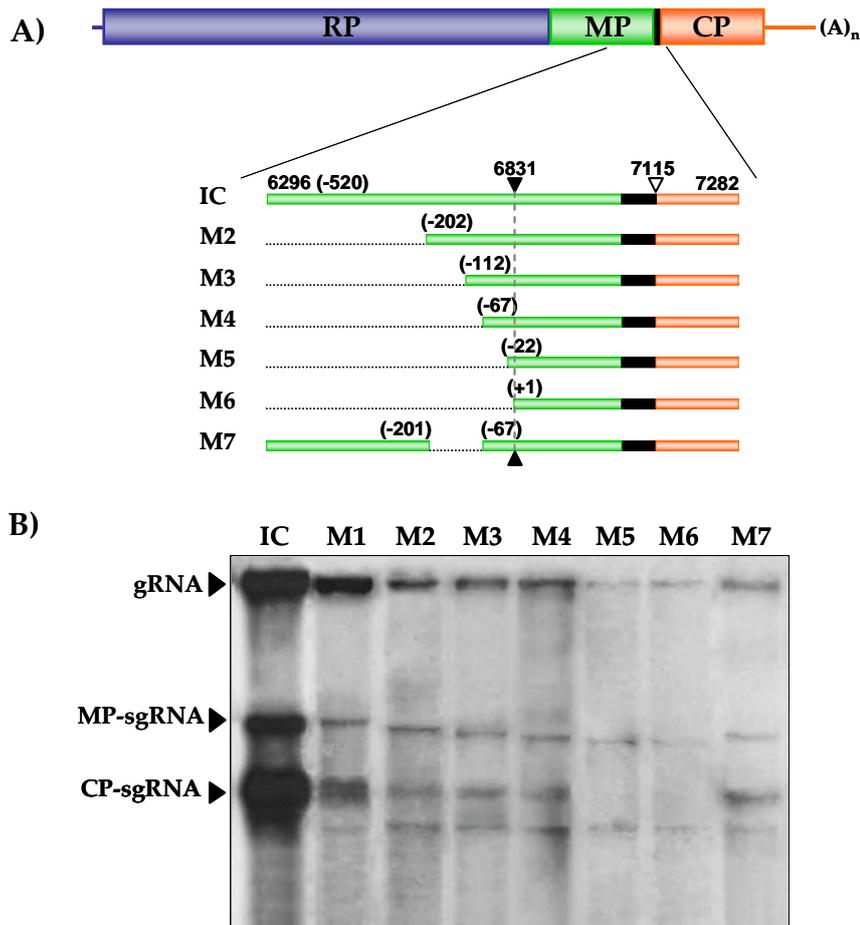


Figura 2. Mapeo del extremo 5' del promotor del CP-sgRNA de CLB. A) Representación esquemática de los mutantes (M2-M7) que incluyen supresiones progresivas desde la posición -520 hacia el inicio de transcripción del CP-sgRNA. El inicio de transcripción (posición 6831 del gRNA) está representado por flechas negras unidas entre sí por una línea discontinua. El codón de inicio de traducción de la CP (posición 7115 del gRNA) está representado por una flecha blanca. Los rectángulos de colores representan regiones codificantes del gRNA. El rectángulo negro indica la región intergénica. Las líneas punteadas representan las secuencias suprimidas en cada mutante. Los números en paréntesis indican la posición nucleotídica desde el inicio de transcripción del CP-sgRNA. (B) Análisis northern blot del RNA total de hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas con IC-CLBV y los mutantes (M1- M7) a los 12 dpi. La membrana se hibridó como se indica en la figura 1. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLB.

Por otra parte, la acumulación del gRNA en las hojas agroinoculadas con los mutantes M2 a M7 fue menor que en las hojas agroinoculadas con el mutante M1 (Fig. 2B). El hecho de que la acumulación del CP-sgRNA fuera muy baja en los mutantes M2, M3, M4 y M7 y nula en los mutantes M5 y M6, nos hizo pensar que la proteína de la cápsida es necesaria para la acumulación del virus dentro de la célula. Para comprobar esta hipótesis, a partir del clon IC-CLBV se construyó el mutante M8 en el que se introdujo un codón de parada en segundo aminoácido de la CP mediante la sustitución de los nucleótidos AAA por TGA, localizados en la posición 7118-7120 del genoma del virus. Esta construcción se agroinfiltró en hojas de *N. benthamiana* utilizando como control positivo el clon IC-CLBV. Para realizar un seguimiento temporal de la acumulación de los viriones generados por el mutante M8, se extrajo el RNA total de las hojas agroinfiltradas a los 5, 7, 9, 12 y 19 dpi. El análisis mediante hibridación northern blot mostró un ligero incremento en la acumulación del gRNA y de los sgRNAs hasta 9 dpi, para luego ir disminuyendo progresivamente a tiempos más largos (Fig. 3). En las muestras recolectadas a 19 dpi o a tiempos mayores, no se pudo detectar la presencia de RNAs virales, ni siquiera en los análisis donde se utilizó una concentración más elevada de RNA total. Estos resultados sugieren que CLBv es capaz de replicarse y transcribir sus sgRNAs en ausencia de proteína de cápsida, sin embargo, al estar el RNA del virus sin la protección que le confiere la cápsida la planta lo elimina, posiblemente por activación del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional.

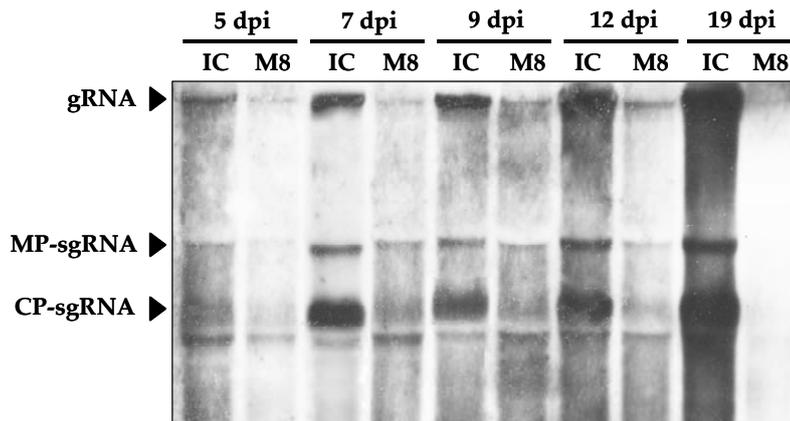


Figura 3. Hibridación northern blot del RNA total de plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con IC-CLBV (IC) y el mutante M8, que contiene un codón de parada en la proteína de la cápsida. Los extractos de RNAt de hojas agroinfiltradas fueron preparados a los 5, 7, 9, 12 y 19 dpi. La membrana se hibridó como indica la figura 1. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLBV.

Para determinar si las secuencias localizadas detrás del inicio de transcripción forman parte del promotor del CP-sgRNA, se sintetizaron cuatro mutantes con supresiones progresivamente más largas desde el nucleótido +284 (codón de inicio de traducción de la CP) (Vives et al., 2002) hacia el inicio de transcripción del CP-sgRNA. Los mutantes generados presentaban deleciones que se extendían desde el nucleótido +284 hasta los nucleótidos +169 (mutante M9), +113 (mutante M10), +50 (mutante M11) y +8 (mutante M12), respectivamente (Fig. 4A). Estos mutantes se agroinocularon en hojas de *N. benthamiana* utilizando como controles el clon IC-CLBV y el mutante M1. Para cada construcción se agroinocularon 3 hojas de 3 plantas y se realizaron 3 ensayos independientes. Para cada mutante, a los 12 dpi se recolectó la región agroinfiltrada de todas las hojas inoculadas y se extrajo el RNA total. El análisis mediante hibridación northern blot mostró que todos los mutantes replicaban de forma similar al mutante M1 e inducían la síntesis del CP-sgRNA, excepto

el mutante M12 (Fig. 4B). Además, el nivel de acumulación del CP-sgRNA del mutante M9 fue similar al del mutante M1 mientras que, sorprendentemente, en los mutantes M10 y M11, que presentaban supresiones más grandes, se produjo un aumento en la acumulación del CP-sgRNA respecto al mutante M1 (Fig. 4B). Estos resultados sugieren que el extremo 3' del promotor del CP-sgRNA está localizado entre los nucleótidos +50 y +8 por detrás del inicio de transcripción y que las secuencias localizadas entre los nucleótidos +169 y +50 pueden actuar como inhibidoras de la transcripción del CP-sgRNA regulando la expresión de la proteína de cápsida.

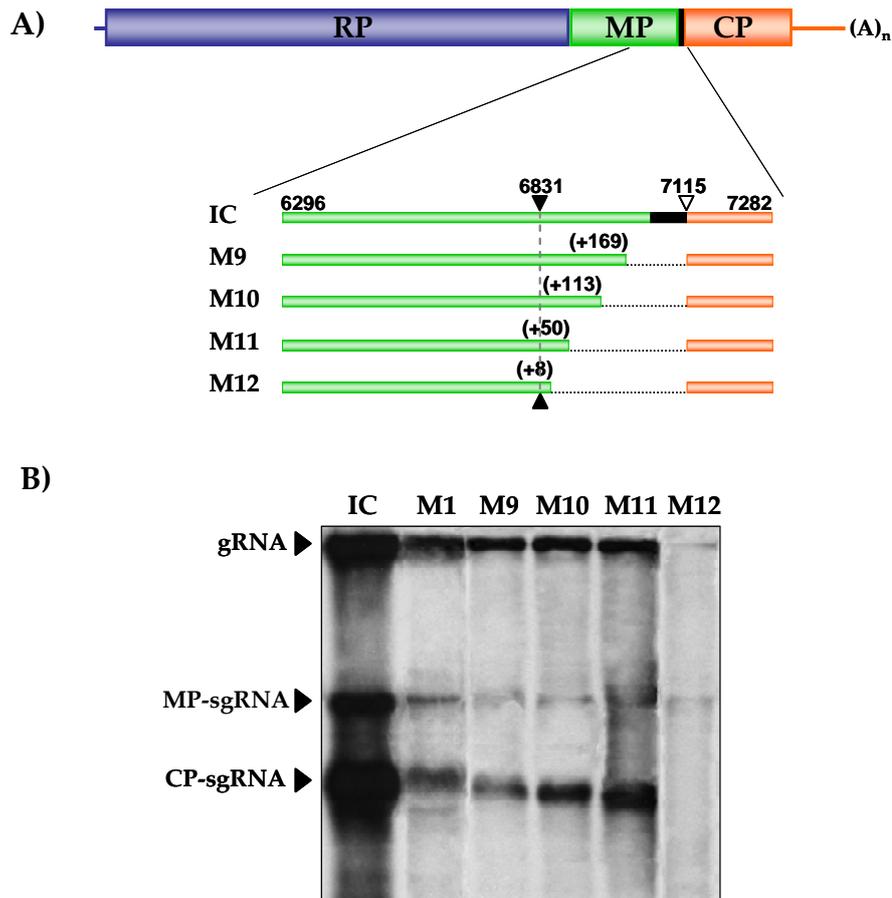


Figura 4. Mapeo del extremo 3' del promotor del CP-sgRNA de CLB. (A) Representación esquemática de los mutantes (M9-M12) que incluyen supresiones progresivas desde la posición +284 hacia el inicio de transcripción del CP-sgRNA. El inicio de transcripción (posición 6831 del gRNA) está representado por flechas negras unidas entre sí por una línea discontinua. El codón de inicio de traducción de la CP (posición 7115 del gRNA) está representado por una flecha blanca. Los rectángulos de colores representan regiones codificantes del gRNA. El rectángulo negro indica la región intergénica. Las líneas punteadas representan las secuencias suprimidas de cada mutante. Los números en paréntesis indican la posición nucleotídica desde el inicio de transcripción del CP-sgRNA. (B) Hibridación northern blot del RNA total de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con IC-CLBV y los mutantes M1 y M9-M12 a los 12 dpi. La membrana se hibridó como indica la figura 1. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLB.

Para confirmar los resultados anteriores, se construyeron cuatro nuevos mutantes M13, M14, M15 y M16 que contenían el extremo 5' constante (-67) e idéntico al mutante M4 y diferentes extremos 3', +169, +113, +50 y +8, respectivamente (Fig. 5A). El análisis mediante hibridación northern blot del RNA total extraído a los 12 dpi de las hojas agroinoculadas con estos mutantes, mostraron una acumulación del gRNA y del CP-sgRNA similar a la detectada en las hojas agroinoculadas con el mutante M4, excepto en el mutante M16 donde no se detectó síntesis del CP-sgRNA (Fig. 5B). Además, en los mutantes M14 y M15, que presentaban supresiones más largas por el extremo 3' desde el inicio de transcripción, de nuevo se detectó un aumento en la acumulación del CP-sgRNA, aunque no fue tan evidente como en los mutantes M10 y M11 (Fig. 5B).

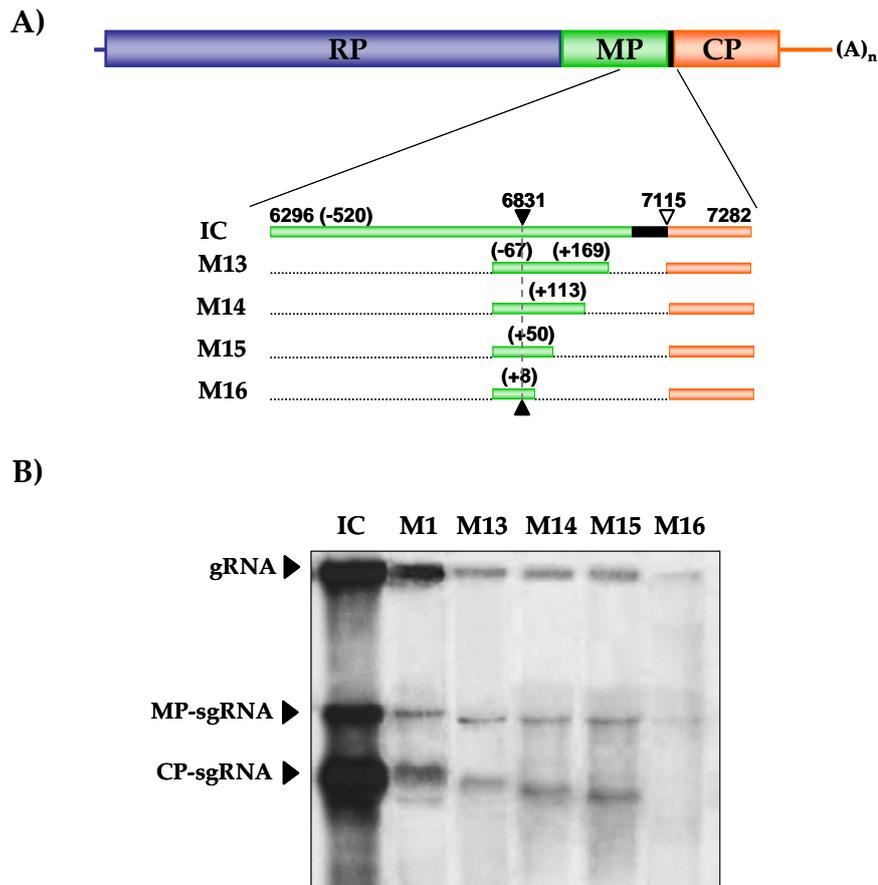


Figura 5. Mapeo del promotor del CP-sgRNA de CLBV en los extremos 5' y 3'. (A) Representación esquemática de los mutantes (M13-M16) que incluyen supresiones progresivas desde la posición +284 hacia el inicio de transcripción del CP-sgRNA. Los demás detalles se muestran en la figura 2. (B) Hibridación northern blot del RNA total de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con IC-CLBV y los mutantes M1 y M13-M16 a los 12 dpi. La membrana se hibridó como indica la figura 1. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLBV.

Los resultados obtenidos en este apartado indican que la posible secuencia promotora mínima del CP-sgRNA está comprendida entre los nucleótidos -67 y +50 respecto al inicio de transcripción, por lo

tanto sería suficiente una región nucleotídica igual o inferior a 117 nt para controlar la producción del CP-sgRNA.

Para investigar la posible implicación de una estructura secundaria del RNA en el reconocimiento del promotor por la polimerasa viral para la síntesis del CP-sgRNA, se analizó la estructura secundaria de mínima energía predecible para la secuencia de 117 nt (-67 a +50) del promotor mínimo y las regiones flanqueantes del mismo, utilizando el programa MFOLD (Zuker, 2003). Como hemos indicado anteriormente, los promotores de los sgRNAs en los virus de cadena positiva están localizados en la cadena negativa del RNA genómico, por lo tanto se analizó esta secuencia. El análisis de las distintas regiones genómicas no permitió identificar ninguna estructura secundaria conservada que pudiera ser reconocida por la polimerasa del virus para inducir la síntesis del CP-sgRNA. De igual forma, el análisis de las posibles estructuras secundarias de mínima energía de las regiones adyacentes al inicio de transcripción del CP-sgRNA y del MP-sgRNA, no reveló la presencia de ningún elemento conservado en ambas regiones del genoma que permitiese explicar el reconocimiento y promoción de los sgRNAs por parte de la polimerasa del virus.

2.2.3. Efecto de la modificación del inicio de transcripción en la síntesis del sgRNA de la cápsida.

En la secuencia de CLBV, el hexanucleótido GAAAAG está presente en el extremo 5' del gRNA y de los dos sgRNAs 3' coterminales del virus (Vives et al., 2001; 2002). Para estudiar la importancia de esta secuencia en la síntesis del CP-sgRNA, se realizaron mutaciones o supresiones individuales de los distintos nucleótidos que la componen mediante mutagénesis dirigida.

En primer lugar se sustituyó el inicio de transcripción G (+1) del CP-sgRNA por A, C o T, obteniendo los mutantes M17, M18 y M19, respectivamente (Fig. 6A). El cambio nucleotídico en estos mutantes

no afecta a la secuencia aminoacídica de la proteína de movimiento. La capacidad de replicarse y de inducir la formación de los sgRNAs de estos mutantes se estudió mediante agroinoculación de los mismos en hojas de *N. benthamiana*. Como controles positivos se agroinocularon hojas de *N. benthamiana* con el con IC-CLBV y los mutantes M1 y M8. Se realizaron 4 ensayos independientes y el RNA total extraído a los 12 dpi de las hojas agroinfiltradas se analizó mediante hibridación northern blot. Este análisis mostró una disminución drástica en la acumulación del CP-sgRNA en las hojas agroinoculadas con los tres mutantes respecto a la detectada en hojas inoculadas con controles positivos (Fig. 6B), confirmando los resultados previos de Vives et al., (2002), donde se identificó esta posición como el inicio de transcripción del CP-sgRNA.

En segundo lugar se analizó el efecto de la sustitución de A (+2) por los nucleótidos G (mutante M20), C (mutante M21) y T (mutante M22) (Fig. 6A). La hibridación northern blot de los extractos de RNA total de las hojas agroinfiltradas mostró resultados similares a los anteriores, detectándose una disminución drástica en la acumulación del CP-sgRNA respecto a los controles positivos (Fig. 6B).

La acumulación del virus en las hojas agroinoculadas con los mutantes M17 a M22 fue similar a la de las hojas agroinoculadas con el mutante M8, en el que se había introducido un codón de parada en el ORF de la CP (Fig. 6B). Este resultado confirma que la presencia de la proteína de cápsida de CLBV es necesaria para la acumulación del virus en las células

En tercer lugar se sintetizó el mutante M23 en el que se suprimió una A del hexanucleótido conservado (Fig. 6A). Este cambio rompe el marco de lectura de la proteína de movimiento. El análisis de los extractos de RNA total a los 12 dpi mediante hibridación northern blot reveló una acumulación del CP-sgRNA similar a la obtenida con el mutante M1 (Fig. 6B), lo que indica que este nucleótido no es necesario para el reconocimiento por la RNA polimerasa del virus.

La acumulación de gRNA en las hojas agroinfiltradas con este mutante fue similar a la observada con el mutante M1 y más baja que con el clon IC-CLBV. El virus no pudo ser detectado mediante RT-PCR en extractos de RNA total de las hojas superiores de las plantas agroinfiltradas con el mutante M23. Estos resultados sugieren que la región carboxiterminal de la proteína de movimiento de CLBV es esencial para el movimiento célula a célula y a larga distancia durante la infección del virus en la planta.

Por último se substituyó la última G (+6) del hexanucleótido por los nucleótidos A (mutante M24), C (mutante M25) y T (mutante M26) (Fig. 6A). Dichas mutaciones cambiaban el aminoácido original arginina 292 de la MP por una lisina, treonina e isoleucina, respectivamente. La cantidad de RNA viral (gRNA y ambos sgRNAs) detectada en las hojas agroinoculadas con los 3 mutantes fue similar a la detectada en las hojas agroinoculadas con el clon IC-CLBV (Fig. 6B). Además, el virus se detectó mediante RT-PCR en las hojas superiores no inoculadas de las plantas agroinfiltradas con los tres mutantes, lo que indica que la arginina 292 no es esencial para la funcionalidad de la proteína de movimiento del virus. Todos estos resultados también sugieren que la presencia simultánea de las cuatro A y de la G (+6) en el hexanucleótido GAAAAG no es necesaria para el reconocimiento por la polimerasa de CLBV.

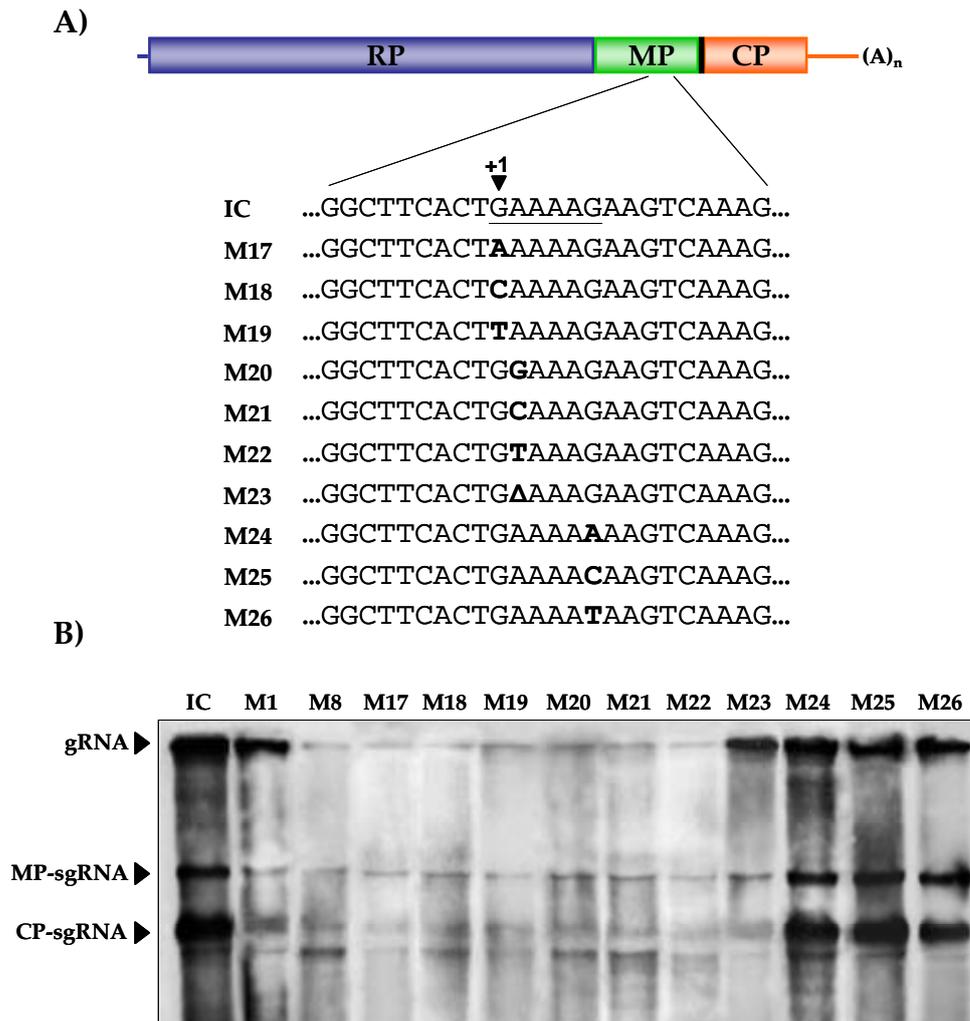


Figura 6. Efecto de la modificación del inicio de transcripción en la síntesis del CP-sgRNA de CLB. (A) Secuencia nucleotídica de la región del gRNA de CLB alrededor del inicio de transcripción del CP-sgRNA del clon IC-CLB (IC) y de los mutantes M17-M26. El nt +1 del CP-sgRNA está representado por una flecha negra. El nucleótido mutado en cada construcción está indicado en negrita. (B) Análisis northern blot a los 12 dpi del RNA total aislado de las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el clon IC-CLB y los mutantes M1, M8 y M17-M26. La membrana se hibridó como indica la figura 1. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs de CLB.

2.3. DISCUSIÓN

La inoculación de protoplastos con transcritos de RNA sintetizados *in vitro* a partir de clones infecciosos de cDNA ha sido una herramienta muy valiosa para estudiar *in vivo* las secuencias asociadas con la promoción y síntesis de los sgRNAs de muchos virus de plantas (Grzelishvili et al., 2000; Ayllón et al., 2003,2004; Li y Wong, 2006; Lin et al., 2007). Sin embargo, en protoplastos de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog inoculados con transcritos infecciosos de CLB, sólo se detectaron pequeñas cantidades de RNA viral (gRNA y sgRNAs), por lo que fue imposible realizar estos estudios utilizando este sistema genético. En este trabajo se ha caracterizado *in vivo* el promotor del CP-sgRNA de CLB utilizando la agroinoculación como sistema para introducir directamente el cDNA del virus en células de hojas de *N. benthamiana*. Esta metodología tiene ventajas respecto a la transfección de protoplastos con transcritos ya que: i) no es necesario el aislamiento de protoplastos, que es un proceso largo y tedioso, ii) los plásmidos de DNA no tienen que ser manipulados, mientras que para inocular RNA éstos tienen que digerirse y transcribirse, y iii) el DNA es menos sensible a la degradación que los transcritos de RNA del virus. El método puesto a punto en este trabajo permitió introducir el cDNA de los distintos mutantes construidos en células de hojas de *N. benthamiana*, y el RNA transcrito a partir del mismo fue capaz de replicarse y producir una cantidad de RNAs virales (gRNA y sgRNAs) detectable mediante hibridación northern blot. El método desarrollado mostró una buena reproducibilidad entre diferentes ensayos de agroinoculación con una misma construcción.

Para mapear el promotor del CP-sgRNA de CLB se generó una colección de mutantes a partir del clon IC-CLB, utilizando distintas estrategias de supresión y mutagénesis dirigida. Este promotor se pudo analizar en su contexto natural ya que el inicio de transcripción del mismo está localizado dentro del ORF de la proteína de

movimiento, una región del genoma que se puede modificar sin afectar la síntesis del RNA genómico. Así, se detectó una buena acumulación del gRNA y de los dos sgRNAs 3' coterminales en hojas agroinfiltradas con el cDNA del mutante M1, que contiene un codón de parada en la proteína de movimiento. Sin embargo, la acumulación del virus disminuyó drásticamente en plantas agroinoculadas con el mutante M8, que contiene un codón de parada en el 2º aminoácido de la proteína de cápsida, y con los mutantes que tienen afectada la síntesis del CP-sgRNA. Esta disminución en la acumulación del virus posiblemente se deba a que el RNA viral no se pudo encapsidar, quedando desprotegido frente a la degradación por las nucleasas de la planta. Idénticos resultados se obtuvieron al inocular protoplastos con un clon defectivo en la proteína de cápsida de virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV), donde se observó una disminución drástica en la acumulación del gRNA y de los sgRNAs respecto a protoplastos transfectados con el virus completo (Wang and Simon, 1997).

El hexanucleótido GAAAAG, detectado en el extremo 5' del genoma de CLB (Vives et al., 2001), también está presente en el extremo 5' de los MP- y CP-sgRNAs (Vives et al., 2002). La mutación del nucleótido G (+1), identificado previamente como el inicio de transcripción del CP-sgRNA (Vives et al., 2002), por A, C o T disminuyó notablemente la síntesis de este sgRNA, sugiriendo que esta G juega un papel importante en el reconocimiento del inicio de transcripción del CP-sgRNA por la polimerasa viral. Estos resultados avalan trabajos anteriores, en los que se sugería que la mutación del primer nucleótido de los sgRNAs podría ser una herramienta útil para confirmar el inicio de transcripción de los mismos detectado por otros métodos (Grzelishvili et al., 2000; Koev y Miller, 2000). La presencia de una G en el inicio de transcripción de los sgRNAs también se ha observado en otros virus como AMV (van der Kuyl et al., 1990), el virus de la quemadura negra de la remolacha azucarera (*Beet black scorch virus*, BBSV) (Yuan et al., 2006), BMV (French y

Ahlquist, 1998), HCRSV (Li y Wong, 2006), TMV (Grdzlishvili et al., 2000) y TCV (Wang y Simon, 1997; Wang et al., 1999).

La mutación de la A (+2) de la cadena positiva por G, C o U disminuyó significativamente la acumulación del CP-sgRNA. Este resultado sugiere que CLBV no sigue estrictamente las reglas de otros miembros de la familia *Alfavirusidae*, cuyo inicio de transcripción en la cadena negativa del sgRNA suele ser una pirimidina seguida de una adenina. Así, en un estudio *in vitro* mediante mutagénesis dirigida del inicio de transcripción del sgRNA de BMV, reveló que el cambio de la adenina +2 (en la cadena de polaridad negativa) por guanina suprimió la síntesis del sgRNA, mientras que un cambio a citosina o uracilo redujo su acumulación un 37% y 66%, respectivamente (Adkins et al., 1997). Análisis filogenéticos de las secuencias de la cadena negativa adyacentes a los sitios de iniciación de la síntesis de la cadena positiva del gRNA y de los sgRNAs de varios virus pertenecientes a la superfamilia de los alfavirus, mostraron que las posiciones +1 y +2 están altamente conservadas como pirimidina-adenina en la mayoría de los miembros de esta superfamilia (Adkins et al., 1997). Por otra parte, la supresión de una A del hexanucleótido GAAAAG o la mutación de la G (+6) por A, C o T no alteró la acumulación del CP-sgRNA, lo que sugiere que dichos nucleótidos no son esenciales para el reconocimiento del inicio de transcripción por la polimerasa viral.

La mutagénesis del primer nucleótido del inicio de transcripción también es una herramienta valiosa para determinar el mecanismo de síntesis de los sgRNAs. En los virus que producen sus sgRNAs mediante promoción interna, la mutagénesis del nucleótido +1 impide o disminuye notablemente la síntesis *in vivo* e *in vitro* del sgRNA de cadena positiva (Adkins et al., 1997; Koev y Miller, 2000; Grdzlishvili et al., 2000). En estos virus sólo se detectan cantidades mínimas de sgRNA de polaridad negativa (Miller y Koev, 2000). A diferencia de estos virus, en los que producen sus sgRNAs por el

mecanismo de terminación prematura (Tavazza et al., 1994; Ray y White, 1999), la modificación del nucleótido +1 del sgRNA puede reducir la acumulación de la cadena de polaridad positiva del sgRNA aunque no afecta a la síntesis de la cadena de polaridad negativa (Price et al., 2000). En extractos de RNA total de plantas infectadas con CLBV no se detectó la cadena de polaridad negativa del gRNA ni de ambos sgRNAs. Además, las mutaciones del primer nucleótido del CP-sgRNA indujeron una drástica disminución en la acumulación de la cadena positiva de este sgRNA. Todo ello sugiere que la transcripción de los sgRNAs de CLBV sigue el mecanismo de los alfavirus, en los que la cadena de polaridad negativa del gRNA sirve de molde para el inicio de la síntesis de la cadena positiva de los sgRNAs mediante promoción interna, produciendo RNAs mensajeros que son colineales con la correspondiente secuencia del gRNA (Koev y Miller, 2000).

El extremo 5' del promotor mínimo funcional del CP-sgRNA se localizó entre los nucleótidos -67 y -22 y el extremo 3' entre las posiciones +50 y +8, respecto al inicio de transcripción. En este fragmento de 117 nucleótidos no se encontró una estructura secundaria obvia, lo que sugiere que debe ser una secuencia primaria en *cis* la que es reconocida por la polimerasa del virus. En un estudio previo (Vives et al., 2002) se localizó una secuencia de 30 nucleótidos situada antes del inicio de transcripción de ambos sgRNAs que presentaba una alta identidad nucleotídica con la secuencia consenso $AGA(N)_2C(N)_{0-2}G(N)_5(N)_{3-6}$, presente en promotores de sgRNAs de numerosos miembros de la superfamilia *Alfavirusidae* (Siegel et al., 1997; Vives et al., 2002). Estudios *in vitro* realizados con BMV revelaron que era una secuencia primaria específica de 33 nucleótidos y no una estructura secundaria la que interaccionaba con la polimerasa del virus para sintetizar el sgRNA (Siegel et al., 1997). El reconocimiento de secuencias primarias por la polimerasa viral para la promoción y síntesis de sus sgRNAs se ha sugerido también

para otros virus de plantas (Siegel et al., 1997; Wang et al., 1999; Gowda et al., 2001; Jonhson et al., 2003).

El CP-sgRNA de CLBV tiene una secuencia no codificante (UTR) en su extremo 5' de 284 nt, tamaño que es muy superior a las UTRs de sgRNAs descritas para otros virus de plantas (Miller y Koev, 2000). Sorprendentemente, los mutantes que obtuvimos a partir del clon IC-CLBV mediante supresiones entre el nucleótido +284 (inicio del ORF de la cápsida) y las posiciones +113 y +50 desde el inicio de transcripción inducían mayor acumulación del CP-sgRNA que el clon IC-CLBV, que además crecía con el tamaño de la supresión. Estos resultados sugieren que la secuencia comprendida entre los nucleótidos +50 y +284 inhibe la síntesis del CP-sgRNA. Es posible que esta secuencia inhibidora se haya desarrollado evolutivamente para modular la síntesis del CP-sgRNA. Se sabe que la competencia por la unión de la polimerasa a los promotores de los sgRNAs de un virus juega un papel importante en la expresión diferencial de los distintos sgRNAs. Así, se ha observado que el aumento en la expresión de uno de los sgRNAs de un virus disminuye la expresión de los otros sgRNAs (Wang y Simon, 1997; Grdzlishvili et al., 2000; Jonhson et al., 2003). En este caso, es posible que la abundancia relativa de las proteínas codificadas por los sgRNAs de CLBV sea importante para que virus complete su ciclo vital con éxito. La sobre-expresión del CP-sgRNA en ausencia de esta secuencia inhibidora en el genoma de CLBV podría comprometer la síntesis del MP-sgRNA y la producción de la proteína de movimiento, lo que sin duda dificultaría el movimiento célula a célula y a larga distancia del virus. Por otra parte, la proteína de movimiento de CLBV se ha identificado como proteína supresora del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) (véase capítulo siguiente). Por lo tanto, una disminución de la expresión de esta proteína de defensa del virus frente al PTGS podría limitar la acumulación y la invasión sistémica de CLBV dentro de la planta.

CAPÍTULO 3:

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA
SUPRESORA DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO
POSTRANSCRIPCIONAL DE CLB**

CAPÍTULO 3

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Los virus son parásitos celulares obligados y dependen de la maquinaria celular del huésped al que infectan para completar su ciclo biológico (Hull et al., 2002). Uno de los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas frente a las infecciones por virus consiste en el silenciamiento génico mediado por RNA. Por su parte, para contrarrestar dicho mecanismo, muchos virus de plantas expresan proteínas que inhiben este silenciamiento a distintos niveles, permitiendo el establecimiento del virus en el huésped. En la mayoría de los casos, dichas proteínas supresoras coinciden con los determinantes de patogenicidad del virus y están relacionadas con la replicación y movimiento del mismo dentro de la planta (Moissiard y Voinnet, 2004; MacDiarmid et al., 2005).

Se han descrito diferentes métodos para identificar proteínas de virus que actúan como supresoras del silenciamiento génico postranscripcional del huésped (Roth et al., 2004; Valli et al., 2009). El método más utilizado es el ensayo de expresión transitoria mediante infiltración con *Agrobacterium* (Voinnet et al., 2000; Johansen y Carrington, 2001). En este bioensayo se utilizan plantas transgénicas de *N. benthamiana* línea 16c, que expresan constitutivamente el gen de la proteína verde fluorescente, GFP (*green fluorescent protein*) (Brigneti et al., 1998). Al iluminar estas plantas con luz ultravioleta (UV) se puede observar cierta fluorescencia verde en todos los tejidos de la planta. Cuando se inoculan hojas de estas plantas con un cultivo de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con un plásmido que expresa GFP, la sobre-expresión de este gen desencadena el silenciamiento mediante degradación de su mRNA y por tanto, en las hojas iluminadas con luz UV se observa la fluorescencia roja de la clorofila. Sin embargo, si la agroinfiltración se efectúa con dos construcciones, una que expresa GFP y otra que expresa una proteína

supresora del silenciamiento, esta última impide la degradación del mRNA de la GFP y se puede observar un aumento de la fluorescencia verde en la zona agroinfiltrada al iluminarla con luz UV.

Con el objetivo de desarrollar un vector viral eficiente y seguro basado en el genoma de CLBV, sería interesante determinar si alguna de las proteínas codificadas por el virus actúa como supresora del silenciamiento génico postranscripcional y ensayar su eficiencia en comparación con la de otros supresores conocidos. Para poder identificar la posible proteína supresora de un virus es necesario ensayar cada uno de sus genes de manera independiente.

Por todo ello, los objetivos concretos planteados en este capítulo fueron:

- Clonar los distintos genes de CLBV en un vector binario.
- Identificar la proteína supresora del silenciamiento a nivel intracelular de CLBV.
- Estudiar la interferencia de la señal de silenciamiento célula-célula por la proteína supresora de CLBV.
- Estudiar la interferencia de la señal de silenciamiento a larga distancia por la proteína supresora de CLBV.
- Ensayar la supresión de silenciamiento por las proteínas de CLBV expresadas directamente desde su genoma.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Clonación de los distintos genes de CLBV en un vector binario.

Como hemos indicado anteriormente, el genoma del CLBV contiene 8.747 nt y está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs). El ORF 1 codifica una poliproteína de 227 kD que contiene los dominios metil-transferasa, proteasa, helicasa y RNA polimerasa; el ORF 2 codifica una proteína de 40 kD que presenta similitud con las proteínas de movimiento célula-célula de la familia 30 K y el ORF 3 codifica la proteína de la cápsida (Vives et al., 2001).

Para identificar las posibles proteínas supresoras del silenciamiento codificadas por CLBV, se clonaron los distintos ORFs del virus en el vector binario pBIN 121. Debido al gran tamaño del ORF 1, este gen se clonó en dos fragmentos, uno que contenía el dominio metil-transferasa y otro que contenía los dominios helicasa, proteasa y polimerasa. Los dos fragmentos del ORF 1 y los ORFs 2 y 3 se amplificaron mediante PCR a partir del clon de cDNA del genoma viral completo IC-CLBV (Vives et al., 2008) utilizando iniciadores específicos (Vives et al., 2001) y se clonaron en el plásmido pMOG 180 (Mogen Internacional), entre el promotor 35S de CaMV y el terminador NOS de la nopalina sintetasa (tNOS). A continuación, se liberó este *cassette* de expresión del plásmido pMOG mediante digestión con las enzimas apropiadas y se subclonó en el vector de transformación pBIN 121, obteniéndose los plásmidos binarios: pBI-MET (metil-transferasa), pBI-REP (helicasa, proteasa y RNA polimerasa), pBI-MP (proteína de movimiento) y pBI-CP (proteína de cápsida) (Fig. 1). Con estos plásmidos se transformaron células de *A. tumefaciens* que se emplearon para los ensayos de agroinfiltración que se describen más adelante.

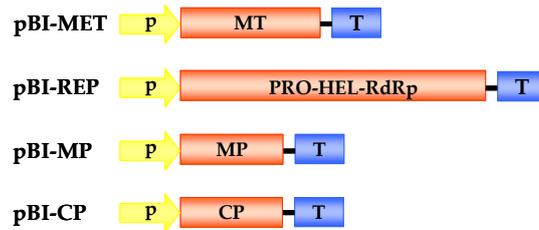


Figura 1. Representación esquemática de los *cassettes* de expresión de los diferentes genes de CLBV clonados en el vector binario pBIN 121. Los rectángulos naranja representan ORFs de CLBV. La flecha amarilla representa el promotor 35S de CaMV y el rectángulo azul el terminador tNOS.

Para realizar los ensayos de expresión transitoria, además de las construcciones de CLBV se agroinocularon los plásmidos binarios pBI-GFP o pBI-dsGFP (amablemente proporcionados por el Dr. D.C. Baulcombe), empleados para inducir el silenciamiento del gen GFP en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. Como controles positivos se emplearon tres construcciones que expresaban proteínas de otros virus con actividad supresora conocida como p19 de TBSV (pBI-19) (Voinnet et al., 2003) (amablemente proporcionado por el Dr. J.A. García), HcPro de TEV (pBI-HcPro) (Brigneti et al., 1998) (amablemente proporcionado por el Dr. F. Tellado) y p25 de CTV (pBI-25) (Ding et al., 2004) (amablemente cedido por el Dr. L. Peña). Por último, como control negativo se empleó el mismo plásmido binario sin inserto (pBI-Ø) (Fig. 2).

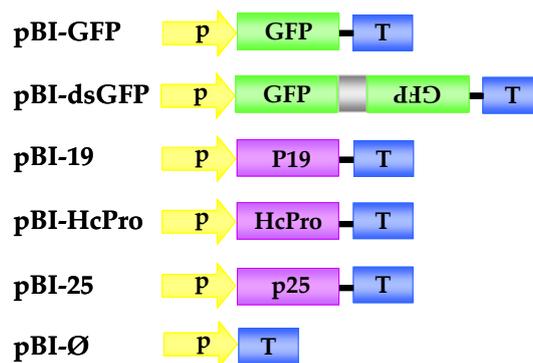


Figura 2. Representación esquemática de las construcciones de los vectores binarios utilizados. El rectángulo verde representa la proteína GFP y el gris un intrón. Los rectángulos morados representan proteínas de actividad supresora conocida: p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV), HcPro del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) y p25 del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), utilizadas como controles positivos. La flecha amarilla representa el promotor 35S de CaMV y el rectángulo azul el terminador tNOS.

3.2.2. Identificación de la proteína supresora del silenciamiento a nivel intracelular de CLBV.

Para este ensayo se utilizaron 4 lotes de 5 plantas de *N. benthamiana* línea 16c. En cada una de ellas se agroinocularon las tres primeras hojas verdaderas con bacterias de *A. tumefaciens* transformadas con los plásmidos: a) pBI-GFP, para inducir el mecanismo de silenciamiento de la planta, b) pBI-GFP y pBI-19 o pBI-HcPro, como controles positivos de supresión de silenciamiento a nivel local, c) pBI-GFP y pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP, para localizar posibles proteínas de CLBV supresoras del silenciamiento y d) pBI-GFP y pBI-Ø, como control negativo. Para confirmar los resultados obtenidos, este ensayo se repitió en 5 experimentos independientes (Fig. 3).

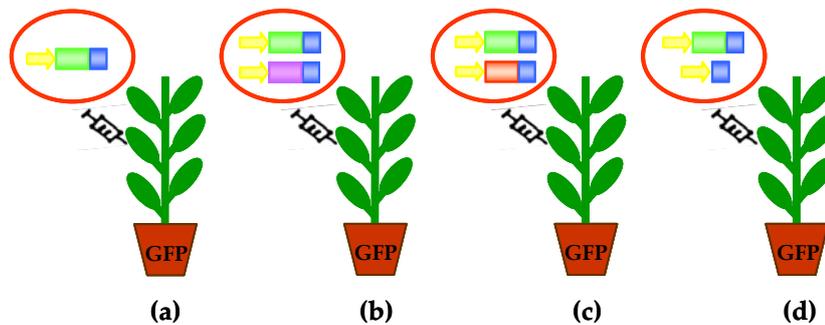


Figura 3. Representación esquemática del ensayo de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. (a) Lote de plantas agroinfiltradas con pBI-GFP, (b) lote de plantas agroinfiltradas con la combinación pBI-GFP y pBI-19 o pBI-HcPro, que expresan proteínas de actividad supresora conocida (controles positivos), (c) lote de plantas agroinfiltradas con pBI-GFP y pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP, que expresan las proteínas de CLBV, (d) lote de plantas agroinfiltradas con pBI-GFP y pBI-Ø, plásmido vacío (control negativo).

La progresión del silenciamiento se observó a lo largo del tiempo mediante la visualización de las hojas agroinfiltradas iluminadas con luz ultravioleta de longitud de onda larga. A los 2 dpi no se observaron diferencias entre los diferentes lotes de plantas agroinfiltradas. Sin embargo a partir de 5 dpi, en las hojas agroinfiltradas sólo con pBI-GFP se observó una disminución de la fluorescencia verde en la zona agroinfiltrada con respecto a las hojas sin agroinfiltrar, debido a la degradación del mRNA de GFP por activación del mecanismo de silenciamiento de la planta. Por el contrario, en las zonas coinoculadas con pBI-GFP y pBI-19 o pBI-HcPro (controles positivos) se observó un aumento de la fluorescencia verde a los 4-5 dpi, que se mantuvo aproximadamente hasta los 20 dpi. Cuando se agroinocularon simultáneamente pBI-GFP con las construcciones que llevaban los distintos genes de CLBV, sólo se observó un aumento de la fluorescencia verde a los 5 dpi en las hojas coinfiltradas con pBI-GFP y con la construcción que expresaba la proteína de movimiento del virus (pBI-MP), pero este aumento fue menor al observado con los controles positivos y sólo se

mantuvo hasta los 9 dpi. Las hojas infiltradas con el resto de los genes de CLBV o con el vector vacío mostraron una disminución de la fluorescencia verde similar a la observada al agroinocular solamente GFP (Fig. 4).

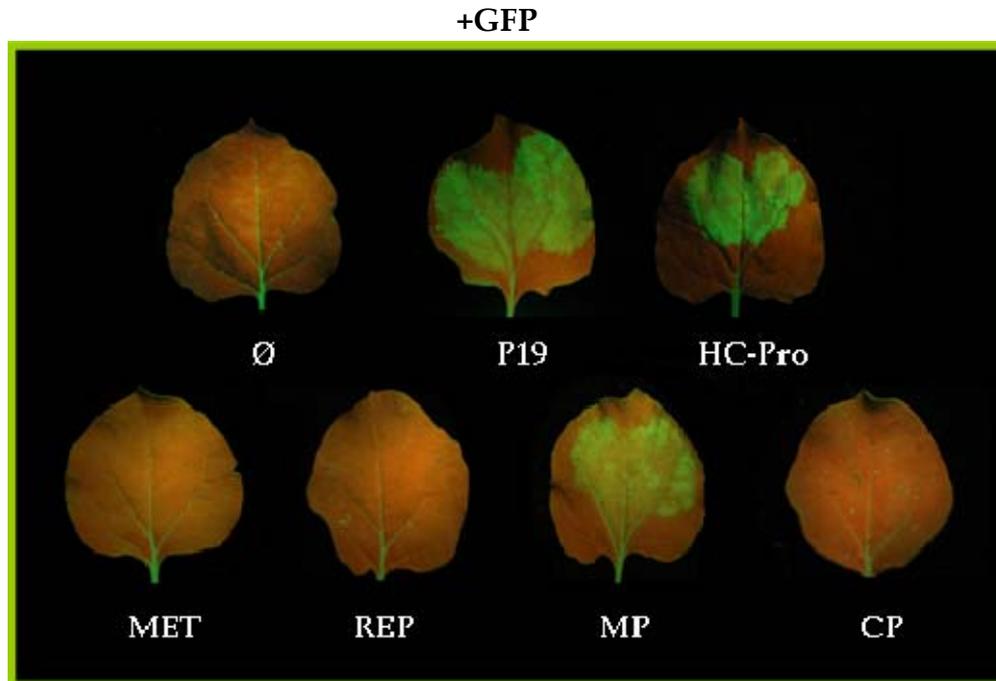


Figura 4. Identificación de la proteína de movimiento de CLBV como supresora del silenciamiento intracelular mediado por RNA. Hojas de *N. benthamiana* línea 16c infiltradas con plásmidos que expresan las proteínas GFP y p19 o HcPro, como controles positivos, o las proteínas MET, REP, MP y CP de CLBV a los 5 dpi. Como control negativo se coinoculó GFP y el vector vacío (Ø). Fotografías realizadas con un filtro amarillo iluminando las plantas con luz ultravioleta de longitud de onda larga.

Para determinar si existe una correlación entre la cantidad de fluorescencia y los niveles de expresión del mRNA de GFP, el RNA total del área agroinfiltrada de las hojas se analizó a los 5 dpi mediante hibridación tipo northern blot utilizando una ribosonda de

secuencia complementaria a dicho RNA. En las hojas agroinfiltradas con pBI-GFP o con pBI-GFP y pBI-Ø la acumulación del mRNA de GFP fue menor que en las hojas sin agroinfiltrar debido a la degradación del mismo por la activación del mecanismo de silenciamiento. Por otro lado, en las plantas coinoculadas con pBI-GFP y con los controles positivos pBI-19 o pBI-HcPro, de acuerdo con trabajos previos (Lakatos et al 2006; Csorba et al, 2007), se observó un aumento en la acumulación del mRNA de GFP debido al bloqueo del mecanismo de silenciamiento por los supresores. El análisis de la inoculación simultánea de pBI-GFP y las proteínas de CLBV mostró que sólo en las hojas agroinfiltradas con la proteína de movimiento del virus se observó una acumulación del mRNA de GFP similar a la obtenida con los controles positivos, mientras que la acumulación del mRNA de GFP con el resto de las construcciones fue similar a la obtenida con el control negativo (Fig. 5).

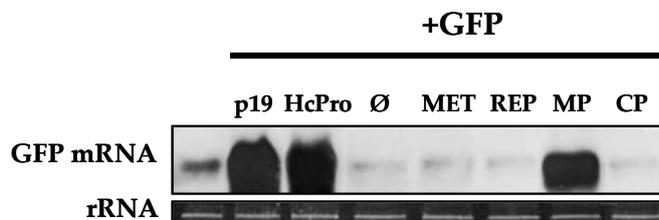


Figura 5. Hibridación northern blot del RNA total de hojas sin agroinocular (primer carril) y agroinfiltradas con pBI-GFP y pBI-19, pBI-HcPro, pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP a los 5 dpi. La hibridación se realizó empleando una ribosonda de polaridad negativa de GFP marcada con digoxigenina. La tinción con bromuro de etidio del RNA ribosómico 5s (rRNA) muestra la carga equivalente de las muestras.

Con el objetivo de estudiar si la disminución en la cantidad de mRNA de GFP, observada al sobreexpresar esta proteína en plantas de *N. benthamiana* línea 16c, es debida al desencadenamiento del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional mediado por RNA, se analizó la acumulación de los siRNAs derivados del mRNA

de GFP (Hamilton y Baulcombe, 1999) en el área agroinfiltrada de las plantas utilizadas anteriormente. El análisis mediante hibridación northern blot utilizando una ribosonda específica de GFP mostró que la acumulación de los siRNAs en hojas coinoculadas con pBI-GFP y pBI-Ø (control negativo) fue significativamente superior a la observada en hojas coinfiltradas con pBI-GFP y pBI-19 o pBI-HcPro (controles positivos), resultado que coincide con el obtenido previamente por otros grupos (Voinnet et al., 2003; Dunoyer et al., 2004). La acumulación de siRNAs en las hojas coinoculadas con pBI-GFP y pBI-MP fue similar a la obtenida con los controles positivos, mientras que las hojas coinoculadas con pBI-GFP y pBI-MET, pBI-REP o pBI-CP acumularon niveles de siRNAs similares al control negativo (Fig. 6). La disminución de mRNA y la presencia de siRNAs en las plantas en las que se sobreexpresa GFP indican que en estas plantas está activado el mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA. La presencia de supresores de este mecanismo impide la acumulación de siRNAs y permite una mayor acumulación del correspondiente mRNA.



Figura 6. Hibridación northern blot de extractos de RNAs de bajo peso molecular (siRNAs) obtenido a partir de hojas sin agroinocular (primer carril) o agroinfiltradas simultáneamente con pBI-GFP y pBI-19, pBI-HcPro, pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP a los 5 dpi. La hibridación se realizó empleando una ribosonda de GFP marcada con digoxigenina. La tinción con bromuro de etidio del RNA de transferencia (tRNA) muestra la equivalencia de carga de RNA entre las distintas muestras.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción de la MP en la ruta del silenciamiento, se ensayó si la MP es capaz de bloquear la conversión del RNA monocatenario de la GFP a dsRNA o inhibe el silenciamiento después de la formación del dsRNA. Para ello, la construcción pBI-MP se expresó simultáneamente en hojas de *N. benthamiana* línea 16c con construcciones que transcribían el mRNA de GFP en simple o en doble cadena (dsGFP). Para obtener dsGFP se utilizó un plásmido binario que contenía la secuencia de GFP duplicada en tandem invertido con un intrón intermedio (pBI-dsGFP). Como control negativo se coinoculó pBI-GFP o pBI-dsGFP con pBI-Ø y como control positivo se coinoculó pBI-GFP o pBI-dsGFP con pBI-19. En las hojas agroinfiltradas simultáneamente con plásmidos que expresan GFP o dsGFP y el control negativo se observó una disminución de la fluorescencia verde a partir de 5 dpi, mientras que en la zona de las hojas co-infiltradas con el control positivo o con la MP de CLBV se observó un aumento de la fluorescencia verde (Fig 7A). Para confirmar estas observaciones se analizó la acumulación del mRNA y siRNAs de GFP en la zona agroinfiltrada, detectándose en las plantas inoculadas con el control negativo una disminución del mRNA y un aumento de los siRNAs de GFP respecto a las hojas sin agroinocular, mientras que en las hojas inoculadas con el control positivo o con la MP de CLBV se produjo el efecto contrario (Fig. 7B). Estos resultados sugieren que la MP de CLBV interfiere en la ruta del silenciamiento después de la producción del dsRNA.

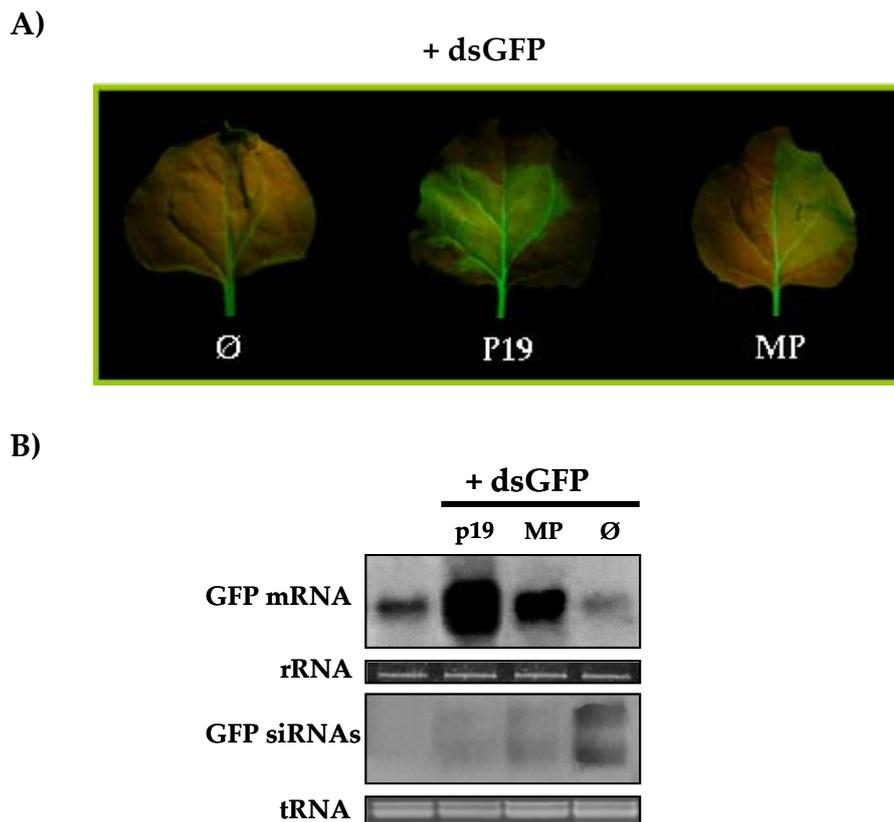


Figura 7. Ensayo de la supresión del silenciamiento activado por dsRNA de GFP. A) Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas simultáneamente con pBI-GFP o pBI-dsGFP junto pBI-(Ø), o junto a pBI-MP o pBI-P19 a 5 dpi. B) Análisis northern blot del mRNA y siRNAs de GFP de las zonas infiltradas. La hibridación se realizó empleando una ribosonda de GFP marcada con digoxigenina La tinción con bromuro de etidio del rRNA 5s o tRNA muestra la carga equivalente de las muestras.

3.2.3. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento célula-célula por la proteína supresora de CLBV.

El movimiento célula-célula de la señal de silenciamiento ocurre por vía simplástica a través de los plasmodesmos (Himber et al., 2003; Kalantidis et al., 2006, 2008). En estudios previos se ha propuesto que

la difusión de la señal de silenciamiento está asociada al movimiento de los siRNAs de 21 nt (Parrish y Fire, 2001; Himber et al., 2003; Dunoyer et al., 2005). En el movimiento célula-célula, cuando la señal de silenciamiento móvil penetra en las células donde el silenciamiento no está activado, ésta puede incorporarse a RISC y dirigir el corte específico de los mRNAs complementarios produciendo su degradación o puede servir de cebador para la síntesis de nuevos siRNAs (Ahlquist, 2002). Por otro lado, se han descrito numerosas proteínas de virus que son capaces de bloquear la señal que se mueve célula a célula o a larga distancia por el floema suprimiendo su acción (Palauqui et al., 1998; Voinet y Baulcombe, 1997; Voinnet, 2005; Kalantidis et al., 2008).

Cuando una planta de *N. benthamiana* línea 16c se agroinfiltra con una construcción que expresa GFP, a partir de 4-5 dpi se detecta una disminución de la fluorescencia verde en la zona agroinfiltrada, y a partir de 7-8 dpi aparece un halo rojo bordeando dicha zona agroinfiltrada. Este halo se produce como resultado del movimiento célula a célula de la señal de silenciamiento, que provoca la activación de la degradación de mRNA de GFP en un número pequeño de células adyacentes a la zona agroinfiltrada. El tamaño del borde rojo está compuesto por una media de 13 células y no se expande a lo largo del tiempo (Kalantidis et al., 2008). Cuando se coinocula GFP con un supresor de silenciamiento intracelular que no bloquea la señal de silenciamiento célula a célula, en la zona agroinfiltrada aumenta la fluorescencia verde pero también se observa la aparición de un halo rojo alrededor de ella. Sin embargo, los supresores que son capaces de interferir con la señal de silenciamiento a corta distancia, como la proteína AC2 del virus del mosaico africano de la yuca (*African cassava mosaic virus*, ACMV), cuando se coexpresan con GFP no permiten la formación de este borde rojo alrededor de las zonas agroinfiltradas (Voinnet et al., 1999; Hamilton et al., 2002) (Fig. 8).

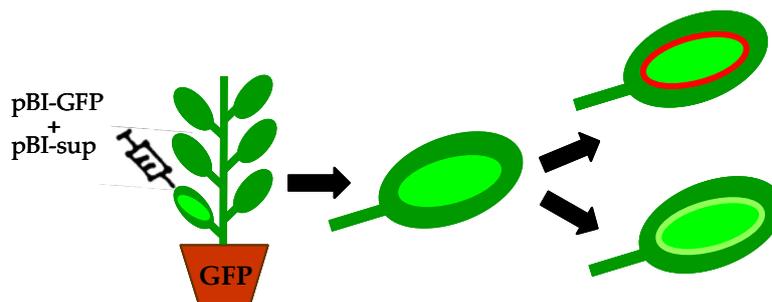


Figura 8. Representación esquemática del ensayo realizado para identificar si una proteína supresora es capaz de bloquear el movimiento célula a célula de la señal de silenciamiento. La aparición de un borde rojo alrededor de la zona agroinfiltrada indica que la proteína supresora no es capaz de bloquear la señal de silenciamiento a corta distancia.

Para determinar si la proteína de movimiento de CLBV puede interferir con el movimiento de la señal silenciamiento a corta distancia, se realizó el ensayo de expresión transitoria descrito. Para ello, se emplearon tres lotes de 5 plantas de *N. benthamiana* línea 16c en las que se agroinfiltraron tres hojas de cada una de ellas. En el primer lote de plantas se coinocularon las construcciones pBI-GFP y pBI-MP, en el segundo pBI-GFP y pBI-19, control negativo de supresión a corta distancia, y en el tercero pBI-GFP y pBI-Ø, control negativo del bioensayo. Para confirmar los resultados obtenidos, este ensayo se repitió en tres experimentos independientes.

En las hojas agroinfiltradas con pBI-MP o pBI-19, se observó un aumento de la fluorescencia verde a partir de 5 dpi y la aparición del borde rojo alrededor de la zona agroinfiltrada a partir de 11 dpi. En las hojas agroinfiltradas con pBI-Ø se observó la pérdida de fluorescencia verde en la zona agroinfiltrada y la aparición de un borde rojo alrededor de ella a los 7 dpi (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la proteína de movimiento de CLBV no es capaz de bloquear la propagación de la señal del silenciamiento a corta distancia.

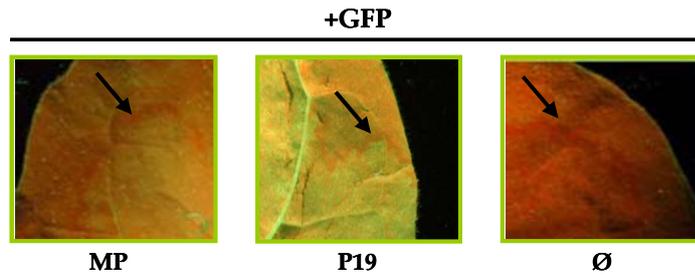


Figura 9. Análisis de la capacidad de la MP de CLBV para bloquear el movimiento de la señal de silenciamiento célula a célula. Hojas coinoculadas con las construcciones pBI-GFP y pBI-MP, pBI-19 o pBI-Ø a los 11 dpi. La flecha señala el borde rojo que aparece alrededor de la zona agroinfiltrada de las hojas.

3.2.4. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento a larga distancia por la proteína supresora de CLBV.

En algunos casos, el silenciamiento del RNA a nivel intracelular induce la formación de siRNAs que se mueven a través de floema induciendo el silenciamiento en otras zonas distantes de la planta (Yoo et al., 2004; Xoconostle et al., 2005; Kalantidis et al., 2008). Este movimiento de la señal de silenciamiento puede ser de gran importancia en la defensa de la planta frente al virus, ya que la activación del silenciamiento en partes dístales de la planta impone una barrera al movimiento sistémico del virus en la planta o a nuevas inoculaciones.

Para determinar si las proteínas de CLBV pueden interferir en el movimiento de la señal de silenciamiento a larga distancia se realizaron dos tipos de experimentos de expresión transitoria mediante agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* línea 16c.

El primer experimento se basa en la agroinfiltración de las plantas con un plásmido que expresa GFP para inducir el silenciamiento en las hojas agroinfiltradas (pérdida de fluorescencia verde). En las zonas agroinfiltradas se forma la señal de silenciamiento a larga distancia que se desplaza a otras zonas provocando la pérdida de fluorescencia verde en toda la planta. Sin

embargo, cuando se coinocula el gen de la GFP con un supresor de silenciamiento a larga distancia, se produce un retardo y/o inhibición del silenciamiento en las hojas superiores. Para realizar este experimento se coinocularon las construcciones pBI-GFP y pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP. Como control positivo se coinoculó pBI-GFP y pBI-25 de CTV, que inhibe el silenciamiento a larga distancia (Lu et al., 2004). Como control negativo se coinfiltró pBI-GFP y pBI-Ø. Para cada combinación de construcciones se agroinocularon 3 hojas de 10 plantas de *N. benthamiana* línea 16c y el experimento se repitió en dos ensayos independientes. El progreso del silenciamiento en las hojas superiores de las plantas agroinfiltradas se observó a lo largo del tiempo mediante iluminación de las mismas con una lámpara de luz ultravioleta.

En 6-7 plantas de las 10 coinoculadas con pBI-GFP y pBI-25 (control positivo) se detectó un retraso en la pérdida de la fluorescencia verde en las venas de las hojas superiores respecto al control negativo, observándose a partir de 18 dpi. Por el contrario, en las plantas coinoculadas con pBI-GFP y pBI-Ø (control negativo) o con las construcciones que contenían los genes de CLB V pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP, el silenciamiento en las hojas superiores se observó antes (14 dpi) y en un mayor número de plantas (9-10/10). (Fig. 10A). El análisis mediante hibridación northern blot del RNA total de hojas superiores no agroinfiltradas confirmó los resultados obtenidos mediante observación visual, detectándose una mayor concentración de mRNA de GFP en las plantas inoculadas con p25 que en las inoculadas con el control negativo o con las proteínas de CLB V (Fig. 10B).

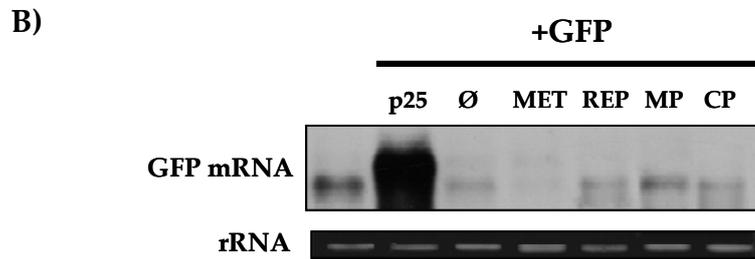
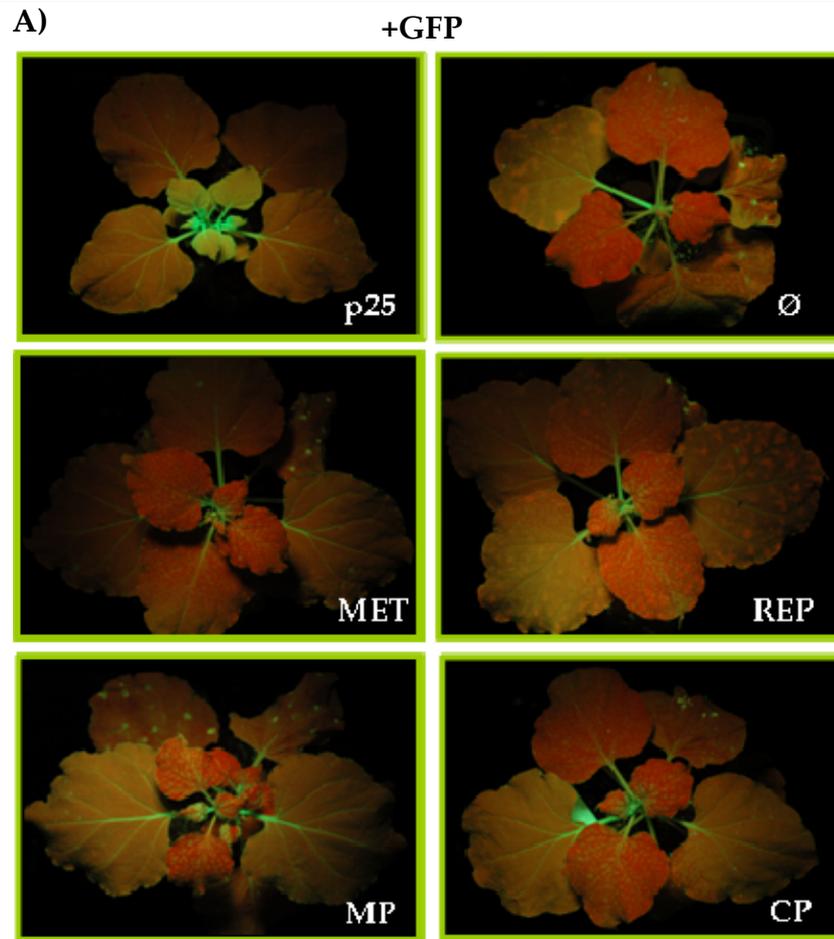


Figura 10. Análisis de la capacidad las proteínas de CLBV para bloquear la señal de silenciamiento a larga distancia. A) Hojas superiores de plantas de *N. benthamiana* línea 16c coinoculadas con pBI-GFP y pBI-25, pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP. B) Análisis northern blot del RNA total extraído de las hojas superiores de plantas sin inocular (primer carril) o inoculadas con las distintas combinaciones de

plásmidos a los 14 dpi. La hibridación se realizó empleando una ribosonda de polaridad negativa de GFP marcada con digoxigenina. La tinción con bromuro de etidio del RNA ribosómico 5s (rRNA) muestra la equivalencia de carga de RNA entre las distintas muestras.

El segundo experimento se basa en el ensayo descrito por Guo y Ding (2002), que consiste en agroinfiltrar GFP y la proteína candidata en dos puntos separados de la misma hoja de *N. benthamiana* línea 16c. Si se infiltra GFP en el ápice de la hoja y la proteína supresora de silenciamiento a larga distancia en la base de la hoja, en las hojas superiores no agroinfiltradas no desaparece la fluorescencia verde. Si la proteína a ensayar no tiene capacidad supresora del silenciamiento a larga distancia, en las nuevas hojas se silencia GFP y se pierde la fluorescencia verde. Como control del ensayo se realiza la inoculación inversa, GFP en la base y la proteína a ensayar en el ápice. Para realizar este ensayo se emplearon 6 lotes de 10 plantas de *N. benthamiana* línea 16c de cuatro semanas desde su transplante a maceta, en las que se agroinfiltraron tres hojas de la parte inferior de cada planta con pBI-GFP en el ápice y pBI-25, pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP en la base. Para el ensayo inverso se inoculó el mismo número de plantas con pBI-GFP en la base de las hojas y el resto de las construcciones en el ápice. La progresión del silenciamiento se observó en las hojas superiores no agroinfiltradas en dos ensayos independientes para cada construcción (Fig. 11).

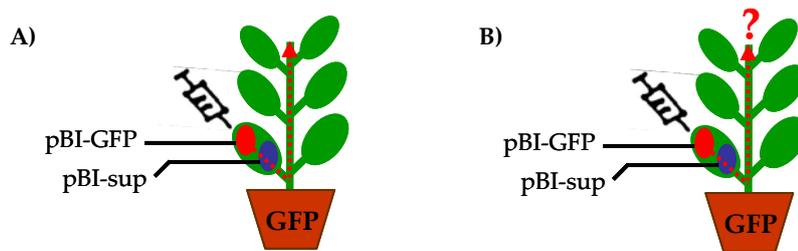


Figura 11. Representación esquemática del ensayo empleado para identificar proteínas supresoras del silenciamiento de RNA a larga distancia en plantas de *N. benthamiana* línea 16c mediante la observación del retraso del silenciamiento en las hojas superiores. A) Control negativo del ensayo. La proteína de estudio se infiltra en el ápice y la GFP en la base de una misma hoja. B) Se infiltra la GFP en el ápice y la proteína de estudio en la base de una misma hoja.

En los ensayos realizados, 6-7 de las 10 plantas agroinfiltradas con GFP en el ápice de las hojas y p25 (control positivo) en la base mantuvieron la fluorescencia verde de las hojas superiores hasta los 17 dpi. Sin embargo, 8-9 de las 10 plantas inoculadas en la base de las hojas con pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP mostraron pérdida de fluorescencia verde de las hojas superiores a los 14 dpi (Fig. 12). En el ensayo inverso, donde la GFP se inoculó en la base de las hojas y las diferentes construcciones en el ápice, en 3-4 de 10 plantas agroinfiltradas con p25 se mantuvo la fluorescencia verde a los 17 dpi, mientras que en 9-10 de las 10 plantas agroinfiltradas con pBI-Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP se observó el silenciamiento de GFP en las hojas superiores con la consiguiente pérdida de fluorescencia verde a los 14 dpi.

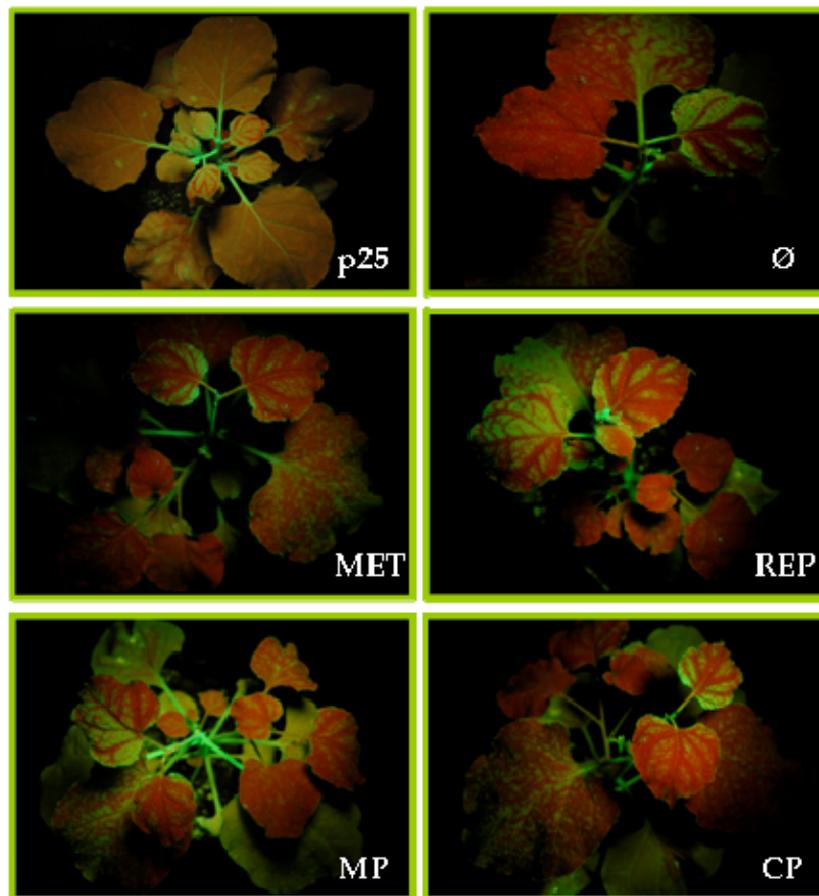


Figura 12. Efecto de las proteínas de CLBV en la interferencia de la señal de silenciamiento a larga distancia. Plantas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con pBI-GFP en el ápice y pBI-25, pBI- Ø, pBI-MET, pBI-REP, pBI-MP o pBI-CP en la base de las hojas basales.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos sugieren que las proteínas de CLBV no son capaces de bloquear la señal de silenciamiento a larga distancia.

3.2.5. Ensayo de la supresión de silenciamiento por las proteínas de CLBV expresadas directamente desde su genoma.

Para determinar si las proteínas del virus expresadas directamente desde su genoma eran capaces de bloquear el silenciamiento intracelular y/o a larga distancia, se realizaron dos experimentos; el primero está basado en la agroinfiltración simultánea en una hoja con el gen de la GFP y el clon infeccioso del genoma completo de CLBV (IC-CLBV) (Vives et al., 2008) y el segundo está basado en la estrategia de la rotura del silenciamiento inverso (Roth et al., 2004, Zhou et al., 2006; Valli et al., 2009).

Para realizar el primer experimento se coinfiltraron 3 hojas de 10 plantas de *N. benthamiana* línea 16c con pBI-GFP e IC-CLBV. Como control positivo se coinfiltró pBI-GFP y pBI-MP y como control negativo pBI-GFP y pBI-Ø. En las hojas agroinfiltradas con el control positivo se observó la aparición de fluorescencia verde a partir de los 5 dpi, mientras que en las hojas agroinfiltradas con el control negativo o con el clon completo del virus se observó una pérdida de fluorescencia verde (Fig. 13).

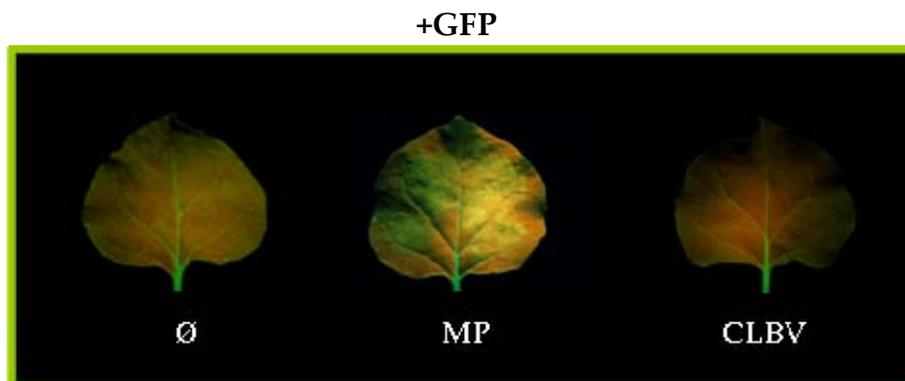


Figura 13. Ensayo de la capacidad supresora del silenciamiento intracelular de las proteínas de CLBV expresadas desde su genoma. Las hojas se agroinfiltraron simultáneamente con pBI-GFP y pBI- Ø, pBI-MP o IC-CLBV.

Para realizar el segundo experimento se emplearon 12 plantas de *N. benthamiana* línea 16c de dos semanas de edad desde su transplante a maceta, de las que se agroinfiltraron las tres primeras hojas verdaderas con la construcción pBI-GFP. Como hemos indicado anteriormente, en los tejidos agroinfiltrados se silencia el mRNA de GFP a partir de 5 dpi y se induce una señal móvil que silencia la GFP de toda la planta, observándose de color rojo al iluminarla con luz UV a partir de 14 dpi. En este momento, las plantas se dividieron en dos lotes de seis plantas cada uno. El primer lote se agroinfiltró con el clon IC-CLBV (Vives et al., 2008), mientras que el segundo se agroinfiltró con pBI-Ø como control negativo del bioensayo. Las hojas superiores de las plantas agroinfiltradas se visualizaron a lo largo del tiempo con una lámpara de luz ultravioleta para detectar la aparición de fluorescencia verde. Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron dos ensayos independientes.

En ninguna de las plantas infiltradas con el clon de CLBV o con el control negativo se observó la aparición de fluorescencia verde, ni en las hojas agroinfiltradas ni en las superiores. (Fig. 14A). La presencia del virus en las plantas agroinfiltradas con IC-CLBV se analizó mediante hibridación northern blot utilizando una ribosonda de la región de la cápsida del virus y el RNA total de hojas agroinfiltradas o de hojas superiores. El virus se detectó en estas hojas a los 5 y 21 dpi, respectivamente (Fig. 14B). Los resultados obtenidos indican que, aunque CLBV se acumula en las plantas inoculadas, las proteínas expresadas desde su genoma no se acumulan en suficiente cantidad para suprimir el silenciamiento.

A)



B)

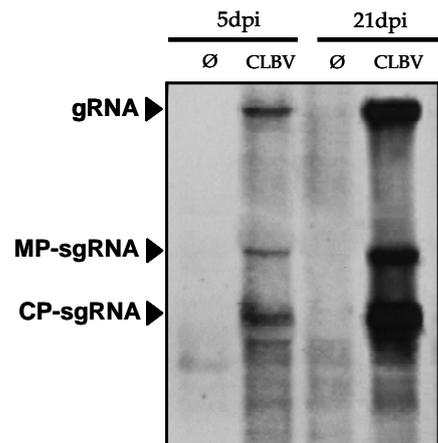


Figura 14. Ensayo de rotura del silenciamiento inverso de GFP en plantas de *N.benthamiana* línea 16c. A) Plantas silenciadas preinfiltradas con pBI-GFP e infiltradas posteriormente con pBI-Ø (izquierda) o IC-CLBV (derecha). B) Hibridación northern blot del RNA total de hojas agroinfiltradas a los 5 dpi y de hojas superiores a los 21 dpi. La membrana se hibridó con una ribosonda marcada con digoxigenina de la región de la cápsida de CLBV. Las flechas indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs del virus.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que las proteínas expresadas desde el genoma del virus no son capaces de suprimir el silenciamiento de la planta a nivel intracelular ni a larga distancia.

3.3. DISCUSIÓN

Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa frente a la infección por virus, basado en el PTGS, que degrada el RNA viral impidiendo o limitando su acumulación o invasión sistémica. Por su parte, como una estrategia de contradefensa, muchos virus de plantas expresan proteínas que inhiben este silenciamiento a distintos niveles. En este trabajo se ha determinado la capacidad supresora del PTGS de las distintas proteínas que codifica CLBV utilizando el ensayo de expresión transitoria mediante agroinfiltración simultánea con dos construcciones: una que llevaba los distintos genes del virus y otra que contenía el gen que codifica la proteína GFP. La observación de la fluorescencia en las zonas agroinfiltradas y la acumulación del mRNA de GFP y de los siRNA procedentes de la degradación de dicho mensajero, mostró que sólo la proteína de movimiento del virus es capaz de suprimir el PTGS a nivel intracelular. La MP de CLBV se comportó como un supresor del silenciamiento débil al compararlo con los supresores de otros virus de actividad conocida. De esta manera, al infiltrar simultáneamente GFP y la MP de CLBV se observó en la zona agroinfiltrada un aumento de la fluorescencia a 5 dpi, que se mantuvo durante 8 días, mientras que al inocular GFP junto con p19 de TBSV o HcPro de TEV, el aumento de la fluorescencia verde se observó a partir 5 dpi pero con mayor intensidad y se mantuvo durante al menos 20 días.

Los supresores del silenciamiento de diferentes virus interfieren con la maquinaria del silenciamiento de la planta a distintos niveles (revisado en Moissiard y Voinnet, 2004; Díaz-Pendón y Ding, 2008; Valli et al., 2009). La habilidad de la MP de CLBV de suprimir el silenciamiento de GFP inducido por RNA de simple y doble cadena en hojas de *N. benthamiana* 16c, indica claramente que ésta proteína interfiere en la ruta del silenciamiento después de la formación de RNA de doble cadena. Por otra parte, los resultados obtenidos

revelan que la presencia de la MP reduce drásticamente la acumulación de siRNAs procedentes de GFP en hojas infiltradas con pBIN-GFP o pBIN-dsGFP, pero éstos no son completamente eliminados. Idénticos resultados se obtuvieron en hojas inoculadas con las proteínas supresoras del silenciamiento de actividad conocida como son p19 o HcPro. Ambas proteínas actúan secuestrando los siRNAs y por tanto, no inhiben la actividad ribonucleasa de DICER, en contraste con otros supresores que se unen a los dsRNAs de cadena larga impidiendo su procesado por dicha ribonucleasa (Chao et al., 2005; Lakatos et al., 2006; Lu et al., 2005; Mérai et al., 2005, 2006). Estos resultados sugieren que la MP de CLBV no bloquea la actividad de DICER y actúa interfiriendo con la maquinaria del silenciamiento después de la generación de los siRNAs, posiblemente secuestrándolos, como lo hacen un gran número de proteínas supresoras del silenciamiento de otros virus (Lakatos et al., 2006; Martínez-Turiño, 2009; Mérai et al., 2006; Hemmes et al., 2009).

La proteína de movimiento de CLBV no impidió el silenciamiento célula a célula ni a larga distancia. La supresión del silenciamiento a larga distancia se ensayó utilizando dos aproximaciones: i) la agroinfiltración conjunta de MP y GFP en una misma hoja de plantas de *N. benthamiana* línea 16c y observación de la supresión de la fluorescencia verde en las nuevas hojas, y ii) infiltración separada de ambas construcciones en el ápice y en la base de una misma hoja de *N. benthamiana* línea 16c y observación de la fluorescencia en las nuevas hojas. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de acción de la MP de CLBV difiere de la proteína ortóloga del genoma del trichovirus de la manchas cloróticas de la hoja del manzano (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), perteneciente a la familia *Flexiviridae* al igual que CLBV (Adams et al., 2005; Martelli et al., 2007) y que filogenéticamente está muy relacionado con el mismo (Vives et al., 2001). La proteína de movimiento de este virus, asignada a la superfamilia "30K" como la de CLBV, no suprime el silenciamiento local pero sí interfiere la señal

de silenciamiento a larga distancia (Yaegashy et al., 2007). Idénticos resultados se observaron al comparar el mecanismo de acción de proteínas ortólogas de dos crinivirus, donde la proteína P22 del virus del amarilleo del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) suprime el silenciamiento a nivel local (Cañizares et al., 2008), mientras que la P22 del virus del enanismo clorótico del boniato (*Sweet potato chlorotic stunt virus*, SPCSV), suprime la señal de silenciamiento célula a célula y a larga distancia (Kreuze et al., 2005).

La agroinfiltración simultánea del clon infeccioso de CLBV (IC-CLBV) y GFP en hojas de *N. benthamiana* línea 16c no indujo un aumento de la fluorescencia verde en la zona agroinfiltrada, al contrario de lo que ocurre cuando se expresa transitoriamente la MP del virus desde un vector binario. Tampoco se observó reversión a fluorescencia verde al inocular con el clon infeccioso plantas de *N. benthamiana* línea 16c, previamente silenciadas mediante agroinfiltración con GFP, ni en la zona agroinfiltrada ni en las hojas superiores. En otros estudios realizados con diferentes virus con genoma de DNA o RNA utilizando este tipo de experimentos se observó una gran variabilidad de resultados. Así, algunos virus suprimían el silenciamiento en todos los tejidos de la planta que infectaban, mientras que otros sólo lo suprimían en las venas, en las nuevas hojas o no se observaba reversión significativa del silenciamiento en ningún tejido (Voinnet et al., 1999). Los resultados mostrados en este trabajo indican que las proteínas expresadas desde el genoma de CLBV no son capaces de suprimir el silenciamiento de la planta a nivel intracelular ni a larga distancia, posiblemente porque se expresan en menor cantidad que cuando se expresan transitoriamente desde un vector binario. Pfeffer et al., (2002) obtuvieron resultados similares al agroinfiltrar la proteína supresora de silenciamiento pO del virus del amarilleamiento occidental de la remolacha (*Beet Western yellow virus*, BWYV) junto con GFP, ya que se observó una fuerte supresión de PTGS en la zona agroinfiltrada. En dicha zona la proteína se detectó fácilmente mediante métodos

serológicos, mientras que en las zonas de la hoja inoculadas con el genoma completo del virus, la proteína pO no se acumuló lo suficiente para ser detectada por métodos serológicos y el aumento de la fluorescencia por supresión del PTGS fue muy débil.

CLBV se transmite por semilla (Guerra et al., 2004) y es muy difícil eliminarlo por microinjerto *in vitro* (Navarro et al., 1993), por lo que debe pasar la barrera de exclusión de las zonas meristemáticas, proceso que está restringido para la mayoría de virus de plantas (Wang et al., 1997). En trabajos previos con PVX y CMV se determinó que la exclusión de los virus en el meristemo estaba asociada al PTGS (Mochizuki y Ohki, 2004; Qu et al., 2005; Schwach et al., 2005). Martín-Hernández y Baulcombe (2008) observaron que la proteína 16K de virus del cascabeleo del tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV), un tobavirus que se transmite por semilla, se comportó como un supresor débil de silenciamiento en experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* línea 16c al compararlo con el supresor p19. Sin embargo, la mutación de este gen para introducir un codón de parada (TRV-stop) impidió que el virus invadiera el meristemo. También observaron que la expresión de esta proteína en *trans* en plantas coinfectadas con TRV y PVX permitía la acumulación de PVX en meristemos, cosa que no se observó en plantas coinoculadas con TRV-stop y PVX. De estos resultados, los autores concluyeron que la proteína 16K era la responsable de que TRV fuera capaz de invadir los meristemos (Martín-Hernández y Baulcombe, 2008). En este trabajo también se especula que para que un virus pueda invadir el meristemo, es necesario que la actividad de la proteína supresora de PTGS que codifique dicho virus sea débil, ya que si dicha actividad fuera demasiado fuerte, el virus se acumularía en altas proporciones en el meristemo causando severos daños en estas zonas e impidiendo que las plantas se desarrollaran correctamente (Martín-Hernández y Baulcombe, 2008). Teniendo en cuenta estos resultados, la proteína de movimiento de CLBV, a pesar de ser un supresor del silenciamiento poco eficiente al compararlo con supresores conocidos

como p19 o HcPro, podría ser la responsable de la invasión del virus en zonas meristemáticas de las plantas infectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.

1.1. Plantas.

En los ensayos realizados para poner a punto el aislamiento de protoplastos se emplearon plantas de *N. occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog. Las plantas de tabaco se cultivaron en una cámara climática a una temperatura de 20-24°C, con una humedad del 45-60% y una intensidad lumínica de 3500-4200 luxes, mientras que las plantas de cidro se cultivaron a 24-26 °C, con una humedad alrededor del 70% y una iluminación de 7000-8000 luxes. En todos los casos se estableció un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Para los ensayos de inoculación de mutantes de CLBV se utilizaron plantas de *N. benthamiana* y para los de expresión transitoria se emplearon plantas *N. benthamiana* línea 16C que expresan constitutivamente el gen de la GFP, cuyas semillas fueron amablemente cedidas por el Dr. Baulcombe. Estas plantas se cultivaron en las condiciones indicadas anteriormente para las plantas de tabaco.

Para la purificación de viriones de CLBV se utilizaron hojas de kumquat Nagami injertado sobre limonero rugoso, inoculadas con el aislado del virus SRA-153 (Navarro et al., 1984). La inoculación mecánica tanto de viriones como de transcritos de CLBV se realizó en plantas de *N. benthamiana* y cidro Etrog. Estas plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura controlada de 18-26°C.

Las plantas de cítricos se cultivaron en macetas con una mezcla artificial de 50% arena y 50% turba y las de *Nicotiana* con una mezcla de 50% turba y 50% vermiculita. Todas las plantas se fertilizaron con una solución nutritiva desarrollada para cítricos (Arregui et al.,

1982), aunque para las plantas de *Nicotiana* se utilizó una dilución 1/10 de la misma.

1.2. Bacterias.

1.2.1. *Escherichia coli*.

Para la propagación y purificación de los plásmidos portadores de las construcciones generadas en este trabajo se utilizaron células de *E. coli* competentes para su transformación mediante choque térmico de la cepa DH5 α (construcciones pequeñas) y células electrocompetentes One Shot[®] Electrocomp[™] GeneHogs[®] (Invitrogen) (construcciones del genoma completo de CLBV).

1.2.1.1. Obtención de células de la cepa DH5 α competentes para su transformación mediante choque térmico.

Una colonia de *E. coli* DH5 α , aislada por triple estría en una placa de medio sólido Luria-Bertani (LB), se creció en 5 ml de medio líquido LB a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. Este preinóculo se añadió a un volumen de 500 ml de LB en un matraz Erlenmeyer estéril de 2 l y se incubó en agitación a 37°C hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0.5. El cultivo se enfrió en un baño de hielo durante 15 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4°C. El sedimento se resuspendió suavemente en 15 ml de tampón 1 frío (acetato potásico 30 mM, pH 5.8, RbCl 0.1 M, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%). Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, las células se resuspendieron en 4 ml de tampón 2 frío (MOPS 10 mM, pH 7, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%). Esta suspensión se fraccionó en alícuotas de 40 μ l que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*.

Para los experimentos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* se utilizaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa COR 308, amablemente cedidas por la Dra. Hamilton, portadoras del plásmido pCH32 que contiene copias extra de los genes de virulencia *VirG* y *VirE*.

1.2.2.1. Obtención de células de la cepa COR 308 competentes para su transformación mediante electroporación.

Una colonia de *A. tumefaciens* COR 308, aislada por triple estría en una placa de medio sólido LB con gentamicina (20 mg/l) y tetraciclina (5 mg/l), se creció en 10 ml de medio líquido LB con tetraciclina (10 mg/l) (LB-T₁₀) a 28°C en agitación (180 rpm) durante toda la noche. Este preinóculo se añadió a un volumen de 500 ml de LB-T₁₀ en un matraz Erlenmeyer estéril de 2 l y se incubó en agitación a 28°C hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0.5. El cultivo se enfrió en un baño de hielo durante 15 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con volúmenes decrecientes de HEPES 1 mM, ph 7.5 y una vez con 50 ml de glicerol 10%. Posteriormente se resuspendieron con 2 ml de glicerol 10% y se hicieron alícuotas de 40 µl, que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización.

2. Generación de construcciones de cDNA.

2.1. Obtención de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.

Para obtener el cDNA correspondiente al RNA genómico del aislado SRA-153 de CLBV, a partir de extractos de RNA total de plantas infectadas con el virus se amplificaron mediante RT-PCR tres fragmentos solapantes que cubrían la longitud completa del genoma

y que se fueron añadiendo secuencialmente en un vector pUC119 modificado por la Dra. Silvia Ambrós. Este vector contenía un doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la secuencia antígenómica de la ribozima del virus delta de la hepatitis, el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS-T) y dos sitios de restricción únicos *Sal* I y *Xho* I añadidos entre el promotor 35S y la ribozima. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron con el estuche comercial ThermoScript™ RT-PCR system (Invitrogen) usando los cebadores KU58, KU60 y KU66 (Tabla 1), para sintetizar el cDNA de las regiones 5'-terminal (f5'), central (fC) y 3'-terminal (f3'), respectivamente. El RNA total (350-500ng) y el correspondiente cebador (0.5µM) se desnaturalizaron calentando durante 5 min a 95°C y enfriando inmediatamente en hielo durante 3 min. A esta mezcla se añadió otra que contenía tampón de síntesis de cDNA 1X (50 mM de Tris-acetato pH 8.4, 75 mM de acetato potásico y 8 mM de acetato magnésico), DTT 5 mM, dNTPs 1 mM, 40U de inhibidor de RNasa, 15 U de transcriptasa inversa y agua tratada con DEPC (hasta 20 µl de volumen final). Las mezclas de reacción se incubaron a 60°C durante 1 h.

Los cDNAs obtenidos se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) utilizando las parejas de cebadores KU52/KU58, KU59/KU60 y KU61/KU66 (Tabla 1) para los fragmentos f5', fC y f3', respectivamente, y la polimerasa AccuPrime™ *Pfx* (Invitrogen). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl y contenían 2 µl del cDNA obtenido en la reacción de retrotranscripción, tampón de reacción 1X (MgSO₄ 1 mM, dNTPs 0.3 mM), 0.3 µM de cada cebador, 1 U de polimerasa y agua DEPC. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización previa de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 50°C, y 5 min a 68°C, con una extensión final de 5 min a 68°C.

El fragmento amplificado f5' se digirió con la enzima *Sal* I (New England BioLabs, NEB) y se purificó a partir de un gel de agarosa 1% (p/v) con el Kit GeneClean (Q-BIOGENE) siguiendo las instrucciones del proveedor. Por otro lado, el vector pUC119 modificado se linealizó con las enzimas *Stu* I (NEB) y *Sal* I, se purificó a partir de un gel de agarosa 1% con el estuche comercial ULTRACLEAN™ 15 DNA Purification (MOBIO) y se defosforiló con fosfatasa Antártica (NEB) siguiendo las indicaciones del fabricante. El inserto se ligó al vector en una reacción en la que se utilizó una relación molar vector: inserto de 3:1 en un volumen final de 10 µl que contenía: 100 ng de plásmido, 300 ng de inserto, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM y 400 U de T4 DNA Ligasa (NEB). La reacción se incubó a 16°C durante 16 h. La construcción obtenida (pUCf5') se utilizó para transfectar células competentes de *E. coli* de la cepa DH5α mediante choque térmico. El plásmido clonado se purificó con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

A partir del clon pUCf5' se sustituyó el promotor 35Sx2 por el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 582 nt del extremo 5' del virus con los cebadores KU63 (que contiene la secuencia del promotor T7) y KU64 (Tabla 1). Este fragmento se digirió con la enzima *Hind* III (Fermentas) y se clonó en el vector pUCf5' digerido con la misma enzima. A partir de este clon se eliminó la secuencia de la ribozima y el terminador NOS-T mediante la sustitución del fragmento comprendido entre los sitios de restricción *Xho* I y *Not* I por un adaptador, generado mediante el anillamiento de los cebadores V7 y V8, que contenía los mismos extremos *Xho* I y *Not* I y un sitio *Bam* HI en medio, obteniéndose la construcción pUCT7f5'. A continuación, una mezcla de 10 clones de la construcción pUCT7f5' se digirió con las enzimas *Sal* I y *Xho* I (Fermentas) y se ligó con el fragmento fC amplificado por PCR y digerido con las mismas enzimas, obteniéndose la construcción pUCT7f5'C, que contenía las

regiones 5' terminal y central del genoma del virus. Por último, el fragmento f3' digerido con las enzimas *Xho* I y *Bam* HI (Fermentas), se ligó con una mezcla de 10 clones de pUCT7f5'C digerida con las mismas enzimas para obtener la construcción T7-CLBV con el genoma completo del virus (Fig. 1). De esta construcción se seleccionaron 10 clones para ensayar su infectividad tanto en plantas como en protoplastos.

Tabla 1. Cebadores empleados en la retrotranscripción (RT) y amplificación por PCR de los diferentes fragmentos del RNA genómico de CLBV y para la modificación de los plásmidos.

Fragmento/modificación	Cebador#	Secuencia 5'-3' *	Posición (nt)†
f5'	KU 52-P	GAAAAGCAACGAAACAACCTACACAACCC	1-30
	KU 58	CCCCTTTCCAAGAACCACACATTTTCCA	3224-3196
fC	KU 59	GGTAACGGTGGCTCCATTGAAGATTG	3122-3147
	KU 60	AATTCAAATTCATCAATAACAGCTGTTTCG	6341-6312
f3'	KU 61	GAAATGAACAGATCTGGGGTAGATGCGCAC	6257-6286
	KU 66	TTTCTGGATCC(T) ₂₅ GTCTAAAAG	8747-8739
Sustitución promotor	KU 63	TTCATAAGCTAATACGACTCACTATAGAAAAGCAAC	1-20
	KU 64	GAAAGCAACC CTCTTTATTTTCCAAGCTTTTGATGAAATTCC	613-582
Delección Rbz y T-Nos	V7-P V8-P	tcgagTCTTGGATCCgc ggccgcGGATCCAAGAc	-

Los cebadores fosforilados en el extremo 5' están indicados con la letra P.

* Las secuencias en negrita representan sitios de restricción. La secuencia del promotor T7 esta indicada en letras itálicas. Las secuencias en minúscula son parte de sitios de restricción.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

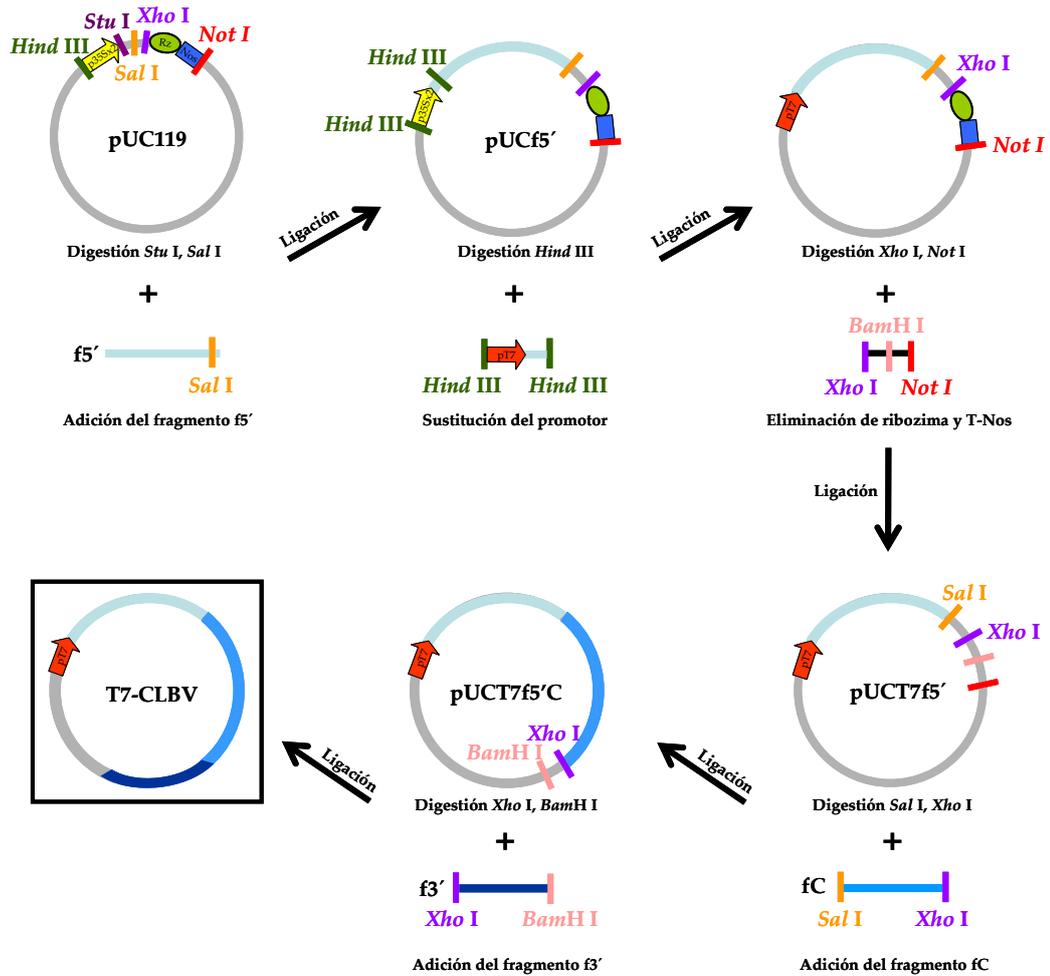


Figura 1. Estrategia empleada para obtener el clon T7-CLBV.

2.2. Obtención de mutantes del clon infeccioso IC-CLBV.

2.2.1. Introducción de codones de parada en las proteínas de movimiento y cápsida de CLBV.

En el laboratorio disponemos de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor 35S de CaMV clonado en el vector binario pBIN19 (IC-CLBV) (Vives et al., 2008). Para introducir

un codón de parada en el aminoácido 118 de la MP se sintetizó el mutante M1 mediante la sustitución en el clon IC-CLBV de los nucleótidos GAA por TGA, localizados en la posición 6313-6315 del genoma viral. Para obtener el mutante M1, a partir del clon IC-CLBV se amplificaron por PCR dos fragmentos de DNA (MP1 y MP2) utilizando las parejas de cebadores KU34/MP-Rstop y MP-Fstop/KU47, respectivamente (Tabla 2) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ l que contenían 80 ng de cDNA, tampón de reacción 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.8, MgSO₄ 2 mM, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM), dNTPs 1 mM, 0.5 μ M de cada cebador, 5 U de polimerasa y agua. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización previa de 2 min a 92°C, 38 ciclos de 20 s a 92°C, 20 s a 60°C, 1 min 30 s a 68°C y una extensión final de 5 min a 68°C. Los fragmentos amplificados MP1 y MP2 se purificaron y se ligaron utilizando 100 ng de cada uno de ellos, obteniéndose un fragmento único MP3 de 1.2 Kb que se amplificó con los cebadores KU 34/KU 47 (Tabla 2) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). El fragmento amplificado MP3 se purificó, se digirió con las enzimas *Xho* I y *Age* I (NEB) y se clonó en el plásmido IC-CLBV digerido con las mismas enzimas y desfosforilado, obteniéndose el mutante M1 (Fig. 2).

Para introducir un codón de parada en el segundo aminoácido de la CP se sintetizó el mutante M8 mediante la sustitución en el clon IC-CLBV de los nucleótidos AAA por TGA, localizados en la posición 7118-7120 del genoma viral. Para ello se empleó la misma estrategia descrita para el mutante M1. A partir del clon IC-CLBV se amplificaron por PCR dos fragmentos de DNA (CP1 y CP2) utilizando las parejas de cebadores CP-F/CP-Rstop y CP-Fstop/KU47, respectivamente (Tabla 2) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). Los fragmentos amplificados se ligaron obteniéndose un fragmento único CP3 de 1.4 Kb que se amplificó con los cebadores

CP-F/KU 47 (Tabla 2) y se clonó en el plásmido IC-CLBV obteniéndose el mutante M8 (Fig. 2).

De cada construcción se seleccionaron dos clones para ensayar su infectividad en plantas.

Tabla 2. Cebadores específicos de CLBV empleados para la síntesis de los mutantes M1 y M8.

Fragmento	Cebador #	Secuencia 5'–3' *	Posición (nt)†
MP1	KU 34	AACTGTATGGTTCCGATGC	6044-6062
	MP-Rstop-P	GTGCGCATCTACCCCAGATCTGTTCATTTCCAG	6286-6254
MP2	MP-Fstop-P	TGGTAGATACTAGCAGA ACTCGAGCC <u>TGA</u> ACAG	6287-6319
	KU 47	CTTGATCCACA ACTT ATCGC	7752-7733
MP3	KU 34/ KU 47		
CP1	CP-F	CTAGCAGAA ACTCGAGCC GAAACAG	6296-6319
	CP-Rstop-P	TCTATATTAATTCAAATAAGTACTA ACT ATTTAC	7102-7069
CP2	CP-Fstop-P	TAGTG TACATCCATG <u>GAA</u> ATC ACCA ATGATAATG	7103-7136
	KU 47	CTTGATCCACA ACTT ATCGC	7752-7733
CP3	CP-F/KU47		

Los cebadores fosforilados en el extremo 5' están indicados con la letra P.

* Las secuencias en **negrita** representan el sitio de restricción *Xho* I. Los nucleótidos subrayados indican los codones de parada introducidos en la secuencia de los mutantes.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

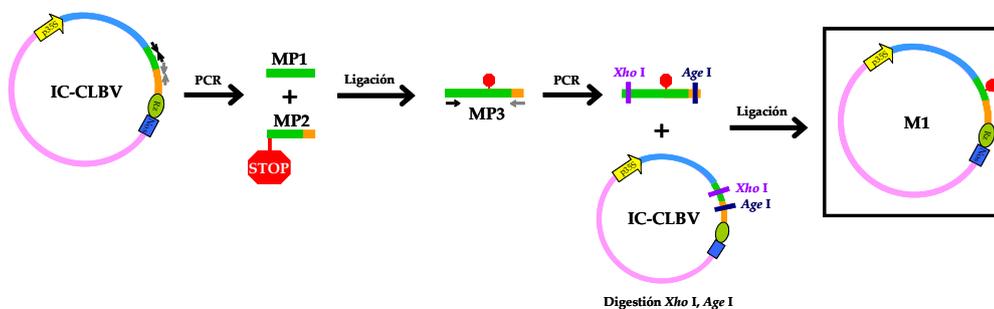


Figura 2. Estrategia empleada para obtener los mutantes M1 y M8.

2.2.2. Delecciones del promotor del sgRNA de la cápsida de CLBV.

2.2.2.1. Delecciones de la región 5' del promotor del CP-sgRNA.

Para delimitar la secuencia mínima promotora del CP-sgRNA por el extremo 5' se realizaron delecciones progresivas en el clon IC-CLBV que se extendían desde el nucleótido -520 (contado desde el inicio de transcripción de dicho sgRNA) hasta los nucleótidos -202 (mutante M2), -112 (mutante M3), -67 (mutante M4), -22 (mutante M5) y +1 (mutante M6), respectivamente. Además, se generó el mutante M7 en el que se deleccionó la secuencia comprendida entre los nucleótidos -202 y -67. Para obtener los mutantes M2-M6, la secuencia de CLBV comprendida entre los nucleótidos 6296 y 7282, que incluye parte de la MP y el inicio de la CP, se amplificó a partir del clon IC-CLBV-pUC (Vives et al., 2008) con los cebadores fCPF y fCPR (Tabla 3) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). El fragmento amplificado de 986 nt se clonó en el vector pUC19 digerido con *Sma* I y desfosforilado (Fermentas) obteniéndose la construcción pCP. A partir de esta construcción se amplificaron mediante PCR cinco fragmentos (pM2, pM3, pM4, pM5 y pM6) utilizando la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene), un cebador de secuencia directa que incluía un sitio de restricción *Xho* I (pCPA, pCPB, pCPC, pCPD y pCPE, respectivamente) y un cebador único de secuencia reversa fCPR, con un sitio *Bsu36* I (Tabla 3). Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *Xho* I y *Bsu36* I (NEB) y se clonaron en el vector IC-CLBV-pUC cortado con las mismas enzimas y desfosforilado. Posteriormente, los *cassettes* de expresión con los mutantes generados se escindieron con la enzima *Sfi* I y se subclonaron en el vector binario pBIN/*Sfi* (Vives et al., 2008) digerido con la misma enzima, obteniéndose los mutantes M2, M3, M4, M5 y M6 (Fig. 3).

Para obtener el mutante M7 se amplificó mediante PCR un fragmento comprendido entre los nucleótidos -520 y -202 respecto al

inicio de transcripción del CP-sgRNA, utilizando los cebadores fCPF y pCPA-R, que contienen un sitio de restricción *Xho* I (Tabla 3) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). Este fragmento (pM7) se digirió con la enzima *Xho* I y se clonó en el plásmido pM4 digerido con la misma enzima y desfosforilado. Posteriormente, el *cassette* de expresión con la secuencia delecionada de CLBV bajo el promotor 35S se subclonó en el vector binario pBIN/*Sfi* como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3. Cebadores específicos de CLBV empleados en la síntesis de los mutantes (M2-M7) que delimitan la región 5' del promotor del CP-sgRNA.

Fragmento	Cebador #	Secuencia 5'-3' *	Posición (nt)†
pCP	fCPF-P	CTAGCAGAA CTCGAG CCGAAACAG	6296-6319
	fCPR-P	GAAGAAGAC CTCAGGGT CCACCTC	7282-7259
pM2	pCPA-P	GGG CTCGAG ACATGTTTAATGCATCTTCTTCCA	6629-6652
	fCPR-P		
pM3	pCPB-P	GGG CTCGAG TGGCAATTAAGGGTTTGGACGCA	6719-6752
	fCPR-P		
pM4	pCPC-P	GGG CTCGAG GAAACCTCACCACGAGAAATCTCA	6764-6787
	fCPR-P		
pM5	pCPD-P	GGG CTCGAG TTAAGTCAGAGACGGCTTCACTGA	6809-6832
	fCPR-P		
pM6	pCPE-P	GGG CTCGAG GAAAAGAAGTCAAAGTGAAGAGA	6831-6854
	fCPR-P		
pM7	fCPF-P		
	CPA-R-P	GGG CTCGAG TTTCAAATGCCTTCTTGGATTCTTCC	6624-6599

Los cebadores fosforilados en el extremo 5' están indicados con la letra P.

* Las secuencias en negrita representan los sitios de restricción *Xho* I y *Bsu*36 I.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

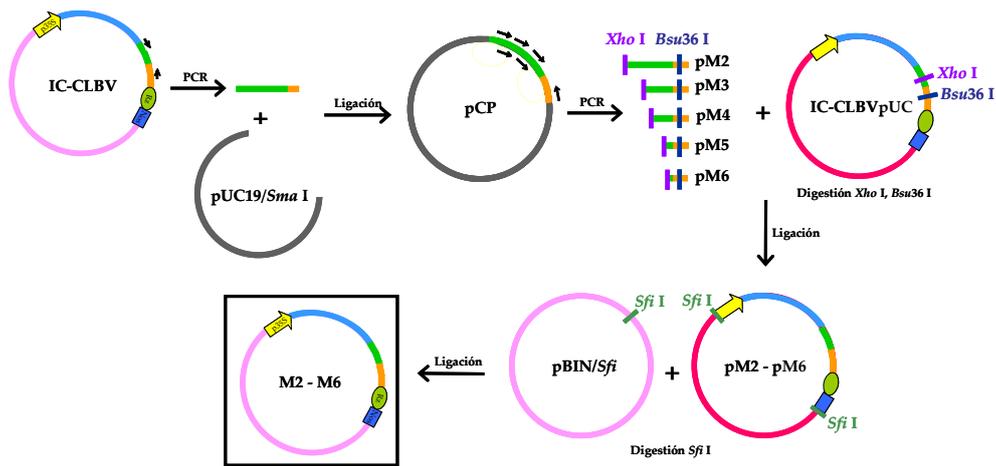


Figura 3. Estrategia empleada para obtener los mutantes M2, M3, M4, M5 y M6.

2.2.2.2. Delecciones de la región 3' del promotor del CP-sgRNA.

Para delimitar la secuencia mínima promotora del CP-sgRNA por el extremo 3' se realizaron delecciones progresivas en el clon IC-CLBV desde el codón de inicio de traducción de la CP hacia el inicio de transcripción del CP-sgRNA. En concreto se generaron 4 mutantes con delecciones que se extendían desde el nucleótido +284 (codón de inicio de traducción de la CP) hasta los nucleótidos +169 (mutante M9), +113 (mutante M10), +50 (mutante M11) y +8 (mutante M12), respectivamente. Para generar estos mutantes se utilizó el clon pCP (apartado 2.2.2.1.) como molde a partir del cual se amplificaron mediante PCR inversa las 4 construcciones (pM9, pM10, pM11 y pM12). Para ello se utilizó el cebador de secuencia directa fCP4 (Tabla 4), los cebadores de secuencia reversa fCP3, fCP2, fCP1 y fCP0, respectivamente (Tabla 4) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). Los productos de PCR, que contenían el vector pUC19 completo en el centro y parte de la secuencia de CLBVB en los extremos, se autoligaron obteniéndose las construcciones pM9, pM10, pM11 y pM12. A partir de estas construcciones se liberaron los

fragmentos de secuencia de CLBV comprendidos entre los sitios de restricción *Xho* I y *Bsu36* I y se clonaron en el vector IC-CLBV-pUC cortado con las mismas enzimas y desfosforilado. Posteriormente, los *cassettes* de expresión con los mutantes generados se escindieron con la enzima *Sfi* I y se subclonaron en el vector binario pBIN/*Sfi* digerido con la misma enzima, obteniéndose los mutantes M9, M10, M11 y M12 (Fig. 4).

Tabla 4. Cebadores específicos de CLBV empleados en la síntesis de los mutantes (M9-M12) que delimitan la región 3' del promotor del CP-sgRNA.

Fragmento	Cebador #	Secuencia 5'-3'	Posición (nt)†
pM9	fCP4 -P	ATGAAAATCACCAATGATAATGCC	7115-7138
	fCP3 -P	ATCTTTTAGATCATGCACAGTTTC	6999-6976
pM10	fCP4 -P	GTGCTTTAACCAACTGATGATC	6943 -6922
	fCP2 -P		
pM11	fCP4 -P	ATTTTCTCAATCTATCATTACCC	6880 -6858
	fCP1 -P		
pM12	fCP4 -P	TTCCTTTTCAGTGAAGCCGCTCTGACTTAAC	6838 -6808
	fCP0 -P		

Los cebadores fosforilados en el extremo 5' están indicados con la letra P.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

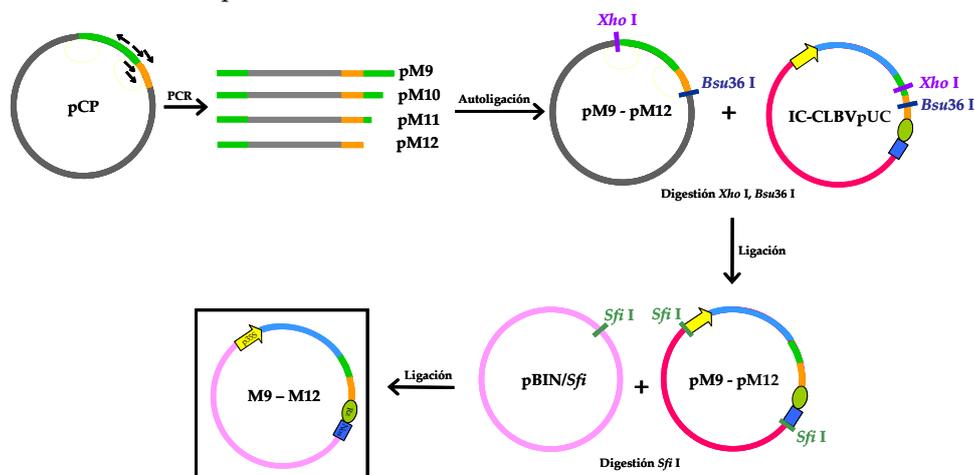


Figura 4. Estrategia empleada para obtener los mutantes M9, M10, M11 y M12.

2.2.2.3. Delecciones de las regiones 5' y 3' del promotor del CP-sgRNA.

Para delimitar la secuencia mínima promotora del CP-sgRNA por ambos extremos se sintetizaron cuatro nuevos mutantes del clon IC-CLBV que contenían el extremo 5' constante (-67) e idéntico al mutante M4 y diferentes extremos 3' localizados en los nucleótidos +169 (mutante M13), +113 (mutante M14), +50 (mutante M15) y +8 (mutante M16). Para obtener estos mutantes se utilizó como molde el clon pM4 (apartado 2.2.2.1) y se empleó la misma estrategia desarrollada en el apartado 2.2.2.2 utilizando los mismos cebadores.

2.2.3. Mutaciones del hexanucleótido GAAAAG presente en el inicio de transcripción del CP-sgRNA.

Para estudiar la importancia de esta secuencia en la síntesis del CP-sgRNA, a partir del clon IC-CLBV se obtuvieron diez construcciones mediante mutagénesis dirigida, que contenían mutaciones o delecciones individuales de los distintos nucleótidos que la componen. Para generar estos mutantes se utilizó el clon pCP (apartado 2.2.2.1.) como molde a partir del cual se amplificaron mediante PCR inversa las 10 construcciones (pM17, pM18, pM19, pM20, pM21, pM22, pM23, pM24, pM25 y pM26). Para ello se utilizaron los cebadores de secuencia directa que contenían la mutación a introducir, mut1, mut2, mut3, mut4, mut5, mut6, mut7, mut8, mut9 y mut10, respectivamente (Tabla 5), el cebador de secuencia reversa mut11 (Tabla 5) y la polimerasa Pfu Turbo DNA (Stratagene). Los productos de PCR, que contenían el vector pUC19 completo en el centro y parte de la secuencia de CLBV mutada en los extremos, se autoligaron obteniéndose las construcciones pM17-pM26. A partir de estas construcciones se liberaron los fragmentos de secuencia de CLBV comprendidos entre los sitios de restricción *Xho* I y *Bsu*36 I y se clonaron en el vector IC-CLBV-pUC cortado con las mismas enzimas y desfosforilado. Posteriormente, los *cassettes* de

expresión con los mutantes generados se escindieron con la enzima *Sfi* I y se subclonaron en el vector binario pBIN/*Sfi* digerido con la misma enzima, obteniéndose los mutantes M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23, M24, M25 y M26 (Fig. 5).

Tabla 5. Cebadores específicos de CLBV empleados en la síntesis de los mutantes (M17-M26) que incluyen mutaciones puntuales del hexanucleótido GAAAAG.

Fragmento	Cebador #	Secuencia 5'-3' *	Posición (nt)†
pM17	mut 1-P mut 11-P	TCACT <u>A</u> AAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG AGCCGTCTCTGACTTAACATGAGACAC	6826-6853 6825-6799
pM18	mut 2-P mut 11-P	TCACT <u>C</u> AAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM19	mut 3-P mut 11-P	TCACT <u>T</u> AAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM20	mut 4-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> GAAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM21	mut 5-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> CAAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM22	mut 6-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> TAAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM23	mut 7-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> AAAAGAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM24	mut 8-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> AAAAAAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM25	mut 9-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> AAAA <u>C</u> AAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853
pM26	mut 10-P mut 11-P	TCACT <u>G</u> AAAA <u>T</u> AAGTCAAAGTGAAGAG	6826-6853

Los cebadores fosforilados en el extremo 5' están indicados con la letra P.

* La secuencia subrayada indica el hexanucleótido modificado. Los nucleótidos en **negrita** representan la mutación puntual introducida.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

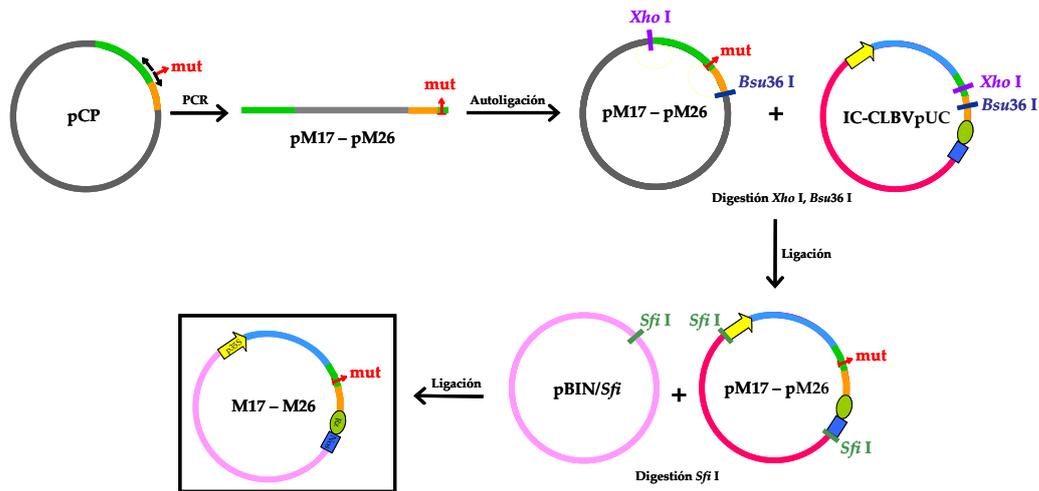


Figura 5. Estrategia empleada para obtener los mutantes M17-M26

2.3. Clonación de los ORFs de CLB V.

Para identificar las posibles proteínas supresoras del silenciamiento codificadas por CLB V, se clonaron los tres ORFs del virus en el vector binario pBIN 121. Debido al gran tamaño del ORF 1, este gen se clonó en dos fragmentos, uno que contenía el dominio metil-transferasa y otro que contenía los dominios helicasa, proteasa y polimerasa. A partir del clon IC-CLBV se amplificaron mediante PCR cuatro fragmentos: MET, REP, MP y CP utilizando la polimerasa AccuPrime™ *Pfx* (Invitrogen) y las parejas de cebadores MET1/MET2, REP1/REP2, MP1/MP2 y CP1/CP2, respectivamente (Tabla 6). Los fragmentos amplificados se clonaron en el plásmido pMOG 180 (Mogen Internacional), que contiene un doble promotor 35S del CaMV, seguido del sitio de restricción *BamH* I y del terminador del gen de la nopalina sintasa (T-Nos). Para ello, los productos de PCR se digirieron con la enzima *BamH* I (Fermentas) y se ligaron al plásmido pMOG 180 cortado con la misma enzima y desfosforilado, obteniéndose las construcciones pMMET, pMREP, pMMP y pMCP. A continuación, los *cassettes* de expresión completos se escindieron con la enzima *Hind* III (pMREP, pMMP, pMCP) o *Eco*

RI (pMMET) y se subclonaron en el vector binario pBIN 121 (Clontech) digerido con la misma enzima y desfosforilado, obteniéndose las construcciones pBI-MET (metil-transferasa), pBI-REP (helicasa, proteasa y RNA polimerasa), pBI-MP (proteína de movimiento) y pBI-CP (proteína de cápsida) (Fig. 6).

Tabla 6. Cebadores específicos de CLBV empleados en la síntesis de las construcciones que contienen los ORFs del virus.

Fragmento	Cebador	Secuencia 5'-3' *	Posición (nt)†
MET	MET 1	TTTGTGGATCCATGGCTTTGATGAGCAACAAACT	74-97
	MET 2	AAAGAGGATCCTTTGATTTGACATCATCTCCAATAATTTGC	1168-1138
REP	REP 1	TTTGTGGATCCATGTCGAGAGTCTCGATTACTTTCAG	2927-2952
	REP 2	AAAGAGGATCCAGATATCTTCGTCGGAAGATTGTT	5962-5936
MP	MP 1	TATCTGGATCCATGGCATCCCTGATCAATGTAAG	5962-5984
	MP 2	TACAGGATCCTCACTGGTTCAGTGTCACTG	7050-7029
CP	CP 1	ATGTGGATCCATGAAAATCACCAATGATAAT	7115-7135
	CP 2	CCATAGGATCCCTACATTTCTAAGAGTTTTGCTTTG	8206-8182

* Las secuencias en negrita indican el sitio de restricción *Bam*HI.

† Numeración respecto a la secuencia del aislado SRA-153 de CLBV.

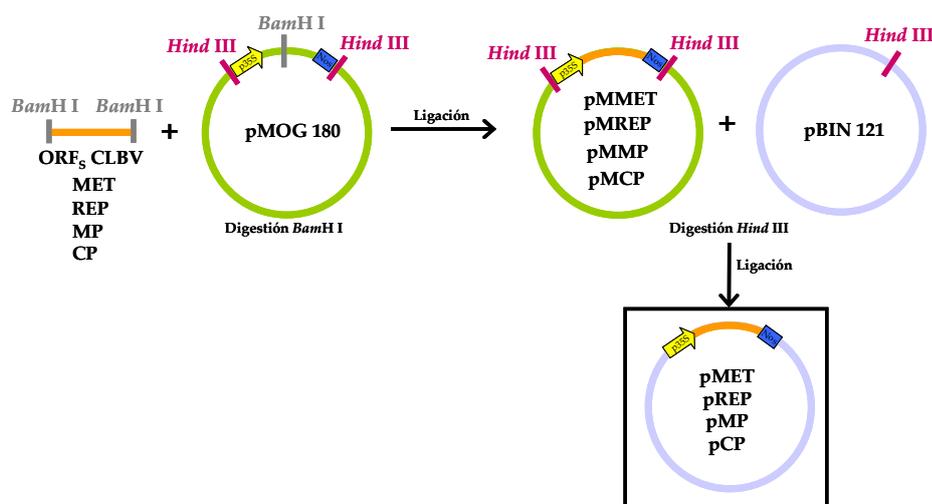


Figura 6. Estrategia empleada para obtener las construcciones pMET, pREP, pMP y pCP.

3. Aislamiento de protoplastos.

Para ensayar la infectividad de la construcción T7-CLBV se utilizaron protoplastos aislados a partir de mesófilo de hojas de *Nicotiana occidentalis*, *N. benthamiana* y cidro Etrog. El proceso del aislamiento de protoplastos se divide en tres etapas: i) preparación y desinfección del material vegetal, ii) eliminación de la pared celular mediante enzimas líticos, y iii) limpieza y purificación de los protoplastos. Para optimizar el rendimiento de obtención de protoplastos es necesario poner a punto los protocolos de aislamiento con las condiciones adecuadas para cada especie vegetal.

3.1. Protoplastos de *N. occidentalis*.

Para poner a punto el protocolo de aislamiento de protoplastos de *N. occidentalis* se siguió el descrito por Navas-Castillo et al. (1997) para *N. benthamiana* con algunas modificaciones. Se recolectaron hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas de 4 semanas de edad desde su transplante que se esterilizaron, sumergiéndolas en una solución de lejía (NaClO) 10% y Tween 20 1% (v/v) durante 10 min, se lavaron tres veces con agua estéril y se cortaron por el envés con un bisturí en pequeñas secciones de 1-2 mm perpendiculares al nervio central de la hoja y a lo largo de toda ella. Las hojas cortadas se incubaron en una solución enzimática que contenía celulasa 0.7% (Onozuka Cellulase RS, Yakult Onza, Japan) y macerasa 0.5% (Macerase Pectinase, Calbiochem, USA) en tampón MMC 0.45 [manitol 0.45M, MES (2-N-ácido morfolino etano sulfónico) 5 mM y CaCl₂ 10 mM, pH 5.8]. Los matraces se taparon y se incubaron durante 14 h en oscuridad.

Tras la incubación con la mezcla enzimática, el contenido de los matraces se filtró a través de una malla de acero inoxidable de 45 µm de luz para eliminar las células no digeridas y los restos de tejido vegetal. La mezcla filtrada se recogió en tubos de centrifuga estériles de 10 ml con fondo cónico y se centrifugó a 700 rpm durante 5 min

en una centrifuga Megafuge 1.0 (Heraeus Sepatech GmbH, Germany). El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón MMC 0.45 y se depositó sobre un colchón de sacarosa 0.47 M en tampón MES 5 mM, pH 5.8. Tras una centrifugación a 700 rpm durante 8 min, los protoplastos formaron una banda en la interfase de ambas soluciones, se recogieron aspirándolos suavemente con una pipeta Pasteur estéril y se depositaron en un nuevo tubo de centrifuga que contenía 5 ml de tampón MMC 0.45. Después de dos lavados, los protoplastos se resuspendieron en 10 ml de tampón MMC 0.45 y se hizo un recuento utilizando una cámara cuentaglóbulo Fusch-Rosenthal para determinar el rendimiento del aislamiento (número de protoplastos obtenidos por gramo de tejido).

3.2. Protoplastos de *N. benthamiana*.

El protocolo empleado para el aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* fue básicamente el descrito en el apartado 3.1 con ligeras modificaciones. Se emplearon hojas jóvenes totalmente expandidas de 3 semanas de edad desde su transplante. La solución enzimática estaba compuesta por celulasa 1% y macerasa 0.8% en tampón MMC 0.6. Para la purificación de los protoplastos se utilizó un colchón de sacarosa 0.5M en MES 5 mM, pH 5.8.

3.3. Protoplastos de cidro Etrog.

El protocolo empleado para el aislamiento de protoplastos de cidro fue el descrito por Grosser y Chandler (1987) con algunas modificaciones. Se recolectaron hojas jóvenes en crecimiento que se incubaron en 75 ml de una solución enzimática que contenía: celulasa 0.85%, macerasa 0.85%, pectoliasa 0.16% (Pectolyase Y-23, Kikkoman Corporation, Japan), CaCl₂ 19.25 mM, NaH₂PO₄ 2H₂O 0.8 mM, MES 6.25 mM, pH 5.8 y 25 ml de BH3 0.7 (Grosser y Gmitter, 1990). Los matraces se taparon y se incubaron en agitación (20 rpm) durante 16 h en oscuridad. Tras la incubación, las suspensiones filtradas se

centrifugaron en tubos de centrifuga de 10 ml a 900 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón MCPW 0.7 [BH3 0.7, 1xCPW-A (KH_2PO_4 0.02M, KNO_3 0.1M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, KI 0.1 mM y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 μM), 1xCPW-B (1xCPW-A y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M), y MES 6.25 mM].

Para el gradiente de manitol-sacarosa se empleó una solución de sacarosa que contenía: sacarosa 0.5 M, 1xCPW-A, 1xCPW-B, y MES 6.25 mM. Tras una centrifugación a 900 rpm durante 8 min, la banda de la interfase se recogió en un nuevo tubo y se lavó dos veces con tampón MCPW 0.7. Finalmente, se contó el número de protoplastos obtenidos en una cámara cuentaglóbulos Fusch-Rosenthal y se resuspendieron en tampón MCPW 0.7 para dejarlos a una concentración adecuada para la transfección.

4. Preparación de inóculos.

4.1. Purificación de viriones.

Los viriones de CLBV se purificaron a partir de corteza de brotes de kumquat Nagami infectados con el aislado SRA-153. Para ello 40 g de tejido de corteza se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero y se incubaron con 160 ml de tampón TACM [Tris-HCl 50 mM, pH 8, ácido ascórbico 0.1% (p/v), cisteína 0.1% (p/v) y 2- β mercaptoetanol 0.5%(v/v)] en agitación suave durante 15-20 min en hielo. El homogenizado se filtró a través de tres capas de muselina y el extracto crudo se clarificó mediante centrifugación a velocidad creciente de 5000, 8000 y 12000 rpm (10 min cada una) en un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante se recolectó y se ultracentrifugó a 225.000g durante 1 h y 15 min. El pellet obtenido se resuspendió en 500 μl de tampón fosfato 40 mM pH 8.2 (Galipienso et al., 2000).

4.2. Transcripción *in vitro*.

Para la síntesis de transcritos de RNA *in vitro* en presencia o ausencia de la estructura CAP se utilizaron 10 clones independientes de la construcción T7-CLBV. Los plásmidos se linealizaron con la enzima *Bam*H I, localizada en el extremo 3' de la secuencia del genoma de CLBV, detrás de la cola poli-A. Las reacciones de transcripción se realizaron utilizando el estuche comercial MEGAscript™ High Yield Transcription T7 Kit (Ambion) en un volumen final de 20 µl que contenían 3 µg de plásmido linealizado, tampón de transcripción 1X, 40 U de T7 RNA polimerasa, ATP 75 mM, CTP 75 mM, UTP 75 mM y GTP 75 mM para las reacciones sin CAP o GTP 15 mM + CAP 6 mM para las reacciones con esta estructura. Como análogo de la estructura CAP se utilizó m⁷(3'-O-methyl)(5')Gppp(5')G ARCA (Anti Reverse Cap Analog) (Ambion), que produce transcritos de RNA con la estructura CAP incorporada en la orientación correcta. Las mezclas de reacción se incubaron durante 4 h a 37°C y a continuación se incubaron con 2 U de Turbo DNasa libre de RNasas (Ambion) durante 30 min a 37°C para eliminar el molde de DNA. Los transcritos se purificaron mediante extracción con fenol:cloroformo y posterior precipitación con isopropanol, se cuantificaron con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nucliber) y se comprobó su integridad en un gel de agarosa 1%.

4.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las construcciones con los mutantes del clon infeccioso IC-CLBV y las construcciones con los diferentes ORFs de CLBV se utilizaron para transformar células competentes de *A. tumefaciens* cepa COR 308 mediante electroporación. Para ello, 10 ng de cada uno de los plásmidos purificado a partir de *E. coli* se añadió a 40 µl de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* descongeladas previamente en hielo. La mezcla se transfirió a una cubeta de

electroporación estéril y enfriada en hielo y se sometió a una descarga eléctrica de 2.5 KV, con una resistencia de 200 Ω , y una capacitancia de 25 μ F utilizando el electroporador "ElectroCell Manipulator (BTX)". Las células se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de medio LB y permanecieron en agitación durante 4 h a 28°C. Finalmente, la suspensión celular se sembró en dos placas Petri de LB suplementado con tetraciclina (5 mg/l) y kanamicina (50 mg/l).

5. Inoculación de construcciones.

5.1. Inoculación de protoplastos con viriones.

Para la transfección de protoplastos de *N. occidentalis* con viriones de CLBV se mezclaron 200 μ l de la suspensión de protoplastos ($0.6-1 \times 10^6$ protoplastos), 100 μ l del extracto semipurificado de viriones y 500 μ l de solución PEG 8000 30% (p/v) (30% polietilenglicol disuelto en tampón MMC 0.45 (manitol 0.45 M, MES 6.25 mM, CaCl₂ 10 mM) removiendo con una pipeta automática durante 20 s. Después se añadieron lentamente 5 ml de tampón MMC 0.45 y la suspensión se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 700 rpm durante 3 min y los protoplastos se resuspendieron en 5 ml de tampón AOKI 0.45 [manitol 0.45 M, MES 6.25 mM, sales AOKI 1x (KH₂PO₄ 0.2 mM, KNO₃ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, KI 1 μ M, CuSO₄ 0.1 μ M, CaCl₂ 10 μ M), pH 6.5]. La suspensión de protoplastos se volvió a centrifugar a 700 rpm durante 3 min y se resuspendió en 1.5 ml de tampón AOKI 0.45 suplementado con antibiótico antimicótico (1/200). Los protoplastos transfectados se incubaron en placas de cultivo celular de 6 pocillos recubiertos con agarosa 1% (p/v) disuelta en tampón MM 0.45 (manitol 0.45 M, MES 6.25 mM). Los protoplastos transfectados se mantuvieron 5 días en oscuridad a una temperatura de 28°C.

Para la transfección de protoplastos de *N. benthamiana* con viriones de CLBV se empleó el mismo protocolo detallado

anteriormente, pero se usaron suspensiones con $1-1.5 \times 10^6$ protoplastos y la concentración de manitol utilizada en todos los tampones fue de 0.6 M. En el caso de los protoplastos de cidro, en cada transfección se emplearon suspensiones con $1-2 \times 10^6$ protoplastos y el tampón empleado en todos los pasos fue el MCPW 0.7 (descrito en el apartado 3.3).

5.2. Inoculación de protoplastos con transcritos.

Para la transfección de protoplastos con transcritos del genoma completo del virus, se mezclaron 10 μg de los transcritos obtenidos en el apartado 4.2 con 1 μl de Superfect® (1mg/ml) (Quiagen) y 170 μl de tampón MMC 0.45 (para *N. occidentalis*), MMC 0.6 (para *N. benthamiana*) o MCPW 0.7 (para cidro). La mezcla se agitó, se incubó durante 30 min en hielo y se utilizó para transfectar los protoplastos tal y como se indica en el apartado 5.1., pero utilizando PEG 1540 40% (p/v).

5.3. Inoculación de plantas con transcritos.

Los transcritos del genoma completo del virus obtenidos a partir de 4 clones independientes de la construcción T7-CLBV en presencia de estructura CAP, como se indica en el apartado 4.2., se inocularon mecánicamente a 4 plantas de *N. benthamiana* y cidro Etrog, respectivamente. Las inoculaciones se realizaron en presencia o ausencia de Lipofectina^R (Invitrogen). La inoculación en hojas de *N. benthamiana* se realizó extendiendo 10 μl (10 μg) de transcritos purificados sobre la superficie de las hojas previamente espolvoreadas con carborundo, mientras que para la inoculación en cidro se realizaron 25 cortes en la corteza del tallo con una cuchilla mojada en la solución de transcripción.

5.4. Inoculación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los cultivos de *A. tumefaciens* (apartado 4.3.) transformados con las construcciones descritas en los apartados 2.2. y 2.3. se utilizaron para inocular plantas de *N. benthamiana* y *N. benthamiana* línea 16c, respectivamente. Para ello, se aislaron colonias individuales de células de *A. tumefaciens* transformadas con cada una de las construcciones y se crecieron en 5 ml de medio líquido LB suplementado con tetraciclina (5 mg/l) y kanamicina (50 mg/l) durante la toda la noche a 28°C en agitación (180 rpm). Una dilución 1/100 de estos precultivos se utilizó para inocular 50 ml de medio de inducción (LB, MES 10 mM, acetosiringona 20 µM y tetraciclina 10 mg/l) que se incubó en agitación (180 rpm) a 28°C durante toda la noche. Los cultivos inducidos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y las células se resuspendieron en medio de infiltración (agua estéril, MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, acetosiringona 150 µM) ajustando la concentración a una OD₆₀₀ de 1 y se incubaron entre 3-5 horas a temperatura ambiente con agitación suave (20 rpm). En los experimentos donde se coinfiltraban dos construcciones se hicieron mezclas 1:1 de las correspondientes suspensiones bacterianas.

Finalmente, las suspensiones bacterianas se infiltraron en los espacios intercelulares de las hojas de las plantas utilizando una jeringa de 2 ml sin aguja. Las hojas se infiltraron por el envés presionando suavemente la jeringa para evitar la perforación del tejido. Después de la infiltración se eliminó el exceso de suspensión bacteriana de la superficie de las hojas y las plantas continuaron creciendo en las condiciones descritas en el apartado 1.1.

6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

6.1. Extracción de RNA total a partir de protoplastos.

Los protoplastos transfectados con viriones o con transcritos de CLBV (apartados 5.1. y 5.2.) se transfirieron a un tubo eppendorf y se centrifugaron durante 1 min a 12.000 rpm. El pellet se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM, pH 9, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 2%) con ayuda del vortex y se realizaron dos extracciones con 400µl de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico 25:24:1 (V:V:V). Después de centrifugar 5 min a 12.000 rpm se recogió la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos, se mezcló con 3 volúmenes de etanol y 0.1 volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y se incubó a –20°C durante toda la noche. Después de una centrifugación a 12000 rpm durante 30 min, el sedimento que contenía el RNA se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 25 µl de agua DEPC.

6.2. Extracción de RNA total a partir de tejido agroinfiltrado.

Para extraer el RNA total a partir de tejido se utilizaron 100 mg de hojas agroinfiltradas que se homogeneizaron en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. A continuación se añadió 500 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 0.2M, EDTA 0.05 M, NaCl 0.2 M, SDS 0.2%) y 2.5 µl de 2-β mercaptoetanol y se incubó durante 5 min en hielo. Luego se añadió 500 µl de fenol/cloroformo/isoamílico 25:24:1 (V:V:V) y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se extrajo de nuevo con 450 µl de fenol/cloroformo/isoamílico 25:24:1 (V:V:V). El RNA se precipitó con etanol como se indica en el apartado 6.1. y se resuspendió en 25 µl de agua DEPC.

6.3. Extracción de RNAs de pequeño tamaño (siRNAs).

El RNA total se extrajo a partir de 250 mg de hojas infiltradas utilizando Tri-Reagent® y BCP® (1-bromo-3-cloropropano) (Sigma)

siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener las preparaciones enriquecidas en siRNAs se empleó el protocolo descrito por Yaegashi (2007). Los RNAs de alto peso molecular se precipitaron con una solución de PEG 8000 al 5% (p/v) y NaCl 0.5 M durante 30 min a 4°C. Los siRNAs contenidos en el sobrenadante se precipitaron con 3 volúmenes de etanol al 96%, se resuspendieron en 25 µl de agua libre de RNAsas y se cuantificaron por duplicado en el espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Nucliber).

7. Detección de ácidos nucleicos.

7.1. RT-PCR.

Para detectar la presencia de CLBV en las plantas inoculadas se utilizó la técnica de RT-PCR en un solo paso. Para ello, 1 µl de los correspondientes extractos de RNA total se desnaturalizaron durante 5 min a 94°C y se añadieron a 24 µl de una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.4 mM, 0.5 µM de cada uno de los cebadores específicos, 20 U de transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo de 45 minutos a 42°C para la síntesis del cDNA, un ciclo de 2 min a 94°C para inactivar la transcriptasa inversa y desnaturalizar el cDNA, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 15 s a 50°C y 30 s a 72°C para la amplificación, seguidos de un ciclo de extensión de 5 min a 72°C.

7.1.1. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

Los productos de PCR y los plásmidos purificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/V), aplicando una corriente de 100 voltios durante 1 hora en tampón 1xTAE (40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA). Los geles se tiñeron utilizando una solución de bromuro de etidio en agua destilada (0.5 µg ml⁻¹) y los productos de amplificación se observaron en un transiluminador de

luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó usando el marcador 1-Kb plus ladder (Invitrogen).

7.2. Detección mediante northern blot.

7.2.1 Preparación de muestras.

Las muestras de RNA total (5µl) se mezclaron con 10 µl de solución desnaturalizante [0.1 ml MOPS 10X (acetato sódico 50 mM, Na₂EDTA 10 mM, MOPS 0.2 M, pH 7), 0.35 ml de formaldehído 37%, 1 ml de formamida), se desnaturalizaron durante 20 min a 70°C y se enfriaron en hielo durante 2 min.

Las muestras de siRNAs se mezclaron con el mismo volumen de solución desnaturalizante [formamida desionizada 50%, glicerol 50%, y azul de bromofenol 0.01% (p/V)], se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C y se enfriaron en hielo durante 2 min.

7.2.2 Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

El RNA de las muestras preparadas en el apartado 7.2.1. se separó en geles de agarosa 0.9% (p/V) que contenían 5.1 ml de formaldehído 37% y 10 ml de MOPS 10X en un volumen final de 100 ml. La electroforesis se realizó en tampón MOPS 1X a un voltaje constante de 80-100 V durante 3.5 h.

7.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Para el análisis de los siRNAs se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% p/V con una relación acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Sigma) con urea 7 M y tampón TBE 0.5x (Tris 1 M, ácido bórico 0.9 M, EDTA 0.01 M, pH 8.3). La electroforesis se realizó en tampón TBE 0.5% a una intensidad constante de 200 V durante 2-3 horas.

7.2.4. Electrotransferencia de los RNAs a membranas.

Los ácidos nucleicos totales separados mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche), usando tampón fosfato (Na_2HPO_4 25 mM, NaH_2PO_4 25 mM, pH 6.5) como tampón de electrotransferencia y una corriente de intensidad constante de 250 mA durante 1 h y 1 A durante 15 horas.

Las muestras enriquecidas en siRNAs separadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) usando TBE como tampón de electrotransferencia y aplicando una corriente de 250 mA durante 16 h.

Finalizada la transferencia, los ácidos nucleicos se fijaron covalentemente a las membranas de nylon mediante irradiación con luz ultravioleta (125 mJ/cm^2).

7.2.5. Marcado de las ribosondas.

Para realizar los ensayos de hibridación molecular tipo northern blot se prepararon sondas de RNA marcadas con digoxigenina mediante transcripción *in vitro* (Tabla 7). Las reacciones de transcripción se efectuaron en un volumen final de 20 μl que contenían 2-3 μg de plásmido linealizado, NTPs (ATP 1 mM, CTP 1 mM, GTP 1 mM, UTP 6.5 mM, DIG-11-UTP 3.5 mM), tampón de transcripción 1X (Tris-HCl 0.04 M, pH 8, MgCl_2 6 mM, DTT 10 mM, espermidina 2 mM), 20 U de inhibidor de RNasa, 40 U de T7 o SP6 RNA Polimerasa (Roche) y agua DEPC. La mezcla de reacción se incubó durante 2 h a 37°C. Posteriormente se añadió 2 U de Turbo DNasa libre de RNasas (Ambion) y se incubó durante 30 min con el fin de degradar el molde de DNA. Para parar la reacción se añadió a la mezcla 0.2 μl de EDTA 0.2 M y se incubó durante 5 min a 65°C. Finalmente, el RNA se precipitó con LiCl 7.5 M durante 1 h a -20°C.

Plásmido y enzima empleado en su linealización	RNA polimerasa	Identidad y polaridad del transcrito
pGEM CLBV/ <i>Nco</i> I ¹	SP6	CLBV(-)
pGEM CLBV/ <i>Not</i> I ¹	T7	CLBV(+)
pGEM GFP/ <i>Apa</i> I ²	SP6	GFP(-)

Tabla 7. Plásmidos recombinantes utilizados para la síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina.

¹Contiene la región de CLBV localizada entre los nucleótidos 7685 y 8044 del gRNA.

²Contiene la secuencia del gen de la proteína GFP4.

7.2.6. Hibridación.

Las membranas se prehibridaron durante una hora utilizando una solución compuesta por dodecil sulfato sódico (SDS) 0.02%, formamida 50%, SSC 5x (SSC 20x, =NaCl 3.0 M, Citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0), reactivo de bloqueo 2% (Roche Diagnostics) y N-lauroilsarcosina 0.1%. Posteriormente, las ribosondas se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 10 min y se añadieron a la solución de hibridación ULTRAhyb Hybridization buffer (Ambion) con la que se incubaron las membranas durante toda la noche a 68°C para el análisis de RNAs totales o a 42°C para el análisis de siRNAs. A continuación las membranas se lavaron dos veces con SSC 2x y SDS 0.1% a temperatura ambiente y dos veces con SSC 0.1x y SDS 0.1% a 65°C para las membranas de RNAs totales o a 50°C para las de siRNAs. Las membranas se revelaron utilizando el estuche comercial Nucleic Acid Detection kit con el sustrato CPD-star (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. Detección de GFP.

La fluorescencia verde de la proteína GFP se visualizó iluminando las plantas de *N. benthamiana* con una lámpara de luz ultravioleta (UVP Black Ray® B-100AP High intensity) con una longitud de onda de 365 nm y una potencia de 100 watt. Las fotografías se realizaron con una cámara de fotos NIKON digital D-200, un objetivo de 60 mm (Micronikkor AF-S) y un filtro para la luz UV (B+W).

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. Se ha obtenido un clon infeccioso de cDNA del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda y se pusieron a punto protocolos para el aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana*, *N. occidentalis* y cidro Etrog.
2. CLBV replicó en protoplastos de las tres especies inoculadas con viriones purificados, aunque a un nivel muy bajo. La máxima tasa de replicación se detectó en protoplastos de *N. benthamiana*, a pesar de no ser un huésped natural del virus.
3. La transfección de protoplastos con transcritos de RNA de CLBV produjo una acumulación viral inferior a la detectada al inocular viriones y ésta sólo se pudo detectar en protoplastos de *N. benthamiana*, mientras que la inoculación mecánica directa en plantas de cidro Etrog o de *N. benthamiana* con transcritos de CLBV fue infructuosa, lo que sugiere que el RNA del virus no es un inóculo eficiente.
4. Se ha desarrollado un sistema genético eficiente para caracterizar el promotor del RNA subgenómico de la cápsida (CP-sgRNA) de CLBV *in vivo* mediante agroinoculación de hojas de *N. benthamiana* con un clon de cDNA del genoma completo del virus.
5. El mutante del clon infeccioso de CLBV en el que se introdujo un codón de parada en el gen de la proteína de movimiento del virus fue capaz de multiplicarse pero no de moverse.
6. El mutante del clon infeccioso en el que se introdujo un codón de parada en el gen de la proteína de cápsida fue capaz de multiplicarse, aunque el RNA viral (gRNA y los dos sgrNAs) sólo se acumuló hasta 12 dpi y luego la planta lo eliminó posiblemente por activación del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional.

7. La posible secuencia promotora del CP-sgRNA de CLBV se localizó entre los nucleótidos -67 y +50 con respecto al inicio de transcripción, por lo tanto sería suficiente una región nucleotídica igual o inferior a 117 nt para controlar la síntesis de dicho RNA subgenómico.
8. Los mutantes en los que se suprimieron segmentos de la secuencia comprendida entre el inicio de traducción del gen de la cápsida y el inicio de transcripción del CP-sgRNA indujeron una acumulación creciente de dicho sgRNA a medida que los segmentos suprimidos eran mayores, sugiriendo que esta secuencia podría modular negativamente la transcripción del CP-sgRNA.
9. Las mutaciones del primer y segundo nucleótido del motivo GAAAAG, conservado en el extremo 5' del gRNA y de los dos sgRNAs 3' coterminales de CLBV, indujeron una disminución drástica en la acumulación del CP-sgRNA, mientras que la supresión de una A o las mutaciones de la G (+6) no alteraron dicha acumulación. Esto sugiere que los dos nucleótidos iniciales juegan un papel importante en el reconocimiento por la polimerasa del virus, mientras que los siguientes no son esenciales para la transcripción de dicho sgRNA.
10. Se ha identificado la proteína de movimiento (MP) de CLBV como supresora del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). Esta proteína se comportó como un supresor del silenciamiento débil al compararlo con proteínas supresoras del PTGS de otros virus con actividad conocida.
11. La MP de CLBV fue capaz de suprimir el PTGS a nivel intracelular pero no fue capaz de bloquear la señal de silenciamiento célula a célula ni a larga distancia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

AHLQUIST, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296**, 1270-1273. Review.

ADAMS, M.J., ACCOTTO, G.P., AGRANOVSKY, A.A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., BRUNT A.A., CANDRESSE, T., COUTTS, R.H.A., DOLJA, V.V., FALK, B.W., FOSTER, G.D., GONSALVES, D., JELKMANN, W., KARASEV, A., MARTELLI G.P., MAWASSI, M., MILNE, R.G., MINAFRA, A., NAMBA, S., ROWHANI A., VETTEN, H.J., VISHNICHENKO, V.K., WISLER, G.C., YOSHIKAWA, N. & ZAVRIEV, S.K. (2005). *Flexiviridae*. In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV (Eds C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, & L.A. Ball), pp. 1089-1124. Elsevier/Academic Press, London.

ADKINS, S., SIEGEL, R.W., SUN, J.H., KAO, C.C. (1997). Minimal templates directing accurate initiation of subgenomic RNA synthesis in vitro by the brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* **3**, 634-647.

AGUSTÍ, J., MERELO, P., CERCÓS, M., TADEO, F.R., TALÓN, M. (2008). Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *J Exp Bot* **59**, 2717-2733.

ALBIACH-MARTÍ, M. R., GROSSER, J. W., GOWDA, S., MAWASSI, M., SATYANARAYANA, T., GARNSEY, S. M., AND DAWSON, W. O. (2004). Citrus tristeza virus replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Mol. Breed* **14**, 117-128.

ALÓS, E., ROCA, M., IGLESIAS, D.J., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., DAMASCENO, C.M., THANNHAUSER, T.W., ROSE, J.K., TALÓN, M., CERCÓS, M. (2008). An evaluation of the basis and consequences of a stay-green mutation in the navel negra citrus mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. *Plant Physiol.* **147**, 1300-1315.

ANANDALAKSHMI, R., MARATHE, R., GE, X. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**, 142-144.

ANANDALAKSHMI, R., PRUSS, G.J., GE, X., MARATHE, R., MALLORY, A.C., SMITH, T.H., VANCE, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 13079-13084.

- ANCILLO, G., GADEA, J., FORMENT, J., GUERRI, J., NAVARRO, L. (2007). Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J. Exp. Bot.* **58**, 1927-1933.
- ANDREU, P., ARBELOA, A., TERRÉN, N., MARÍN, J. A. (2008). Aislamiento y cultivo de protoplastos del patrón ciruelo 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick). ITEA-Información Técnica Económica Agraria **104**, 482-492.
- AYLLÓN, M.A., GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., DAWSON, W.O. (2004). Cis-acting elements at opposite ends of the Citrus tristeza virus genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology* **322**, 41-50.
- AYLLÓN, M.A., GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., KARASEV, A.V., ADKINS, S., MAWASSI, M., GUERRI, J., MORENO, P., DAWSON, W.O. (2003). Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs synthesis. *J. Virol.* **77**, 9232-9243.
- BALMORI, E., GILMER, D., RICHARDS, K., GUILLEY, H., JONARD, G. (1993). Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* **75**, 517-521.
- BARTEL, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281-297 Review.
- BAULCOMBE, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- BAUMBERGER, N., TSAI, C.H., LIE, M., HAVECKER, E., BAULCOMBE, D. C. (2007). The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol.* **17**, 1609-14.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M., HANNON, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- BORTOLAMIOL, D., PAZHOUHANDEH, M., MARROCCO, K., GENSCHIK, P., ZIEGLER-GRAFF, V. (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol.* **17**, 1615-1621.
- BOCCARD, F., BAULCOMBE, D. (1993). Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* **193**, 563-578.

- BOUVIER, F., D'HARLINGUE, A., BACKHAUS, R.A., KUMAGAI, M.H., CAMARA, B. (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6346-6352.
- BOYER, J. C., HAENNI, A.L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415-426. Review.
- BRIGNETI, G., MARTÍN-HERNÁNDEZ, A.M., JIN, H., CHEN, J., BAULCOMBE, D.C., BAKER, B., JONES, J.D. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* **39**, 264-267.
- BRIGNETI, G., VOINET, O., LI, W.X., JI, L.H., DING, S.W., BAULCOMBE, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**, 6739-6746.
- BRUGIDOU, C., HOLT, C., YASSI, M.N., ZHANG, S., BEACHY, R., FAUQUET, C. (1995). Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology* **206**, 108-115.
- BUCHER, E., SIJEN, T., DE HAAN, P., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* **77**, 1329-1336.
- BUITEVELD, J. J., CREEMERS-MOLENAAR. (1994). Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant. Sci.* **100**, 203-210.
- BUJARSKI, J. J., MILLER, W. A. (1992). Use of in Vitro Transcription to Study Gene Expression and Replication of Spherical, Positive Sense RNA Plant Viruses. In: "Genetic engineering with plant virus", pp 115-147. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BURCH-SMITH, T. M., ANDERSON, J. C., MARTIN, G. B., DINESH-KUMAR, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* **39**, 734-746. Review.
- CAÑIZARES, M. C., LOMONOSSOFF, G. P., NICHOLSON, L. (2005). Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants. *Expert Rev. Vaccines* **4**, 687-697.
- CAÑIZARES, M. C., NAVAS-CASTILLO, J. MORIONES. (2008). Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus. *E. Virology* **379**, 168-174.

- CAO, X., ZHOU, P., ZHANG, X., ZHU, S., ZHONG, X., XIAO, Q., DING, B., LI, Y. (2005). Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J. Virol.* **79**, 13018-13027.
- CAPLAN, J., DINESH-KUMAR, S. P. (2006). Using viral vectors to silence endogenous genes. *Curr. Proto.c Microbiol.* Chapter 16, Unit 16L.6.
- CARTHEW, R.W. (2006). Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 203-208. Review.
- CASELLS, A.C., BARLASS, M. (1978). The initiation of TMV infection in isolated protoplasts by polyethylene glycol. *Virology* **87**, 459-462.
- CERCÓS, M., SOLER, G., IGLESIAS, D. J., GADEA, J., FORMENT, J., TALÓN, M. (2006). Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric Acid utilization. *Plant Mol Biol.* **62**, 513-527.
- CHAO, J.A., LEE, J.H., CHAPADOS, B.R., DEBLER, E.W., SCHNEEMANN A, WILLIAMSON, J.R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 952-957.
- CHAPMAN, E.J., CARRINGTON, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet.* **8**, 884-96. Review.
- CHAPMAN, E.J., PROKHNEVSKY, A.I., GOPINATH, K., DOLJA, V.V., CARRINGTON, J.C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* **18**, 1179-1186.
- CHAPMAN, S., KAVANAGH, T., BAULCOMBE, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* **2**, 549-57.
- CHELLAPPAN, P., VANITHARANI, R., FAUQUET, C.M. (2005). MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 10381-10386.
- CHEN, H.Y., YANG, J., LIN, C., YUAN, Y.A. (2008). Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *EMBO Rep.* **9**, 754-760.
- CHEN, J., LI, W.X., XIE, D., PENG, J.R., DING, S.W. (2004). Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* **16**, 1302-1313.

- CHIBA, M., REED, J. C., PROKHNEVSKY, A. I., CHAPMAN, E. J., MAWASSI, M., KOONIN, E. V., CARRINGTON, J.C., DOLJA, V. V. (2006). Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**, 7-14.
- CHICHESTER, J.A., YUSIBOV, V. (2007). Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum. Vaccin.* **3**, 146-148.
- CHILTON, M.D., DRUMMOND, M.H., MERIO, D.J., SCIAKY, D., MONTOYA, A.L., GORDON, M.P., NESTER, E.W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- CHOI, I.R., OSTROVSKY, M., ZHANG, G., WHITE, K.A. (2001). Regulatory activity of distal and core RNA elements in Tombusvirus subgenomic mRNA 2 transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 41761-41768.
- CHOI, I.R., WHITE, K.A. (2002). An RNA activator of subgenomic mRNA1 transcription in tomato bushy stunt virus. *J. Biol. Chem.* **277**, 3760-3766.
- CHUNG, E., SEONG, E., KIM, Y.C., CHUNG, E.J., OH, S.K., LEE, S., PARK, J.M., JOUNG, Y.H., CHOI, D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol Cells.* **17**, 377-380.
- CONSTANTIN, G.D., KRATH, B.N., MACFARLANE, S.A., NICOLAISEN, M., JOHANSEN, I.E., LUND, O.S. (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J.* **40**, 622-631.
- CONTRERAS, R., CHEROUTRE, H., DEGRAVE, W., FIERS, W. (1982). Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res.* **10**, 6353-6362.
- CRETE, P., LEUENBERGER, S., IGLESIAS, V. A., SUAREZ, V., SCHOB, H., HOLTORF, H., VAN EEDEN, S., MEINS, F. (2001). Graft transmission of induced and spontaneous post-transcriptional silencing of chitinase genes. *Plant J.* **28**, 493-501.
- CSORBA, T., BOVI, A., DALMAY, T., BURGYÁN, J. (2007). The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* **81**, 11768-11780.
- CUI, X., LI, G., WANG, D., HU, D., ZHOU, X. (2005). A Begomovirus DNAbeta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J. Virol.* **79**, 10764-10775.

- CULVER, J. N. (1996). Tobamovirus cross protection using a potexvirus vector. *Virology* **226**, 228-35.
- DAWSON, W. O., LEWANDOWSKI, D. J., HILF, M. E., BUBRICK, P., RAFFO, A. J., SHAW, J. J., GRANTHAM, G. L., DESJARDINS, P. R. (1989). A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* **172**, 285-292.
- DELERIS, A., GALLEGO-BARTOLOME, J., BAO, J., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C., VOINNET, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68-71.
- DÍAZ-PENDÓN, J. A., DING, S. W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 303-326.
- DING, S.W., VOINNET, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-26. Review.
- DING, X.S., LIU, J., CHENG, N.H., FOLIMONOV, A., HOU, Y.M., BAO, Y., KATAGI, C., CARTER, S.A., NELSON, R.S. (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 583-592.
- DING, X.S., SCHNEIDER, W.L., CHALUVADI, S.R., MIAN, M.A., NELSON, R.S. (2006). Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 1229-1239.
- DOHI, K., NISHIKIORI, M., TAMAI, A., ISHIKAWA, M., MESHI, T., MORI, M. (2006). Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Arch Virol.* **151**, 1075-1084.
- DONSON, J., KEARNEY, C.M., HILF, M.E., DAWSON, W.O. (1991). Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 7204-7208.
- DREHER, T.W., MILLER, W.A. (2006). Translational control of positive strand RNA plant viruses. *Virology* **344**, 185-197.
- DUNN, J.J., STUDIER, F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* **166**, 477-535.
- DUNOYER, P., LECELLIER, C.H., PARIZOTTO, E.A., HIMBER, C., VOINNET, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**, 1235-1250.

- DUNOYER, P., RITZENTHALER, C., HEMMER, O., MICHLER, P., FRITSCH, C. (2002). Intracellular localization of the peanut clump virus replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labeled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. *J. Virol.* **76**, 865-874.
- DUNOYER, P., VOINNET, O. (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 415-423.
- FAIVRE-RAMPANT, O., GILROY, E.M., HRUBIKOVA, K., HEIN, I., MILLAM, S., LOAKE, G.J., BIRCH, P., TAYLOR, M., LACOMME, C. (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiol.* **134**, 1308-1316.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **39**, 806-811.
- FOFANA, I.B., SANGARÉ, A., COLLIER, R., TAYLOR, C., FAUQUET, C.M. (2004). A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Mol. Biol.* **56**, 613-624.
- FORMENT, J., GADEA, J., HUERTA, L., ABIZANDA, L., AGUSTI, J., ALAMAR, S., ALOS, E., ANDRES, F., ARRIBAS, R., BELTRAN, J.P., BERBEL, A., BLAZQUEZ, M.A., BRUMOS, J., CANAS, L.A., CERCOS, M., COLMENERO-FLORES, J.M., CONESA, A., ESTABLES, B., GANDIA, M., GARCIA-MARTINEZ, J.L., GIMENO, J., GISBERT, A., GOMEZ, G., GONZALEZ-CANDELAS, L., GRANELL, A., GUERRI, J., LAFUENTE, M.T., MADUENO, F., MARCOS, J.F., MARQUES, M.C., MARTINEZ, F., MARTINEZ-GODOY, M.A., MIRALLES, S., MORENO, P., NAVARRO, L., PALLAS, V., PEREZ-AMADOR, M.A., PEREZ-VALLE, J., PONS, C., RODRIGO, I., RODRIGUEZ, P.L., ROYO, C., SERRANO, R., SOLER, G., TADEO, F., TALON, M., TEROL, J., TRENOR, M., VAELLO, L., VICENTE, O., VIDAL, C.H., ZACARIAS, L., CONEJERO, V. (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* **57**, 375-391.
- FRENCH, R., AHLQUIST, P. (1988). Characterization and engineering of sequences controlling in vivo synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. *J. Virol.* **62**, 2411-2420.
- FRENCH, R., JANDA, M., AHLQUIST, P. (1986). Bacterial Gene Inserted in an Engineered RNA Virus: Efficient Expression in Monocotyledonous Plant Cells. *Science* **231**, 1294-1297.

- FURUICHI, Y., LAFIANDRA, A., SHATKIN, A.J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**, 235-239.
- GALIPIENSO, L., NAVARRO, L., BALLESTER-OLMOS, J. F., PINA, J. A., MORENO, P., GUERRI, J. (2000). Host range and symptomatology of a graft-transmissible pathogen causing bud union crease of citrus on trifoliate rootstocks. *Plant Pathology* **49**, 308-314.
- GALIPIENSO, L., VIVES, M.C., MORENO, P., MILNE, R.G., NAVARRO, L., GUERRI, J. (2001). Partial characterisation of citrus leaf blotch virus, a new virus from Nagami kumquat. *Arch. Virol.* **146**, 357-368.
- GALIPIENSO, L., VIVES, M.C., NAVARRO, L., MORENO, P., GUERRI, J. (2004). Detection of Citrus Leaf Blotch Virus Using Digoxigenin-Labeled cDNA Probes and RT-PCR. *European journal of plant pathology* **110**, 175-181.
- GANDÍA, M., CONESA, A., ANCILLO, G., GADEA, J., FORMENT, J., PALLÁS, V., FLORES, R., DURAN-VILA, N., MORENO, P., GUERRI, J. (2007). Transcriptional response of Citrus aurantifolia to infection by Citrus tristeza virus. *Virology* **367**, 298-306.
- GLICK, E., ZRACHYA, A., LEVY, Y., METT, A., GIDONI, D., BELAUSOV, E., CITOVSKY, V., GAFNI, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**, 157-61.
- GODGE, M.R., PURKAYASTHA, A., DASGUPTA I, KUMAR PP. (2008). Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant. Cell. Rep.* **27**, 209-219. Review.
- GOLOVKIN M, SPITSIN S, ANDRIANOV V, SMIRNOV Y, XIAO Y, POGREBNYAK N, MARKLEY K, BRODZIK R, GLEBA Y, ISAACS SN, KOPROWSKI H. (2007). Smallpox subunit vaccine produced in *Planta* confers protection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 6864-6869.
- GOREGAOKER, S. P., ECKHARDT, L.G., CULVER, J.N. (2000). Tobacco mosaic virus replicase-mediated cross-protection: contributions of RNA and protein-derived mechanisms. *Virology* **273**, 267-75.
- GOSSELÉ, V., FACHÉ, I., MEULEWAETER, F., CORNELISSEN, M., METZLAFF, M. (2002). SVISS a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J.* **32**, 859-866.

- GOTO, K., KOBORI, T., KOSAKA, Y., NATSUAKI, T., MASUTA, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1050-1060.
- GOULD, B., KRAMER, E.M. (2007). Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods* 3:6.
- GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., AYLLÓN, M. A., ALBIACH-MARTÍ, M. R., MAWASSI, M., RABINDRAN, S., GARNSEY, S. M., DAWSON, W. O. (2001). Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of citrus tristeza virus: production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology* **286**, 134-151.
- GRDZELISHVILI, V.Z., CHAPMAN, S.N., DAWSON, W.O., LEWANDOWSKI, D.J., (2000). Mapping of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters *in vivo*. *Virology* **275**, 177-192.
- GREEN, M.R., MANIATIS, T., MELTON, D.A. (1983). Human beta-globin pre-mRNA synthesized *in vitro* is accurately spliced in *Xenopus* oocyte nuclei. *Cell* **32**, 681-694.
- GROSSER, J.W., CHANDLER, J. (1987). Aseptic isolation of leaf protoplasts from Citrus, Poncirus, Citrus x Poncirus hybrids and Severinia for use in somatic hybridization experiments. *Scientia Horticulturae* **31**, 253-257.
- GROSSER, J.W., GMITTER, F.G. (1990). Protoplast fusion and Citrus Improvement. *Plant Breeding Rev.* **8**, 339-374.
- GUARDO, M., POTERE, O., CASTELLANO, M.A., SAVINO, V., CARUSO, A. (2009). A new herbaceous host of citrus leaf blotch virus. *J. Plant. Pathol.* **91**, 485-488.
- GUARDO, M., SORRENTINO, G., MARLETTA, T., CARUSO A. (2007). First Report of *Citrus leaf blotch virus* on Kumquat in Italy. *The American Phytopathological Society*. Volume 91, 8, 1054.
- GUERRI, J., PINA, J.A., VIVES, M.C., NAVARRO L., MORENO, P. (2004). Seed transmission of Citrus leaf blotch virus: Implications in quarantine and certification programs. *Plant Disease* **88**, 906-907.
- GUO, H.S., DING, S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* **21**, 398-407.

- HAAS, G., AZEVEDO, J., MOISSIARD, G., GELDREICH, A., HIMBER, C., BUREAU, M., FUKUHARA, T., KELLER, M., VOINNET, O. (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **27**, 2102-2112.
- HAMILTON, A.J., BAULCOMBE, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- HAMILTON, A.J., VOINNET, O., CHAPPELL, L., BAULCOMBE, D. C. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**, 4671-4679.
- HAMMOND, S.M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- HARPER, J., CHOOI, K. M., PEARSON, M. N. (2008). First Report of *Citrus leaf blotch virus* in New Zealand. *The American Phytopathological Society* **92**, 10, 1470.
- HAVIV, S., GALIAKPAROV, N., GOSZCZYNSKI, D. E., BATUMAN, O., CZOSNEK, H., MAWASSI, M. (2006). Engineering the genome of Grapevine virus A into a vector for expression of proteins in herbaceous plants. *J. Virol. Methods* **132**, 227-31.
- HAYES, R.J., BUCK, K.W. (1990). Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* **71**, 2503-2508.
- HEARNE, P.Q., KNORR, D.A., HILLMAN, B.I., MORRIS, T.J. (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* **177**, 141-51.
- HEMMES, H., KAAIJ, L., LOHUIS, D., PRINS, M., GOLDBACH, R., SCHNETTLER, E. (2009). Binding of small interfering RNA molecules is crucial for RNA interference suppressor activity of rice hoja blanca virus NS3 in plants. *J. Gen. Virol.* **90**, 1762-1766.
- HEMMES, H., LAKATOS, L., GOLDBACH, R., BURGYÁN, J., PRINS, M. (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* **13**, 1079-1089.

- HILEMAN, L.C., DREA, S., MARTINO, G., LITT, A., IRISH, V.F. (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J.* **44**, 334-341.
- HIMBER, C., DUNOYER, P., MOISSIARD, G., RITZENTHALER, C., VOINNET, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**, 4523-4533.
- HÖCK, J., MEISTER, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* **9**, 210. Review.
- HOLZBERG, S., BROSIO, P., GROSS, C., POGUE, G.P. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* **30**, 315-327.
- HOU, H., QIU, W. (2003). A novel co-delivery system consisting of a Tomato bushy stunt virus and a defective interfering RNA for studying gene silencing. *J. Virol. Methods.* **111**, 37-42.
- HUERTA, L., FORMENT, J., GADEA, J., FAGOAGA, C., PEÑA, L., PÉREZ-AMADOR, M. A., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. (2008). Gene expression analysis in citrus reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. *Plant Cell Environ.* **31**, 1620-1633.
- HULL, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, California, EEUU.
- JIN, Y., MA, D., DONG, J., JIN, J., LI, D., DENG, C., WANG, T. (2007). HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta. *J. Virol.* **81**, 12881-12888.
- JIN, Y., MA, D., DONG, J., LI, D., DENG, C., JIN, J., WANG, T. (2007). The HC-pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Mol Plant. Microbe Interact.* **20**, 1505-1511.
- JOHANSEN, L.K., CARRINGTON, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**, 930-938.
- JOHNSON, J.A., BRAGG, J.N., LAWRENCE, D.M., JACKSON, A.O. (2003). Sequence elements controlling expression of *Barley stripe mosaic virus* subgenomic RNAs *in vivo*. *Virology* **313**, 66-80.
- JOHNSON, J., LIN, T., LOMONOSSOFF, G. (1997). Presentation of heterologous peptides on plant viruses: genetics, structure, and function. *Annu Rev Phytopathol.* **35**, 67-86.

- JOHNSTON, J.C., ROCHON, D.M. (1995). Deletion analysis of the promoter for the cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology* **214**, 100-109.
- JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P., BARTEL, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**, 19-53. Review.
- JOVER-GIL, S., CANDELA, H., PONCE, M.R. (2005). Plant microRNAs and development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 733-744.
- KALANTIDIS, K., SCHUMACHER, H.T., ALEXIADIS, T., HELM, J.M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell.* **100**, 13-26. Review.
- KALANTIDIS, K., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2006). Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *Plant J.* **45**, 1006-1016.
- KANCHANAREE, P., UTHAIRAT, N., SIRANUT, L., SUPAWADEE, P., SALAK, P. (2006). Factors Affecting the Protoplast Isolation and Culture of *Anubias nana* Engler. *International Journal of Botany* **2**, 193-200.
- KARASEV, A.V., FOULKE, S., WELLENS, C., RICH, A., SHON, K.J., ZWIERZYNSKI, I., HONE, D., KOPROWSKI, H., REITZ, M. (2005). Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* **23**, 1875-80.
- KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-70.
- KASSCHAU, K. D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E. J., KRIZAN, K. A., CARRINGTON, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. *Dev. Cell.* **4**, 205-217.
- KELLY, L., GERLACH, W. L., WATERHOUSE, P.M. (1994). Characterisation of the subgenomic RNAs of an Australian isolate of barley yellow dwarf luteovirus. *Virology* **202**, 565-573.
- KENNERDELL, J. R., CARTHEW, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **7**, 1017-1026.
- KLAASSEN, V.A., MAYHEW, D., FISHER, D., FALK, B.W. (1996). *In vitro* transcripts from cloned cDNAs of the lettuce infectious yellows closterovirus bipartite genomic RNAs are competent for replication in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. *Virology* **222**, 169-75.

- KOEV, G., MILLER, W. A. (2000). A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J. Virol.* **74**, 5988-5996.
- KOEV, G., MOHAN, B.R., MILLER, W.A. (1999). Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic RNA 1. *J Virol.* **73**, 2876-85.
- KON, T., SHARMA, P., IKEGAMI, M. (2007). Suppressor of RNA silencing encoded by the monopartite tomato leaf curl Java begomovirus. *Arch. Virol.* **152**, 1273-1282.
- KOZAK, M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5073-5080.
- KREUZE, J.F., SAVENKOV, E.I., CUELLAR, W., LI, X., VALKONEN, J.P. (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J. Virol.* **79**, 7227-7238.
- KUBOTA, K., TSUDA, S., TAMAI, A., MESHI, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol.* **77**, 11016-11026.
- KUHN, R.J., HONG, Z., STRAUSS, J.H. (1990). Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J Virol.* **64**, 1465-1476.
- KUMAGAI, M.H., DONSON, J., DELLA-CIOPPA, G., GRILL, L.K. (2000). Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector. *Gene* **245**, 169-174.
- KUMAGAI, M.H., DONSON, J., DELLA-CIOPPA, G., HARVEY, D., HANLEY, K., GRILL, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* **92**, 1679-1683.
- KUMAGAI, M. H., KELLER, Y., BOUVIER, F., CLARY, D., CAMARA, B. (1998). Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **14**, 305-315.
- KUTTER, C., SVOBODA, P. (2008). miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol.* **5**, 181-188.
- LAKATOS, L., CSORBA, T., PANTALEO, V., CHAPMAN, E.J., CARRINGTON, J.C., LIU, Y.P., DOLJA, V.V., CALVINO, L.F., LÓPEZ-MOYA, J.J., BURGYÁN, J.

- (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768-2780.
- LAKATOS, L., SZITTYA, G., SILHAVY, D., BURGÁN, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**, 876-884.
- LEHNER, B., CROMBIE, C., TISCHLER, J., FORTUNATO, A., FRASER, A.G. (2006). Systematic mapping of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* identifies common modifiers of diverse signaling pathways. *Nat. Genet.* **38**, 896-903.
- LEVÉE, V., BERTRAND, M., DUVAL, M., BILODEAU, P., AQUIN, S., VÉZINA, L. P. (2005). An efficient system for protoplast culture from alfalfa (*Medicago sativa*). Suitable for plant transformation and regeneration. <http://www.medicago.com>
- LEVIS, R., SCHLESINGER, S., HUANG, H.V. (1990). Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J. Virol.* **64**, 1726-1733.
- LEWIS, J.D., DESTITO, G., ZIJLSTRA, A., GONZALEZ, M.J., QUIGLEY, J.P., MANCHESTER, M., STUHLMANN, H. (2006). Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med.* **12**, 354-360.
- LI, F., DING, S.W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 503-31.
- LI, H., LI, W.X., DING, S.W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**, 1319-21.
- LI, H.W., DING, S.W. (2005). Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* **579**, 5965-5973. Review.
- LI, H.W., LUCY, A.P., GUO, H.S., LI, W.X., JI, L.H., WONG, S.M., DING, S.W. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**, 2683-2691.
- LI, W., WONG, S. M. (2006). Analysis of subgenomic promoters of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* and demonstration of 5' untranslated and 3' terminal sequences functioning as subgenomic promoters. *J. Virol.* **80**, 3395-3405.
- LIANG, X. Z., DING, S. W., WONG, S. M. (2002). Development of a kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) protoplast system for a replication study of Hibiscus chlorotic ringspot virus. *Plant Cell Reports* **20**, 982-986.

- LIN, H. X., XU, W., WHITE, K. A. (2007). A multicomponent RNA-based control system regulate subgenomic mRNA transcription in tombusvirus. *J. Virol.* **81**, 2429-2439.
- LIN, H.X., WHITE, K.A. (2004). A complex network of RNA-RNA interactions controls subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *EMBO J.* **23**, 3365-3374.
- LIN, S.S., WU, H.W., JAN, F.J., HOU, R.F., YEH, S.D. (2007). Modifications of the Helper Component-Protease of Zucchini yellow mosaic virus for Generation of Attenuated Mutants for Cross Protection Against Severe Infection. *Phytopathology* **97**, 287-296.
- LINDENBACH BD, SGRO JY, AHLQUIST P. (2002). Long-distance base pairing in flock house virus RNA1 regulates subgenomic RNA 3 synthesis and RNA 2 replication. *J Virol.* **76**, 3905-3919.
- LIPPMAN, Z., MARTIENSSEN, R. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-370.
- LIU, H., REAVY, B., SWANSON, M., MACFARLANE, S.A. (2002). Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology* **298**, 232-239.
- LIU, L., CAÑIZARES, M. C., MONGER, W., PERRIN, Y., TSAKIRIS, E., PORTA, C., SHARIAT, N., NICHOLSON, L., LOMONOSSOFF, G. P. (2005). Cowpea mosaic virus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. *Vaccine* **23**, 1788-1792.
- LIU, L., GRAINGER, J., CAÑIZARES, M.C., ANGELL, S.M., LOMONOSSOFF, G.P. (2004). Cowpea mosaic virus RNA-1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* **323**, 37-48.
- LIU, Q., FENG, Y., ZHU, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics* **9**, 277-286.
- LIU, Y., NAKAYAMA, N., SCHIFF, M., LITT, A., IRISH, V.F., DINESH-KUMAR, S.P. (2004). Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* **54**, 701-11.

- LIU, Y., SCHIFF, M., DINESH-KUMAR, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* **31**, 777-786.
- LIU, Y., SCHIFF, M., MARATHE, R., DINESH-KUMAR, S.P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**, 415-429.
- LLAVE, C., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 13401-13406.
- LOMMEL, S. A., KENDALL, T. L., XIONG, Z., NUTTER, R. C. (1991). Identification of the maize chlorotic mottle virus capsid protein cistron and characterization of its subgenomic messenger RNA. *Virology* **181**, 382-385.
- LOVE, A.J., LAIRD, J., HOLT, J., HAMILTON, A.J., SADANANDOM, A., MILNER, J.J. (2007). Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J. Gen. Virol.* **88**, 3439-3444.
- LU, R., FOLIMONOV, A., SHINTAKU, M., LI, W.X., FALK, B.W., DAWSON, W.O., DING, S.W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 15742-15747.
- LU, R., MADURO, M., LI, F., LI, H.W., BROITMAN-MADURO, G., LI, W.X., DING, S.W. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**, 1040-1043.
- LU, R., MARTIN-HERNANDEZ, A.M., PEART, J.R., MALCUIT, I., BAULCOMBE, D.C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**, 296-303. Review.
- MACDIARMID, R. (2005). RNA silencing in productive virus infections. *Annu Rev Phytopathol.* **43**, 523-544.
- MAEDA, E., HAGIWARA, T. (1974). Enzymatic isolation of protoplasts from the rice leaves and callus cultures. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* **43**, 68-76.
- MAIA, I.G., SÉRON, K., HAENNI, A.L., BERNARDI, F. (1996). Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 367-391. Review.
- MALLORY, A.C., ELY, L., SMITH, T.H., MARATHE, R., ANANDALAKSHMI, R., FAGARD, M., VAUCHERET, H., PRUSS, G., BOWMAN, L., VANCE, V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**, 571-83.

- MALLORY, A.C., MLOTSHWA, S., BOWMAN, L.H., VANCE, V.B. (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.* **35**, 82-92.
- MANCHESTER, M. , SINGH, P. (2006). Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **58**, 1505-1522.
- MAO, C., FLYNN, C.E., HAYHURST, A., SWEENEY, R., QI, J., GEORGIU, G., IVERSON, B., BELCHER, A.M. (2003). Viral assembly of oriented quantum dot nanowires. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 6946-6951.
- MARCONI, G., ALBERTINI, E., BARONE, P., DE MARCHIS, F., LICO, C., MARUSIC, C., RUTILI, D., VERONESI, F., PORCEDDU, A. (2006). In plant production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnol.* **6**, 29.
- MARSH, L. E., DREHER, T.W., HALL, T.C. (1988). Mutational analysis of the core and modulator sequences of the BMV RNA 3 subgenomic promoter. *Nucleic Acids Res.* **16**, 981-995.
- MARSH, L.E., HALL, T.C. (1987). Evidence implicating a tRNA heritage for the promoters of positive-strand RNA synthesis in brome mosaic and related viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 331-341.
- MARTELLI, G.P., ADAMS, M.J., KREUZE, J.F., DOLJA, V.V. (2007). Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 73-100.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M., BAULCOMBE, D.C. (2008). Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J. Virol.* **82**, 4064-4071.
- MARTINEZ-GODOY, M.A., MAURI, N., JUAREZ, J., MARQUES, M.C., SANTIAGO, J., FORMENT, J., GADEA, J. (2008). A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* **9**, 318.
- MARTÍNEZ-PRIEGO, L., DONAIRE, L., BARAJAS, D., LLAVE, C. (2008). Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* **376**, 346-356.
- MARTÍNEZ-TURIÑO, S., HERNÁNDEZ, C. (2009). Inhibition of RNA silencing by the coat protein of Pelargonium flower break virus: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.* **90**, 519-25.

- MATZKE, M.A., BIRCHLER, J.A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 24-35. Review.
- MCCORMICK, A.A., KUMAGAI, M.H., HANLEY, K., TURPEN, T.H., HAKIM, I., GRILL, L.K., TUSÉ, D., LEVY, S., LEVY, R. (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 703-8.
- MCCORMICK, A. A., REINL, S.J., CAMERON, T.I., VOJDANI, F., FRONEFIELD, M., LEVY, R., TUSÉ, D. J. (2003). Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *Immunol. Methods* **278**, 95-104.
- MELTON, D.A., KRIEG, P.A., REBAGLIATI, M.R., MANIATIS, T., ZINN, K., GREEN, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- MENG, C., CHEN, J., PENG, J., WONG, S.M. (2006). Host-induced avirulence of hibiscus chlorotic ringspot virus mutants correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* **87**, 451-459.
- MÉRAI, Z., KERÉNYI, Z., KERTÉSZ, S., MAGNA, M., LAKATOS, L., SILHAVY, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol.* **80**, 5747-5756.
- MÉRAI, Z., KERÉNYI, Z., MOLNÁR, A., BARTA, E., VÁLÓCZI, A., BISZTRAY, G., HAVELDA, Z., BURGYÁN, J., SILHAVY, D. (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* **79**, 7217-7226
- METT, V., FARRANCE, C.E., GREEN, B.J., YUSIBOV, V. (2008). Plants as biofactories. *Biologicals* **36**, 354-8. Review.
- MILLER, R. A., PRESLEY, A. D., FRANCIS, M.B. (2007). Self-assembling light-harvesting systems from synthetically modified tobacco mosaic virus coat proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3104-3109.
- MILLER, W.A., DREHER, T.W., HALL, T.C. (1985). Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-)-sense genomic RNA. *Nature* **313**, 68-70.

- MILLER, W. A., KOEV, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**, 1-8.
- MILLER, W.A., WHITE, K.A. (2006). Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 447-67. Review.
- MOCHIZUKI, T., OHKI, S. T. (2004). Shoot meristem tissue of tobacco inoculated with Cucumber mosaic virus is infected with the virus and subsequently recovers from infection by RNA silencing. *J. Gen. Plant Pathol.* **70**, 363–366.
- MOISSIARD, G., VOINNET, O. (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19593-19598.
- MOISSIARD, G., VOINNET, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* **5**, 71-82.
- MOLNÁR, A., CSORBA, T., LAKATOS, L., VÁRALLYAY, E., LACOMME, C., BURGYÁN, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* **79**, 7812-7818.
- MONGER, W., ALAMILLO, J.M., SOLA, I., PERRIN, Y., BESTAGNO, M., BURRONE, O. R., SABELLA, P., PLANA-DURAN, J., ENJUANES, L., GARCIA, J. A., LOMONOSSOFF, G. P. (2006). An antibody derivative expressed from viral vectors passively immunizes pigs against transmissible gastroenteritis virus infection when supplied orally in crude plant extracts. *Plant Biotechnol J.* **4**, 623-631.
- MUSIYCHUK, K., STEPHENSON, N., BI, H., FARRANCE, C.E., OROZOVIC, G., BRODELIUS, M., BRODELIUS, P., HORSEY, A., UGULAVA, N., SHAMLOUL, A.M., METT, V., RABINDRAN, S., STREATFIELD, S.J., YUSIBOV, V. (2007). A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respi. Viruses* **1**, 19-25. Review.
- NA, H., WHITE, K.A. (2006). Structure and prevalence of replication silencer-3' terminus RNA interactions in Tombusviridae. *Virology* **345**, 305-16.
- NAGY, P. D., POGANY, J., SIMON, A. E. (1999). RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers in vitro and in vivo in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **18**, 5653–5665.

- NAGYOVÁ A, SUBR Z. (2007). Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. *Acta Virol.* **51**, 223-37.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell* **2**, 279-289.
- NAYLOR, M., REEVES, J., COOPER, J.I., EDWARDS, M.L., WANG, H. J. (2005). Construction and properties of a gene-silencing vector based on Poplar mosaic virus (genus Carlavirus). *Virol. Methods* **124**, 27-36.
- NAVARRO, L., PINA, J. A., BALLESTER-OLMOS, J. F., MORENO, P., CAMBRA, M. (1984). A new graft transmissible disease found in Nagami kumquat. In: "Proceedings of the 9th Conference International Organisation of Citrus Virologists" (L. W. Timmer, and J. A. Dodds, Eds.), 234-240. IOCV, Riverside, C.A.
- NAVARRO, L., PINA, J. A., JUAREZ, J., BALLESTER-OLMOS, J. F. (1993). Elimination of a Bud Union Abnormality of Sweet Orange Grafted on Rough Lemon by Shoot-tip Grafting *in vitro*. In: "Proc. of the 9th Conf. International Organization of Citrus Virologists", 234-240. IOCV, Riverside, C.A.
- NAVAS-CASTILLO, J., ALBIACH-MARTÍ, MR., GOWDA, S., HILF, ME., GARNSEY, SM., DAWSON, WO. (1997). Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology* **1**, 92-7.
- NEMCHINOV, L.G., NATILLA, A. (2007). Transient expression of the ectodomain of matrix protein 2 (M2e) of avian influenza A virus in plants. *Protein Expr. Purif.* **56**, 153-9.
- NÖLKE, G., FISCHER, R., SCHILLBERG, S. (2003). Production of therapeutic antibodies in plants. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3**, 1153-1162. Review.
- NÖLKE, G., SCHNEIDER, B., FISCHER, R., SCHILLBERG, S. (2005). Immunomodulation of polyamine biosynthesis in tobacco plants has a significant impact on polyamine levels and generates a dwarf phenotype. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 237-47.
- NUZZACI, M., PIAZZOLLA, G., VITTI, A., LAPELOSA, M., TORTORELLA, C., STELLA, I., NATILLA, A., ANTONACI, S., PIAZZOLLA, P. (2007). Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Arch Virol.* **152**, 915-928.

- OHSHIMA, M., TOYAMA, S. (1989). Studies on culture of cells and tissues of crop plants, I. survey on isolation and culture of protoplasts from rice leaf sheath. *Jpn. J. Crop. Sci.* **58**, 103-110.
- PALAUQUI, J. C., ELMAYAN, T., POLLIEN, J.M., VAUCHERET, H. (1998). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**, 4738-45.
- PANAVAS, T., NAGY, P. D. (2005). Mechanism of stimulation of plus-strand synthesis by an RNA replication enhancer in a tombusvirus. *J. Virol.* **79**, 9777-9785.
- PARKER, J. S., ROE, S. M., BARFORD, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **23**, 4727-4737.
- PASTERNAK, A.O., SPAAN, W.J., SNIJDER, E.J. (2006). Nidovirus transcription: how to make sense? *J. Gen. Virol.* **87**, 1403-1421.
- PAZHOUHANDEH, M., DIETERLE, M., MARROCCO, K., LECHNER, E., BERRY, B., BRAULT, V., HEMMER, O., KRETSCH, T., RICHARDS, K. E., GENSHIK, P., ZIEGLER-GRAFF, V. (2006). F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 1994-1999.
- PEELE, C., JORDAN, C.V., MUANGSAN, N., TURNAGE, M., EGELKROUT, E., EAGLE, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ROBERTSON, D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J.* **27**, 357-66.
- PÉREZ-FILGUEIRA, D.M., BRAYFIELD, B.P., PHIRI, S., BORCA, M.V., WOOD, C., MORRIS, T.J. (2004). Preserved antigenicity of HIV-1 p24 produced and purified in high yields from plants inoculated with a tobacco mosaic virus (TMV)-derived vector. *J. Virol. Methods.* **121**, 201-8.
- PÉREZ-FILGUEIRA, D. M., ZAMORANO, P.I., DOMÍNGUEZ, M.G., TABOGA, O., DEL MÉDICO ZAJAC, M.P., PUNTEL, M., ROMERA, S.A., MORRIS, T.J., BORCA, M.V., SADIR, A.M. (2003). Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine* **21**, 4201-4209.
- PESCHEN, D., LI, H. P., FISCHER, R., KREUZALER, F., LIAO, Y.C. (2004). Fusion proteins comprising a Fusarium-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nat. Biotechnol.* **22**, 732-8.

- PFEFFER, S., DUNOYER, P., HEIM, F., RICHARDS, K. E., JONARD, G., ZIEGLER-GRAFF, V. (2002). P0 of Beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **76**, 6815–6824.
- PIGNATTA, D., KUMAR, P., TURINA, M., DANDEKAR, A., FALK, B.W. (2007). Quantitative analysis of efficient endogenous gene silencing in *Nicotiana benthamiana* plants using tomato bushy stunt virus vectors that retain the capsid protein gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 609-18.
- POGANY, J., FABIAN, M.R., WHITE, K.A., NAGY, P.D. (2003). A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* **22**, 5602-5611.
- PORTA, C., LOMONOSSOFF, G.P. (1998). Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens. *Rev. Med. Virol.* **8**, 25-41.
- POWERS, J.G., SIT, T.L., QU, F., MORRIS, T.J., KIM, K.H., LOMMEL, S.A. (2008). A versatile assay for the identification of RNA silencing suppressors based on complementation of viral movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 879-890.
- PRICE, B. D., ROEDER, M., ALQUIST, P. (2000). DNA directed expression of functional *Flock house virus* RNA1 derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous gene expression, and selective effects on subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **74**, 11724-11733.
- PRÜFER, D., WIPF-SCHEIBEL, C., RICHARDS, K., GUILLEY, H., LECOQ, H., JONARD, G. (1995). Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* **214**, 150-8.
- QU, F., REN, T., MORRIS, T. J. (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* **77**, 511-522.
- QU, F., X. YE, G. HOU, S. SATO, T. E. CLEMENTE, AND T. J. MORRIS. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **79**:15209–15217.

- RAHIM, M.D., ANDIKA, I.B., HAN, C., KONDO, H., TAMADA, T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* **88**, 1611-1619.
- RATCLIFF, F., MARTIN-HERNANDEZ, A.M., BAULCOMBE, D.C. (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237-245.
- RAY, D., WHITE, K.A. (1999). Enhancer-like properties of an RNA element that modulates Tombusvirus RNA accumulation. *Virology* **256**, 162-171.
- REED, J. C., KASSCHAU, K. D., PROKHNEVSKY, A. I., GOPINATH, K., POGUE, G. P., CARRINGTON, J.C., DOLJA, V. V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* **306**, 203-209.
- REUSKEN, C.B., NEELEMAN, L., BREDERODE, F.T., BOL, J.F. (1997) Mutations in coat protein binding sites of alfalfa mosaic virus RNA 3 affect subgenomic RNA 4 accumulation and encapsidation of viral RNAs. *J. Virol.* **71**, 8385-83891.
- REVILL, P.A., DAVIDSON, A.D., WRIGHT, P.J. (1999). Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology* **260**, 273-276.
- ROBERTSON, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 495-519. Review.
- RODRÍGUEZ-CAMPOS, A., AZORÍN, F. (2007). RNA is an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS One* **2**, e1182
- ROTH, B.M., PRUSS, G.J., VANCE, V.B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**, 97-108. Review.
- RUIZ, M.T., VOINNET, O., BAULCOMBE, DC. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell.* **10**, 937-46.
- RUIZ-RUIZ, S., AMBRÓS, S., VIVES, M.C., NAVARRO, L., MORENO, P., GUERRI, J. (2009). Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **160**, 57-62.
- SAEJUNG, W., FUJIYAMA, K., TAKASAKI, T., ITO, M., HORI, K., MALASIT, P., WATANABE, Y., KURANE, I., SEKI, T. (2007). Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* **25**, 6646-54.

- SÁENZ, P., QUIOT, L., QUIOT, J.B., CANDRESSE, T., GARCÍA, J.A. (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 278-87.
- SAINSBURY, F., THUENEMANN, E. C., LOMONOSSOFF, G. P. (2009) pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.* **7**, 682-93.
- SANTI, L., GIRITCH, A., ROY, C. J., MARILLONNET, S., KLIMYUK, V., GLEBA, Y., WEBB, R., ARNTZEN, C.J., MASON, H.S. (2006). Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 861-866.
- SARMIENTO, C., GOMEZ, E., MEIER, M., KAVANAGH, T.A., TRUVE, E. (2007). Cocksfoot mottle virus P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Res.* **123**, 95-99.
- SARNOW, P. (1989). Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J. Virol.* **63**, 467-470.
- SATOH, H., MATSUDA, H., KAWAMURA, T., ISOGAI, M., YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, I. T. (2000). Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of Apple chlorotic leaf spot virus fused to green fluorescent protein. *Journal of General Virology* **81**, 2085-2093.
- SATYANARAYANA, T., BAR-JOSEPH, M., MAWASSI, M., ALBIACH-MARTÍ, M.R., AYLLÓN, M.A., GOWDA, S., HILF, M.E., MORENO, P., GARNSEY, S.M., DAWSON, W.O. (2001). Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* **280**, 87-96.
- SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., BOYKO, V. P., ALBIACH-MARTI, MR., MAWASSI, M., NAVAS-CASTILLO, J., KARASEV, AV., DOLJA, V., HILF, ME., LEWANDOWSKI, DJ., MORENO, P., BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, SM., DAWSON, WO. (1999). An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **13**, 7433-7438.
- SAWICKI, S.G., SAWICKI, D.L. (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 215-219.

- SAWICKI, S.G., SAWICKI, D.L. (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol.* **64**, 1050-1056.
- SCHNETTLER, E., HEMMES, H., GOLDBACH, R., PRINS, M. (2008). The NS3 protein of rice hoja blanca virus suppresses RNA silencing in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **89**, 336-340.
- SCHOLTHOF, H.B., MORRIS, T.J., JACKSON, A.O. (1993). The capsid protein gene of tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **6**, 309-322.
- SCOFIELD, S.R., HUANG, L., BRANDT, A.S., GILL, B.S. (2005). Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiol.* **138**, 2165-2173.
- SEGRS, G.C., VAN WEZEL, R., ZHANG, X., HONG, Y., NUSS, D.L. (2006). Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryot. Cell.* **5**, 896-904.
- SHIBOLETH, Y.M., ARAZI, T., WANG, Y., GAL-ON, A. (2001). A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. *J. Biotechnol.* **92**, 37-46.
- SHIH, D.S., DASGUPTA, R., KAESBERG, P., (1976). 7-Methyl-guanosine and efficiency of RNA translation. *J. Virol.* **19**, 637-642.
- SHIMOTOHNO, K., KODAMA, Y., HASHIMOTO, J., MIURA, K.I. (1977). Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**, 2734-2738.
- SHIBOLETH, Y. M., HARONSKY, E., LEIBMAN, D., ARAZI, T., WASSENEGGER, M., WHITHAM, S.A., GABA, V., GAL-ON, A. (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* **81**, 13135-13148.
- SHIVPRASAD, S., POGUE, G. P., LEWANDOWSKI, D. J., HIDALGO, J., DONSON, J., GRILL, L. K., DAWSON, W. O. (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors *Virology* **255**, 312-323.

- SIEGEL, R.W., ADKINS, S., KAO, C.C. (1997). Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promoter by a viral RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11238-11243.
- SIJEN, T., FLEENOR, J., SIMMER, F., THIJSSSEN, K.L., PARRISH, S., TIMMONS, L., PLASTERK, R.H., FIRE, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-476.
- SIJEN, T., STEINER, F.A., THIJSSSEN, K.L., PLASTERK, R.H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**, 244-247.
- SILHAVY, D., MOLNÁR, A., LUCIOLI, A., SZITTYA, G., HORNYIK, C., TAVAZZA, M., BURGYÁN, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**, 3070-3080.
- SIT, T.L., VAEWHONGS, A.A., LOMMEL, S.A. (1998). RNA-mediated transactivation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**, 829-832.
- SIVAKUMARAN, K., CHOI, S.K., HEMA, M., KAO, C.C. (2004). Requirements for brome mosaic virus subgenomic RNA synthesis in vivo and replicase-core promoter interactions *in vitro*. *J. Virol.* **78**, 6091-6101.
- SMITS, S. L., VAN VLIET, A. L., SEGEREN, K., EL AZZOUZI, H., VAN ESSEN, M., DE GROOT, R.J. (2005). Torovirus non-discontinuous transcription: mutational analysis of a subgenomic mRNA promoter. *J. Virol.* **79**, 8275-8281.
- STEINMETZ, N.F., CALDER, G., LOMONOSSOFF, G.P., EVANS, D.J. (2006). Plant viral capsids as nanobuilding blocks: construction of arrays on solid supports. *Langmuir* **22**, 10032-10037.
- STREATFIELD, S.J., HOWARD, J.A. (2003). Plant production systems for vaccines. *Expert. Rev. Vaccines* **2**, 763-75. Review.
- SUOPANKI, J., SAWICKI, D.L., SAWICKI, S.G., KÄÄRIÄINEN, L. (1998). Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J. Gen. Virol.* **79**, 309-319.
- 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.

- TAO, X., ZHOU, X. (2004). A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J.* **38**, 850-860.
- TAVAZZA, M., LUCIOLI, A. CALOGERO, A., PAY, A., TABAZA, R. (1994). Nucleotide sequence, genomic organisation, and synthesis of infectious transcripts from a full-length clone of *Artichoke mottle crinkle virus*. *J. Gen. Virol.* **75**, 1515-1524.
- TAVLADORAKI, P., BENVENUTO, E., TRINCA, S., DE MARTINIS, D., CATTANEO, A., GALEFFI, P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469-72.
- TE, J., MELCHER, U., HOWARD, A., VERCHOT-LUBICZ, J. (2005). Soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virology* **2**, 18.
- TENLLADO, F., BARAJAS, D., VARGAS, M., ATENCIO, F. A., GONZÁLEZ-JARA, P., DÍAZ-RUÍZ, J.R. (2003). Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 149-258.
- THOMAS, C.L., LEH, V., LEDERER, C., MAULE, A.J. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**, 33-41.
- TOYAMA, S., KATOU, H., IMAI, T. (1989). Studies on culture of cells and tissues of crop plants III. Isolation of rice mesophyll protoplasts with a new wall lytic enzyme funclase. *J. Crop Sci.* **58**, 635-640.
- TRINKS, D., RAJESWARAN, R., SHIVAPRASAD, P.V., AKBERGENOV, R., OAKELEY, E.J., VELUTHAMBI, K., HOHN, T., POOGGIN, M.M. (2005). Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* **79**, 2517-2527.
- TSUDA, S., KUBOTA, K., KANDA, A., OHKI, T., MESHII, T. (2007). Pathogenicity of Pepper mild mottle virus Is Controlled by the RNA Silencing Suppression Activity of Its Replication Protein but Not the Viral Accumulation. *Phytopathology* **97**, 412-420.
- TURNAGE, M.A., MUANGSAN, N., PEELE, C.G., ROBERTSON, D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. *Plant J.* **30**, 107-114.

- UNVER, T., BUDAK, H. (2009). Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing. *Method Int. J. Plant Genomics* 2009, 198680.
- VALENTINE, T., SHAW, J., BLOK, V.C., PHILLIPS, M.S., OPARKA, K.J., LACOMME, C. (2004). Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiol.* **136**, 3999-4009.
- VALENTINE, T.A., RANDALL, E., WYPIJEWSKI, K., CHAPMAN, S., JONES, J., OPARKA, K.J. (2007). Delivery of macromolecules to plant parasitic nematodes using a tobacco rattle virus vector. *Plant Biotechnol J.* **5**, 827-834.
- VALLI, A., DUJOVNY, G., GARCÍA, J. A. (2008). Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus. *J. Virol.* **82**, 974-986.
- VALLI, A., LÓPEZ-MOYA, J. J., GARCÍA, J. A. (2009). RNA silencing and its suppressors in the plant-virus interplay. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. J. Wiley & Sons, Ltd, Chichester. In press.
- VAN BOKHOVEN, H., VERVER, J., WELLINK, J., VAN KAMMEN, A. (1993). Protoplasts transiently expressing the 200K coding sequence of cowpea mosaic virus B-RNA support replication of M-RNA. *J. Gen. Virol.* **74**, 2233-2241.
- VAN DER KROL, A.R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J.N., STUITJE, A.R. (1990). Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. *The Plant Cell* **2**, 291-299.
- VAN DER KUYL, A.C., LANGEREIS, K., HOUWING, C.J., JASPARS, E.M., BOL, J.F. (1990). Cis-acting elements involved in replication of alfalfa mosaic virus RNAs in vitro. *Virology* **176**, 346-354.
- VAN DER VOSSSEN, E. A., NOTENBOOM, T., BOL, J. F. (1995). Characterization of sequences controlling the synthesis of alfalfa mosaic virus subgenomic RNA in vivo. *Virology* **212**, 663-672.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J.S., FAUQUET, C.M. (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **78**, 9487-9498.
- VAN MARLE, G., DOBBE, J.C., GULTYAEV, A.P., LUYTJES, W., SPAAN, W. J., SNIJDER, E. J. (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 12056-12061.

- VAN RIJ, R.P., SALEH, M.C., BERRY, B., FOO, C., HOUK, A., ANTONIEWSKI, C., ANDINO, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **20**, 2985-95.
- VAN, W.R., DONG, X., LIU, H., TIEN, P., STANLEY, J., HONG, Y. (2002). Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 203-208.
- VAUCHERET, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant. Sci.* **13**, 350-358. Review.
- VAUCHERET, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**, 759-71. Review.
- VELÁSQUEZ, A.C., CHAKRAVARTHY, S., MARTIN, G.B. (2009). Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis Exp.* **28**, 1292. doi: 10.3791/1292.
- VERDEL, A., JIA, S., GERBER, S., SUGIYAMA, T., GYGI, S., GREWAL, S.I., MOAZED, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- VILLANI, M. E., ROGGERO, P., BITTI, O., BENVENUTO, E., FRANCONI, R. (2005). Immunomodulation of cucumber mosaic virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library. *Plant Mol. Biol.* **58**, 305-316.
- VIVES, M.C., GALIPIENSO, L., NAVARRO, L., MORENO, P., GUERRI, J. (2001). The nucleotide sequence and genomic organization of *Citrus leaf blotch virus*: a candidate type species for a new virus genus. *Virology* **287**, 225-233.
- VIVES, M.C., GALIPIENSO, L., NAVARRO, L., MORENO, P., GUERRI, J. (2002). Characterization of two kinds of subgenomic RNAs produced by *Citrus leaf blotch virus*. *Virology* **295**, 328-336.
- VIVES, M.C., MARTÍN, S., AMBRÓS, S., RENOVELL, A., NAVARRO, L., PINA, J.A., MORENO, P., GUERRI, J. (2008). Development of a full-genome cDNA clone of *Citrus leaf blotch virus* and infection of citrus plants. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 787-797.
- VIVES, M.C., 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. (2005a). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 206-220.
- VOINNET, O. (2005b). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**, 5858-5871.
- VOINNET, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669-87.
- VOINNET, O., LEDERER, C., BAULCOMBE, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
- VOINNET, O., PINTO, M., BAULCOMBE, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 14147-14152.
- VOINNET, O., RIVAS, S., MESTRE, P., BAULCOMBE, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**, 949-956.
- VOINNET, O., BAULCOMBE, D.C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.
- WAGNER, B., FUCHS, H., ADHAMI, F., M. A, Y., SCHEINER, O., BREITENEDER, H. (2004). Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods.* **32**, 227-234.
- WANG, H., HAO, L., SHUNG, C.Y., SUNTER, G., BISARO, D.M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* **15**, 3020-3032.
- WANG, H., BUCKLEY, K.J., YANG, X., BUCHMANN, R.C., BISARO, D.M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* **79**, 7410-7418.
- WANG, J., CARPENTER, C.D., SIMON, A.E. (1999). Minimal sequence and structural requirements of a subgenomic RNA promoter for turnip crinkle virus. *Virology* **253**, 327-336.

- WANG, J., SIMON, A.E. (1997). Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus in vivo and in vitro. *Virology* **232**, 174-186.
- WANG, Q. L., LI, Z.H. (2007). The functions of microRNAs in plants. *Front Biosci.* **12**, 3975-82.
- WANG, S., MORTAZAVI, L., WHITE, K.A. (2008). Higher-order RNA structural requirements and small-molecule induction of tombusvirus subgenomic mRNA transcription. *J. Virol.* **82**, 3864-71.
- WANG, X.H., ALIYARI, R., LI, W.X., LI, H.W., KIM, K., CARTHEW, R., ATKINSON, P., DING, S.W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* **312**, 452-4.
- WASSENEGGER, M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**, 13-6. Review.
- WASSENEGGER, M. , KRCZAL, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**, 142-151. Review.
- WHITE, K.A. (2002). The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology* **304**, 147-54. Review.
- XIE, Z., JOHANSEN, L.K., GUSTAFSON, A.M., KASSCHAU, K.D., LELLIS, A.D., ZILBERMAN, D., JACOBSEN, S.E., CARRINGTON, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**, E104.
- XIE, Z., QI, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants *Biochim. Biophys. Acta.* **1779**, 720-724.
- XOCONOSTLE, B., RUIZ-MEDRANO, R. (2005). Transporte de señales a través del floema en plantas. *BioJournal*, 3.
- XU, W., WHITE, K.A. (2008). Subgenomic mRNA transcription in an aureusvirus: down-regulation of transcription and evolution of regulatory RNA elements. *Virology* **371**, 430-438.
- YAEGASHI, H., TAKAHASHI, T., ISOGAI, M., KOBORI, T., OHKI, S., YOSHIKAWA, N. (2007). Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **88**, 316-324.

- YANG, S.J., CARTER, S.A., COLE, A.B., CHENG, N.H., NELSON, R.S., (2004). A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 6297-302.
- YE, K., PATEL, D.J. (2005). RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* **13**, 1375-1384.
- YELINA, N. E., SAVENKOV, E. I., SOLOVYEV, A. G., MOROZOV, S. Y., VALKONEN, J. P. (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.* **76**, 12981-12991.
- YOO, B. C., KRAGLER, F., VARKONYI-GASIC, E. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979-2000.
- YUANG, X., CAO, Y., XI, D., GUO, L., HAN, C., LI, D., ZHAI, Y., YU, J. (2006). Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of *Beet black scorch virus*. *J. Gen. Virol.* **87**, 3077-3086.
- YUSIBOV, V., METT, V., DAVIDSON, C., MUSIYCHUK, K., GILLIAM, S., FARESE, A., MACVITTIE, T., MANN, D. (2005). Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine* **23**, 2261-2265.
- ZAMORE, P.D., HALEY, B., ZAMORE, P.D., HALEY, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-24.
- ZAVRIEV, S.K., HICKEY, C.M., LOMMEL, S.A. (1996). Mapping of the red clover necrotic mosaic virus subgenomic RNA. *Virology* **216**, 407-410.
- ZHANG, B., PAN, X., COBB, G.P., ANDERSON, T.A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.* **289**, 3-16.
- ZHANG, C., GHABRIAL, S.A. (2006). Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology* **344**, 401-411.
- ZHANG, G., SLOWINSKI, V., WHITE, K.A. (1999). Subgenomic mRNA regulation by a distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. *RNA* **5**, 550-561.
- ZHANG, H., KOLB, F.A., JASKIEWICS, L., WESTHOF, E., FILIPOWICZ, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57-68.

- ZHANG, X., DU, P., LU, L., XIAO, Q., WANG, W., CAO, X., REN, B., WEI, C., LI, Y. (2008). Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* **374**, 351-360.
- ZHANG, X., LAI, M. M. (1994). Unusual heterogeneity of leader-mRNA fusion in a murine coronavirus: implications for the mechanism of RNA transcription and recombination. *J. Virol.* **68**, 6626-6633.
- ZHANG, X., YUAN, Y.R., PEI, Y., LIN, S.S., TUSCHL, T., PATEL, D.J., CHUA, N.H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute 1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**, 3255-3268.
- ZHAO, Y.X., HARRIS, P.J.C., YAO, D.Y. (1995). Plant regeneration from protoplasts isolated from cotyledons of *Sesbania bispinosa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **40**, 119-123.
- ZHOU, Z.S.H., DELL'ORCO, M., SALDARELLI, P., TURTURO, C., MINAFRA, A., MARTELLI, G.P. (2006). Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. *J. Gen Virol.* **87**, 2387-2395.
- ZUKER, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415.
- WANG, D., MACFARLANE, S. A., MAULE, A. J. (1997). Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea. *Virology* **234**, 112-117.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis directores de Tesis por darme la oportunidad de realizar esta tesis y por el apoyo que me han dado en todo momento. En especial a Pepe por su paciencia y buenos consejos, y a M^a Carmen por ayudarme y guiarme en todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio que he tenido la suerte de conocer durante este tiempo y hemos compartido mucho trabajo pero con muchas risas y buen humor: Moni, Juliette, Karelia, Lorena, Susana R., Susana M., Jesús y Mati. En especial a Maru, nuestra técnico, por todos los ánimos que me has dado, tus buenos consejos, tu sentido del humor y ayuda en el trabajo.

A mis vecinos de laboratorio con los que he compartido mucho tiempo, que comidas tan divertidas y que tardes tan interminables eh? A las Leandras: Nuria, Ana, Elsa y Álida, a los genéticos: Jorge y Vero. Al laboratorio de viroides: Nubia, Medhi, Esther y Pedro. A las del piso de abajo: Inma, Diana. Al laboratorio de los franceses: M^a Cruz y Andrés. Y por último, pero no menos importantes, a Giovanni y Maria.

A Pepe Juárez por todo el tiempo que ha perdido con mis fotos. A Reme y en especial a Oscar por la ayuda que me prestaron con los dichosos protoplastos. A Selma, por su generosidad, su tiempo, y sus buenas ideas. A Silvia, siempre me acordaré de esas tardes eternas que hemos compartido en la sala de agroinfiltración. A Edson por su constante buen humor y a Gema por estar siempre dispuesta a ayudar.

A mis doctoras favoritas: Rosa, Lucia y Marta, que hubiéramos hecho si no nos hubiéramos conocido? Como os voy a echar de menos.

A mi hermanos Ali (si no la nombro le da algo), Pablo (ya somos doctores los dos, por fin!) y Luqui (por arreglarme el ordenador día si y día no) por confiar en mi en todo momento. No me olvido de vosotros: Edu, Bego y Sarita. A mis padres, por vuestra

infinita paciencia y apoyo incondicional ante todo. Se lo debo todo a ellos.

A Alberto, por aguantarme, comprenderme, animarme y ayudarme en todo lo que ha podido. Gracias por haberme elegido a mí en esta aventura que no hemos hecho más que empezar.

