



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

**Universidad Politécnica de Valencia**

**Máster en Mejora Genética Vegetal**

**CARACTERIZACIÓN DE UN  
POTENCIAL SUPRESOR DE  
SILENCIAMIENTO DE ARN EN EL  
SUBGRUPO 1 DE LOS ILARVIRUS**

**Alumno: Neiva Cuadrado Cazorla**

**Directores: Carmelo López del Rincón**

**Frederic Aparicio Herrero**

**Valencia, Junio 2017**

## **Agradecimientos**

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han apoyado y han compartido conmigo estos años de Universidad en la Politécnica de Valencia.

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis tutores, Carmelo López del Rincon y Frederic Aparicio Herrero, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, sin sus conocimientos, guía y paciencia esto no hubiera sido posible.

A mis compañeros, quienes a través del tiempo han ido fortaleciendo una amistad, muchas gracias por compartir conmigo esta experiencia. En particular a mi compañera Claudia, con quien he compartido más de cerca esta última etapa, y quien más me ha ayudado en la consecución y elaboración de este proyecto, sin ella muchas cosas me habrían resultado más difíciles.

Por último, quisiera agradecerles a la base de todo, mi familia, en especial a mi padres, hermana y abuela, quienes con sus consejos fueron el motor de arranque y un constante e incondicional apoyo y motivación, muchas gracias por vuestra paciencia y comprensión, y sobre todo por vuestro cariño.

Muchas gracias a todos.

## Resumen

Los virus vegetales son agentes infecciosos que actúan como parásitos intracelulares obligados, ya que sólo pueden replicarse y completar su ciclo de infección dentro de una célula hospedadora adecuada. Las plantas se protegen de su infección mediante una serie de mecanismos de defensa, siendo uno de ellos el del silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS (postranscriptional gene silencing). Como respuesta al silenciamiento de RNA en plantas, los virus han desarrollado estrategias específicas basadas en la utilización de proteínas propias con capacidad de suprimir el silenciamiento. Estas proteínas son diversas en secuencia y origen evolutivo y pueden actuar en diferentes pasos de la ruta de silenciamiento. Son capaces de inhibir la respuesta antiviral del huésped por medio de la interacción con factores clave de la maquinaria de silenciamiento implicados en el reconocimiento de RNA viral, el procesamiento de dsRNAs, el ensamblaje del complejo RISC y la amplificación de señal. De hecho, un virus puede presentar varias proteínas con actividad supresora del silenciamiento de forma que cada una puede afectar a etapas diferentes de la ruta. En algunos virus de la familia *Bromoviridae* se ha encontrado un supuesto gen que codificaría la proteína 2b. En el caso del Cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) se ha comprobado que la proteína 2b se expresa y que dicha proteína interviene en el movimiento sistémico a larga distancia del virus y actúa como supresor del PTGS. Por homología en cuanto a la organización genómica se ha propuesto que esa misma proteína 2b en los miembros del subgrupo 1 de los *Ilarvirus*, debería tener funciones similares. Por tanto, el objetivo general de este Trabajo Final de Máster consiste en determinar la posible función de la proteína 2b del virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV) y del virus de las manchas cloróticas anulares de la zarzamora (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV) como supresora del PTGS a nivel local. Para ello, las ORFs de ambas proteínas se clonaron en plásmidos binarios bajo la expresión del promotor 35S para su expresión transitoria mediante agro-infiltración. Ambas construcciones fueron expresadas en plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c las cuales expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Los resultados obtenidos sugieren que ninguna de estas proteínas tendría actividad de supresión del PTGS, de modo que al contrario que la proteína 2b del CMV, la de los ilarvirus no presentaría actividad de silenciamiento del PTGS a nivel local.

# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Importancia económica del tomate .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Familia <i>Bromoviridae</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Género <i>Ilarvirus</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Virus del moteado de la Parietaria (PMoV). .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. El silenciamiento génico en plantas.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1. Supresores virales del silenciamiento de RNA _____</b>	<b>15</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Materiales y métodos. ....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 materiales.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1. Material vegetal: planta huésped <i>Nicotiana benthamiana</i> _____</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2. Material bacteriano _____</b>	<b>22</b>
<b>3.1.3. Plásmidos _____</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1. Reacción de ligación de DNA _____</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2. Electroporación de plásmidos en <i>E. coli</i> _____</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias _</b>	<b>26</b>
<b>3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa _____</b>	<b>27</b>
<b>3.2.5. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa _____</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6. Purificación de plásmidos recombinantes (minipreps) _____</b>	<b>28</b>
<b>3.2.7. Cuantificación del DNA plasmídico _____</b>	<b>30</b>
<b>3.2.8. Digestión del DNA plasmídico _____</b>	<b>30</b>
<b>3.2.9. Purificación de DNA de una solución _____</b>	<b>30</b>
<b>3.2.10. Secuenciación de ácidos nucleicos _____</b>	<b>30</b>
<b>3.2.11. Análisis informático _____</b>	<b>30</b>
<b>3.2.12. Agroinoculación de plantas _____</b>	<b>31</b>
<b>3.2.12.1. Electroporación de plásmidos en <i>A. tumefaciens</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.12.2. Preparación del inóculo .....</b>	<b>31</b>

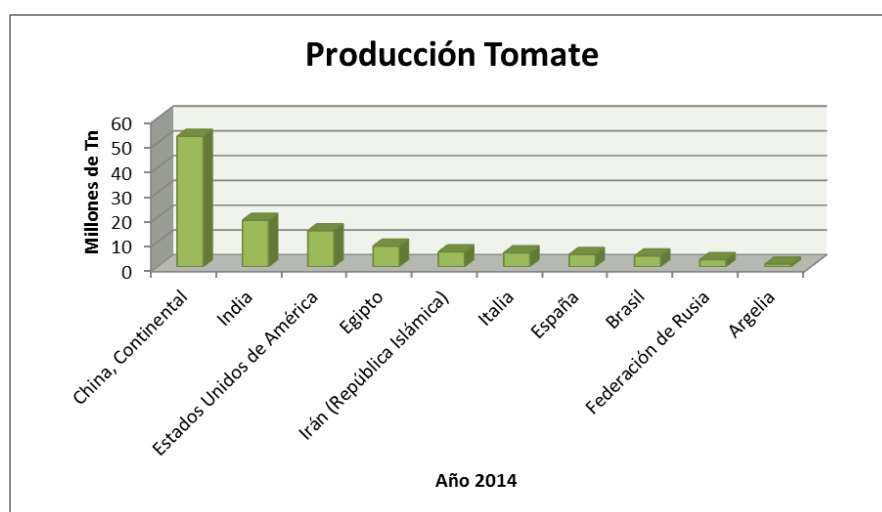
3.2.12.3. Agroinfiltración.....	31
3.2.13. Análisis de proteínas mediante Western blot _____	32
3.2.13.1. Preparación del gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) .....	32
3.2.13.2. Extracción de proteínas totales de plantas agroinfiltradas .....	32
3.2.13.3. Transferencia de las proteínas a membrana .....	33
3.2.13.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a la membrana _____	33
3.2.13.5. Visualización de las proteínas en la membrana .....	34
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>35</b>
4.1. Obtención, clonación y comprobación de la secuencia de DNA del gen que codifica la proteína 2b de TSV y BCRV .....	37
4.2. Subclonación del gen 2b en el vector pSK entre el doble promotor 35S y el terminador popit .....	39
4.3. Subclonación de los casetes de expresión en el vector binario pMOG 800...	42
4.4. Agroinfiltración de los plásmidos pMOG recombinantes en plantas de <i>N. benthamiana</i> . Análisis de la expresión de las proteínas 2b.....	44
4.5. Análisis tipo Western blot. ....	46
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexos. ....</b>	<b>56</b>

# **1 . INTRODUCCIÓN**

# 1. Introducción

## 1.1. Importancia económica del tomate

El tomate (*Solanum Lycopersicum*), miembro de la familia de las *Solanáceas*, genero *Solanum*, es uno de los principales cultivos hortícolas en todo el mundo y el de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Durante el año 2016 la producción española fue de algo más de 5 millones de toneladas (según el MAGRAMA), y ocupando en el año 2014 el puesto 7 entre los países con mayor producción a nivel mundial según la FAO (Figura 1). Dada la importancia económica de este cultivo, se hace más patente el esfuerzo tecnológico en cuanto a identificación y tratamiento de plagas y enfermedades, así como en la producción de semillas resistentes, nutrición y técnicas de cultivo adecuadas a la zona productora.



**Figura 1.** Principales países productores de tomate a nivel mundial, según la FAO, en millones de toneladas, en el año 2014.

El cultivo del tomate se ve fuertemente afectado por enfermedades que reducen considerablemente la producción y calidad, pudiendo llegar a ocasionar la pérdida total del cultivo. Entre las numerosas enfermedades que le afectan, las provocadas por virus se encuentran entre las más importantes ya que no existen medios de lucha contra estas enfermedades (sólo indirectos a través de la lucha contra sus vectores o el manejo de los cultivos).

Los virus vegetales son partículas infecciosas que actúan como parásitos intracelulares obligados ya que solo puedan replicarse y completar su ciclo de infección

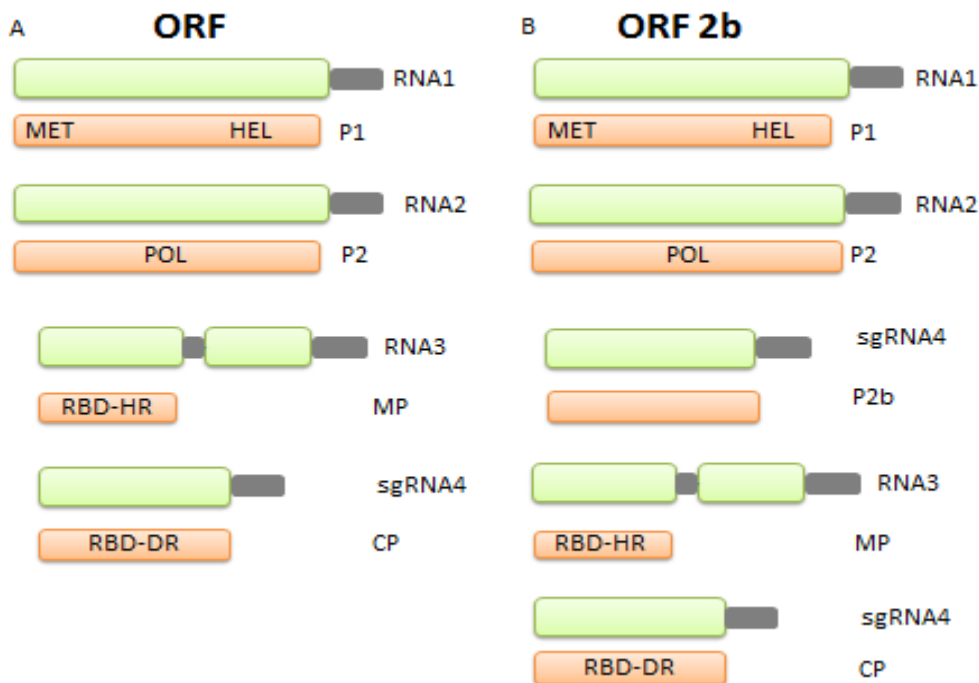
dentro de una célula hospedadora adecuada, causando graves daños al cultivo. El tomate es especialmente sensible a una amplia gama de virus tanto de DNA como de RNA. El cultivo puede ser infectado por un único virus o por varios a la vez por lo que la sintomatología puede ser muy variada y en ocasiones confusa. En España, las infecciones virales que producen o han producido un mayor impacto económico en los cultivos de tomate son: el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), el virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), el virus X de la patata (Potato virus X), el virus del amarilleo clorótico del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV), el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), el virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) y el virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, TTV). Todos ellos pueden causar daños tanto en hojas como en el fruto, reduciendo su rendimiento, e influyendo también en la maduración del fruto o crecimiento de la planta. Además de los virus mencionados anteriormente, también se ha detectado en los cultivos de tomate de diferentes regiones españolas el virus del moteado de la parietaria (*Parietaria mottle virus*, PMoV, género *Ilarvirus*, familia *Bromoviridae*), virus del que se ocupa este proyecto final de Máster.

## **1.2. Familia *Bromoviridae***

Esta familia incluye los géneros *Alfamovirus* y *Anulavirus* con un único miembro y los géneros *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Oleavirus* e *Ilarvirus* con varios miembros cada uno. Los virus de esta familia tienen un genoma de RNA tripartito de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA+). El RNA 1, es monocistrónico y tiene un único marco de lectura abierta (ORF), que codifica la proteína P1. El RNA 2 es también monocistrónico y tiene un ORF, que codifica la proteína P2. La proteína P2 junto con la P1, forman parte del complejo de la replicasa viral. Además, en el extremo 3´terminal del RNA 2 del virus del mosaico del pepino (CMV) y de los miembros del género de los *Ilarvirus*, se ha encontrado un ORF adicional (ORF 2b) que solapa con en el ORF 2 y que codifica la proteína 2b (Figura 2). En el caso del CMV, la proteína 2b interviene en el movimiento sistémico a larga distancia del virus y actúa como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS (Ding et al., 1995; Brigneti et al., 1998; Mayers et al., 2000).



El RNA 3 es bicistrónico y tiene 2 ORFs separados por una región no codificante (IGR). El ORF del extremo 5´terminal codifica la proteína del movimiento viral (MP) y el del extremo 3´terminal codifica la proteína de cubierta (CP). La CP y la proteína 2b se expresan mediante dos RNAs subgenómicos (sgRNA); la CP mediante el sgRNA 4 y la proteína 2b mediante el sgRNA 4A. Los extremos 5´y el 3´ terminales de cada RNA genómico tiene secuencias que no se traducen (NTRs). Además, el extremo 5´terminal de cada RNA presenta una estructura tipo Cap (m7G5ppp) cuya función es protectora. Los 3 RNAs genómicos son encapsidados formando viriones de forma esférica en los géneros *Bromovirus* y *Cucumovirus*, baciliforme en el género *Alfamovirus*, y esférica o isométrica en los géneros *Oleavirus* e *Iarvirus*, aunque también hay viriones baciliformes en los dos últimos géneros (Bol, 1999).



**Figura 2.** Organización genómica de los virus pertenecientes a la familia *Bromoviridae*. El panel A muestra el esquema de los miembros que no presentan en su genoma el ORF 2b, mientras que el panel B muestra el esquema de los que sí contienen el ORF 2b en la parte 3´terminal de RNA 2. Los diferentes ORFs se representan en color verde y las proteínas que codifican (P1, P2, 2b, MP y CP) en color naranja. Cada segmento de RNA contiene una estructura tipo Cap en el extremo 5´terminal. Las proteínas 2b y CP se expresan a través de dos RNAs subgenómicos, sgRNA 4A y sgRNA 4, respectivamente. En color gris se representan las regiones genómicas no traducidas. En las proteínas se señalan los diferentes dominios conservados: Metiltransferasa (MET), Helicasas (HEL), RNA polimerasa dependiente de RNA (POL), Dominio de Unión al RNA (RBD), Región Hidrofóbica (HR), y la Región de Dimerización (DR).

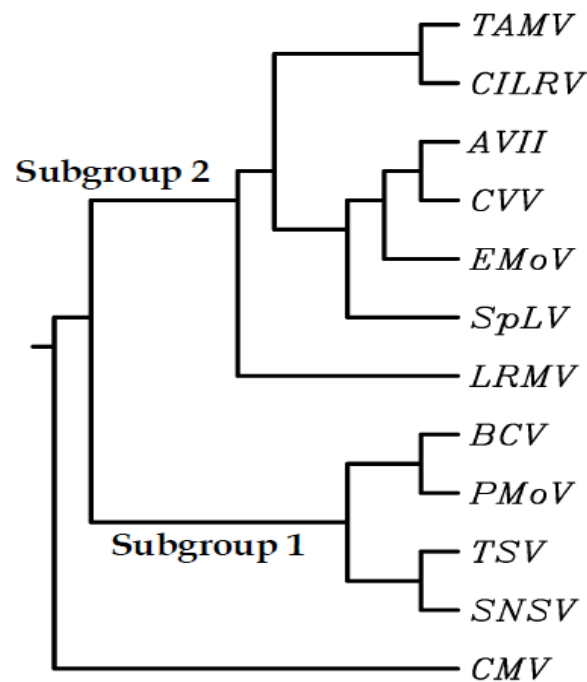
### 1.3. Género *Ilarvirus*

El género *Ilarvirus* está compuesto por 19 especies según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2013), incluidos en 4 subgrupos (Tabla 1). La extrema labilidad de sus partículas virales y la naturaleza leñosa de las plantas hospedadoras de la mayoría de ellos ha dificultado su purificación, manipulación y transmisión mecánica a hospedadores herbáceos experimentales lo que ha obstaculizado enormemente los estudios dirigidos a conocer sus propiedades estructurales y funcionales (Pallás et al., 2013). Sin embargo, el PMoV es un virus del género *Ilarvirus* cuyos huéspedes son herbáceos.

**Tabla 1.** Clasificación de los virus pertenecientes al género *Ilarvirus*, según el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV 2013). Las especies de virus incluidos dentro del género en el 2014 pero que no han sido asignadas aun ningún grupo se marcan con un asterisco (\*).

<b>Subgrupo 1</b>	
Virus del moteado de la parietaria	<i>Parietaria mottle viurs. PMoV</i>
Virus de la mancha clorótica anular de zarzamora	<i>Blackberry chlorotic ringspot virus. BCRV</i>
Virus shock necrótico de la fresa	<i>Strawberry necrotic shock virus. SNSV</i>
Virus del estriado del tabaco	<i>Tobacco streak virus. TSV</i>
<b>Subgrupo 2</b>	
Virus 2 del espárrago	<i>Asparagus virus 2. AV2</i>
Virus del arrugamiento de la hoja de los cítricos	<i>Citrus leaf rugose virus. CLRV</i>
Virus del variegado de los cítricos	<i>Citrus variegation virus. CVV</i>
Virus del moteado del olmo	<i>Elm mottle virus. EMoV</i>
Virus de la mancha anular de la lila	<i>Lilac ring mottle virus. LRMV</i>
Virus latente de la espinaca	<i>Spinach latent virus. SpLV</i>
Virus del mosaico de la manzana tularé	<i>Tulare Apple mosaic virus. TAMV</i>
<b>Subgrupo 3</b>	
Virus de las hojas cloróticas de la lila	<i>Lilac leaf chlorosis virus. LLCV</i>
Virus del mosaico de la manzana	<i>Apple mosaic virus. ApMV</i>
Virus del shock del arándano	<i>Blueberry shock virus. BShV</i>
Virus de los anillos necróticos de Prunus	<i>Prunus necrotic ringspot virus. PNRSV</i>
<b>Subgrupo 4</b>	
Virus latente de <i>Fragaria chiloensis</i>	<i>Fragaria chiloensis latent virus. FCILV</i>
Virus del enanismo del ciruelo	<i>Prune ..... Virus. PDV</i>
<b>Virus incluidos en el 2013</b>	
Virus latente de <i>Humulus japonicus</i> *	<i>Humulus japonicus latent virus. HJLV</i>
Virus de los arabescos del ciruelo*	<i>American plum line pattern virus. APLPV</i>

En los miembros de los subgrupos 1 y 2 se ha descrito la presencia del sgRNA 4A derivado de RNA 2, habiéndose detectado su presencia en plantas infectadas con PMoV y con el virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV) (Xin et al., 1998; door Peeters, 2009). Además, en el caso del SpLV se ha podido sintetizar *in vitro* la proteína 2b, aunque hasta la fecha ésta no ha podido ser detectada en plantas infectadas (Xin et al., 1998) y por homología de secuencia con la proteína 2b del CMV se ha especulado que podría estar implicada en el movimiento sistémico del virus (Xin et al., 1998; Guo y Ding, 2002). Por otro lado, la proteína 2b del virus 2 del espárrago (*Asparagus virus 2*, AV2) se ha comprobado que puede actuar como supresor del silenciamiento génico a nivel sistémico, pero no a nivel local (Shimura et al., 2013). También algunos miembros del subgrupo 4 presentan un segundo ORF en el RNA 2, pero a diferencia de lo que sucede con CMV y los miembros de los subgrupos 1 y 2, este se encuentra en el extremo 5´terminal (Tzanetakis y Martin, 2005). En la Figura 3 se muestra el árbol filogenético basado en la supuesta secuencia de aminoácidos de la proteína 2b de los aislados de los subgrupos 1 y 2.



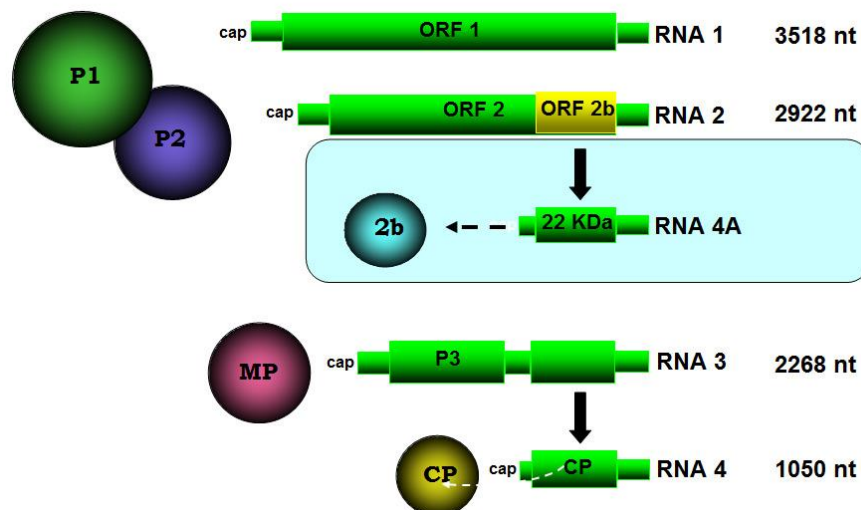
**Figura 3.** Árbol filogenético de los subgrupos 1 y 2 de los *Ilarvirus* basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína 2b.

A partir del sgRNA 4 se sintetiza la CP que además del papel estructural de dicha proteína, en los miembros de este género desempeña un papel esencial en el proceso de infección. Para empezar la infección se requiere la unión de la CP a los extremos 3´del

RNA del inoculo, este proceso se llama “activación del inóculo”. En la mayoría de los virus de RNA de plantas, existe una cola de poli-A o una estructura similar a un tRNA (TLS) que se encuentra en la región 3’ no traducida (3’ NTR), pero en los *Ilarvirus* las 3 regiones 3’ NTR se pliegan formando una estructura con varios lazos y tallos flanqueados por secuencias no apareadas, con sitios de unión específicos para la CP (Bol, 2005). Los 3’ NTR adoptan una estructura terciaria alternativa parecida a un TLS, a través de la formación de un pseudonudo. Este cambio de forma es desencadenado por la CP y constituye un mecanismo regulador en su ciclo vital (Olsthoorn et al., 1999; Aparicio et al., 2003).

#### 1.4. Virus del moteado de la Parietaria (PMoV).

Aunque los *Ilarvirus* se encuentran frecuentemente infectando huéspedes leñosos, PMoV se detectó por primera vez en Italia en el año 1989 infectando plantas de parietaria (*Parietaria officinalis*) que mostraban síntomas de mosaico amarillo o “mottling” (Caciagli et al., 1989). Posteriormente, se aisló de plantas de tomate un virus con la misma organización genómica (Figura 4) y biológicamente y serológicamente relacionado con PMoV, denominado inicialmente "tomate Ilarvirus 1" (TI-1) y más tarde PMoV-T (cepa de PMoV de tomate) (Lisa et al., 1998).



**Figura 4.** Representación esquemática de la organización y expresión del genoma PMoV-T. Las subunidades P1 y P2 son traducidas a partir de los RNA genómicos 1 y 2, respectivamente. La proteína de movimiento (MP) se traduce a partir del RNA genómico 3. La proteína de cubierta (CP) y la proteína 2b se traducen a partir de los RNA subgenómicos 4 y 4A, respectivamente. (Figura basada en Hong-Wu et al., 1998).

En estos últimos años, el virus ha sido detectado en cultivos de tomate y pimiento en diferentes países del Mediterráneo, particularmente en España, Italia, Francia y Grecia (Marchoux et al., 1999; Roggero et al. Al., 2000; Aramburu, 2001; Janssen et al., 2005). La propagación de PMoV probablemente sea mayor de la observada debido a que su presencia podría estar pasando inadvertida, ya que la sintomatología que produce tiene gran similitud con la que desencadenan otros virus como el CMV, el TSWV o el virus del torrado del tomate (ToTV)

Las plantas infectadas con PMoV muestran un mosaico necrótico en las hojas que se extiende por el tallo y el ápice. Después de las primeras etapas de la infección, aparecen nuevos brotes asintomáticos, y finalmente las plantas muestran nuevamente síntomas de mosaico necrótico, pudiendo provocar incluso la muerte de la planta. Los frutos de plantas afectadas muestran anillos acolchados y parches marrones, que se convierten en cicatrices necróticas (Figura 5).



**Figura 5.** A) Sintomatología en fruto de tomate, B) Sintomatología en brote y ápice

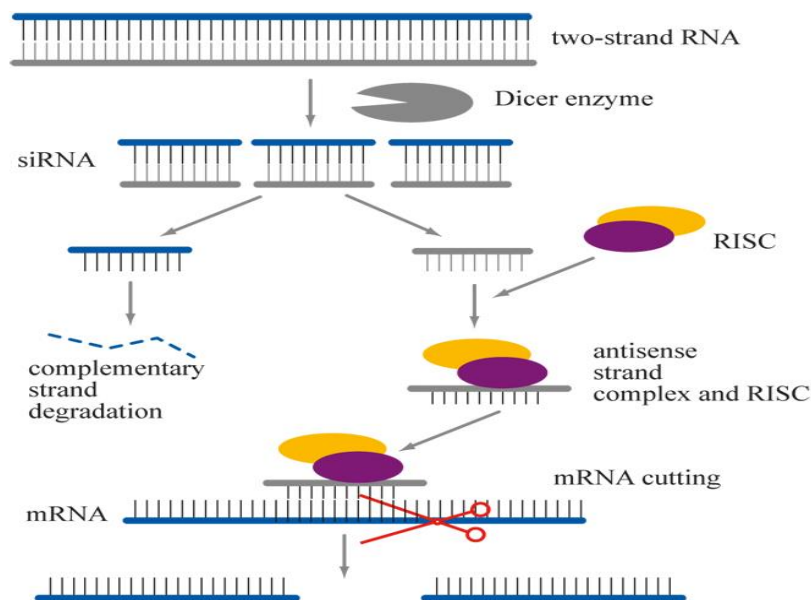
Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo preciso de la diseminación de PMoV en condiciones de campo, todos los resultados publicados hasta la fecha indican que el polen de plantas infectadas de *P. officinalis* sirve como fuente para la propagación del virus a otras especies vegetales (Aramburu et al., 2010). En las plantas de *P. officinalis* infectadas hay transmisión por semilla, lo que permite el mantenimiento de la infección en campo a lo largo del tiempo. Además, el PMoV puede transmitirse con éxito mediante inoculación mecánica a una amplia gama de huéspedes, aunque la eficiencia de transmisión mecánica en plantas de tomate no es muy eficaz (Aramburu et al., 2010).

## 1.5. El silenciamiento génico en plantas

Cierto tipo de moléculas de RNA pueden regular la expresión de algunos genes, este fenómeno conocido como interferencia de RNA (RNAi) es un mecanismo, evolutivamente conservado en eucariotas, utilizado para suprimir o “silenciar” la expresión de determinados genes. El silenciamiento génico desempeña un papel muy importante en diversos procesos biológicos, tales como el mantenimiento de la integridad del genoma, la regulación de procesos del desarrollo y/o la defensa frente a ácidos nucleicos invasores, tales como transgenes, transposones y virus (Voinnet, 2001; Vaucheret, 2006; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009). El mecanismo actúa de manera específica de secuencia por medio de pequeños RNAs de 20 a 40 nucleótidos (nt) de longitud (short interfering RNAs, siRNAs) que pueden operar a varios niveles, bien por represión transcripcional asociada con la metilación de regiones promotoras (*transcriptional gene silencing*, TGS), o por regulación post-transcripcional asociada con la inactivación o degradación de transcritos (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) o por represión traduccional (Kim, 2003; Adenot *et al.*, 2006; Sen and Blau, 2006; Minois *et al.*, 2010).

El silenciamiento por RNA se induce por la presencia de moléculas de RNAs de doble cadena (dsRNA, double strand RNA) que podrían derivar de la replicación viral, de repeticiones invertidas, de la transcripción convergente de transgenes y transposones, de locis endógenos con una alta estructura secundaria, o bien generarse por la acción de RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR) a partir de RNAs de cadena sencilla (ssRNA, single strand RNA). Las moléculas de dsRNA son procesadas por RNAsas de tipo III (Dicer) denominadas en planta DCLs (Dicer-like), en pequeños RNAs (sRNAs, small RNAs) de doble hebra de entre 19 y 25 nt que presentan 2 o 3 nt protuberantes en el extremo 3' de ambas cadenas (Elbashir *et al.*, 2001). DCL requiere de la acción de una DRB (dsRNA binding protein), para que el procesamiento del dsRNA se produzca de un modo preciso y eficiente (Hiraguri *et al.*, 2005; Eamens *et al.*, 2012 a, b). La metilación de los sRNAs generados mediada por la metil transferasa HEN1 (Boutet *et al.*, 2003), los protege de la degradación. Una de las hebras del sRNA es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA denominado RISC (RNA induced-silencing complex) que contiene, entre otros componentes, una endonucleasa llamada Argonauta (AGO). Una vez ensamblado, en el caso del PTGS, este complejo es guiado por el sRNA hasta un mRNA diana de secuencia complementaria al que se une

induciendo la inhibición de su traducción o su degradación. En plantas, el silenciamiento inducido en una célula puede moverse célula a célula y a largas distancias alcanzando tejidos distales. Así, si la señal de silenciamiento se propaga de un modo más rápido del que lo hace el virus, los tejidos distales estarán alertados y de este modo tendrán la capacidad de resistir a la invasión viral (Ding y Voinnet, 2007). En el TGS, el complejo es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une, induciendo su metilación y bloqueando su transcripción. Existe un proceso de amplificación de la señal de silenciamiento mediado por RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR), que resulta en la generación de nuevas moléculas de dsRNA que son procesadas en sRNAs secundarios (Figura 6).

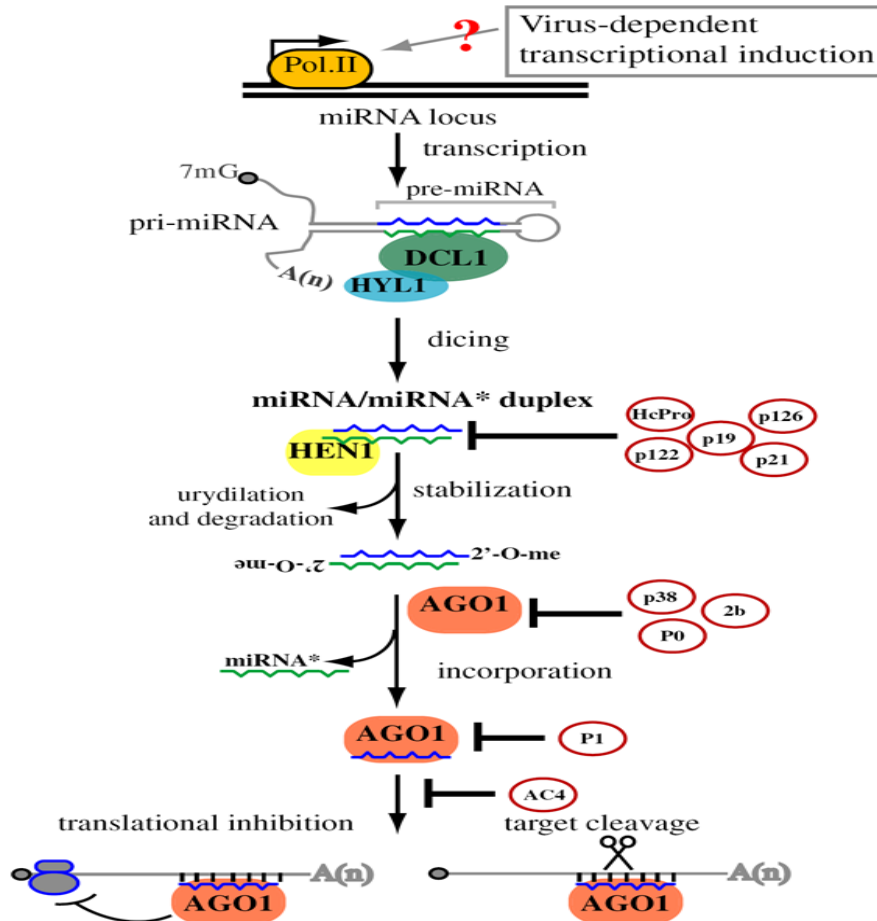


**Figura 6.** Modelo simplificado de silenciamiento de RNA en plantas. El silenciamiento se induce por la presencia de dsRNAs procedentes de la replicación de virus de RNA, virus de DNA, transgenes etc. El dsRNA es cortado por Dicer en pequeños RNAs de interferencia (siRNA) que se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y lo guían a mRNAs de secuencia homóloga, degradándolo y generando más siRNAs. Los siRNAs pueden moverse sistemáticamente y causar silenciamiento sistémico. Además, algunos siRNAs pueden mediar en la metilación del DNA.

### 1.5.1. Supresores virales del silenciamiento de RNA

Como respuesta al silenciamiento de RNA en plantas, los virus han desarrollado estrategias específicas basadas en la utilización de proteínas propios con capacidad de suprimir el silenciamiento. Estas proteínas supresoras del silenciamiento de plantas son diversas en secuencia y origen evolutivo y pueden actuar en diferentes pasos de la ruta

de silenciamiento. Son capaces de inhibir la respuesta antiviral del huésped por medio de la interacción con factores clave de la maquinaria de silenciamiento implicados en el reconocimiento de RNA viral, el procesamiento de dsRNAs, el ensamblaje del complejo RISC y la amplificación de señal (Figura 7).



**Figura 7.** Actividad de los supresores virales del silenciamiento por RNA Las proteínas supresoras del silenciamiento virales que se representan con círculo rojo puede actuar bloqueando el silenciamiento mediado por dsRNAs, en distintos pasos de la ruta. HCPro del TEV (género *Potyvirus*), p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV género *Tombusvirus*), p126 y p122 del TMV (género *Tobamovirus*), P0 del virus del amarillo de la remolacha occidental (*Beet western yellows virus*, BWYV género *Polerovirus*), p38 del virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV género *Carmovirus*), 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV género *Cucumovirus*), P1 del virus del moteado suave del batata (*Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV género *Ipomovirus*). AC4 del virus del mosaico de la yuca africana (*African cassava mosaic virus*, ACMV género *Begomovirus*), p21 del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellow virus*, BYV género *Closterovirus*). Tomado de Shimura y Pantaleo, 2011.



De hecho, un virus puede presentar varias proteínas con actividad supresora del silenciamiento de forma que cada una puede afectar a etapas diferentes de la ruta de silenciamiento (Csorba *et al.*, 2015). La mayoría de las proteínas con actividad supresora del silenciamiento identificadas son multifuncionales ya que además actúan como proteínas de cubierta, replicasas, proteínas de movimiento, factores implicados en la transmisión o reguladores transcripcionales (Roth *et al.*, 2004; Burgyan and Havelda, 2011; Wang *et al.*, 2012). En otras ocasiones esas proteínas se caracterizaron inicialmente como determinantes de patogenicidad y virulencia al estar relacionadas con la aparición de síntomas durante la infección viral (Garcia and Pallas, 2015). Las proteínas supresoras del silenciamiento más estudiadas son la proteína 2b del CMV y HC-Pro de potyvirus.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. Objetivos.

Como se ha comentado en la introducción, en el extremo 3´terminal del RNA 2 de algunos virus de la familia *Bromoviridae* se ha encontrado un ORF adicional (ORF 2b) que solapa con el ORF 2 y que codificaría la proteína 2b. En el caso del cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) se ha comprobado que la proteína 2b se expresa a partir del RNA subgenómico 4A (sgRNA4) y que dicha proteína interviene en el movimiento sistémico a larga distancia del virus y actúa como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS.

Por homología en cuanto a la organización genómica se ha propuesto que esa misma proteína 2b en los miembros de los *Ilarvirus* (subgrupos 1 y 2), debería tener funciones similares. En el caso de los virus del subgrupo 1, se ha detectado la presencia del sgRNA 4A en plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas con PMoV, pero no la proteína 2b. Además, en experimentos de expresión transitoria de la proteína 2b, realizados en nuestro grupo con plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c (expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente oGFP), se comprobó la expresión de la proteína, pero ésta no actuaba como supresor del silenciamiento génico a nivel local ni sistémico.

Por ello, el objetivo general de este Trabajo Final de Máster consiste en realizar experimentos similares con la proteína 2b de otros dos virus del subgrupo 1: el virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV) y el virus de las manchas cloróticas anulares de la zarzamora (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV). La realización de estos experimentos nos permitirá determinar el papel de la proteína 2b de este subgrupo 1 en relación con la actividad supresora del PTGS a nivel local. Como objetivos parciales destacan:

1- Clonación del ORF 2b de los virus TSV y BCRV en el vector de expresión derivado del plásmido pMOG.

2- Agroinoculación de plantas de *N. benthamiana* 16c y determinar si la proteína 2b desempeña alguna función en la supresión del silenciamiento génico a nivel local.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1 materiales

##### 3.1.1. Material vegetal: planta huésped *Nicotiana benthamiana*

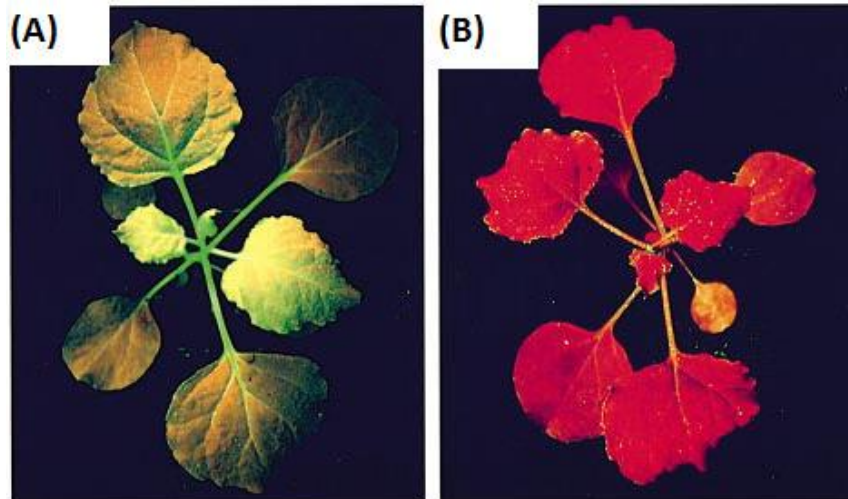
*N. benthamiana* (Figura 8) es un organismo modelo de investigación con plantas debido a su fácil cultivo y a la facilidad de agroinfiltración.



**Figura 8.** *Nicotiana benthamiana* planta y hoja.

Las plantas 16c empleadas en la realización de estos experimentos son plantas transgénicas que expresan de forma constitutiva el mRNA de la proteína verde fluorescente (green fluorescent protein, GFP), una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible tras ser irradiada con luz ultravioleta (UV) (Figura 9). Para este trabajo se emplearon plantas de *N. benthamiana* 16c en estadio de desarrollo de 4 a 6 hojas. Las plantas se cultivaron en macetas de 9 cm de diámetro con una mezcla de turba y vermiculita. Se mantuvieron en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones:

- Régimen térmico de 22°C/20°C (día/noche).
- Humedad relativa de 60-65%/95-100% (día/noche).
- Fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con una irradianza de 65-85  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  suministrada por tubos fluorescentes con un intervalo de longitud de onda de entre 400-700 nm.



**Figura 9.** (A) Expresión de GFP en plantas de *Nicotiana benthamiana*. (B) plantas de *N. benthamiana* silvestres. En ambos casos las plantas son iluminadas con luz UV (Brigneti et al., 1998).

### 3.1.2. Material bacteriano

La bacteria empleada para la amplificación de los plásmidos fue la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, mientras que para el proceso de agroinfiltración se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

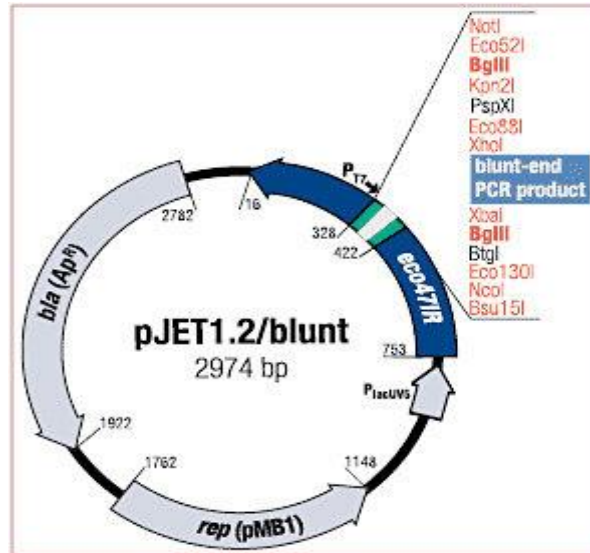
### 3.1.3. Plásmidos

Los plásmidos que se usaron en el desarrollo del trabajo fueron pJET1.2/blunt, pKSmyc y pMOG 800.

El plásmido pJET1.2/Blunt de Fermentas (figura 10) se usó como plásmido intermedio en el proceso de clonación y amplificación del gen 2b de los virus TCV y BCRV. La síntesis del gen fue encargada a la empresa Thermo Scientific al inicio del proyecto y clonado en pJET1.2/blunt.

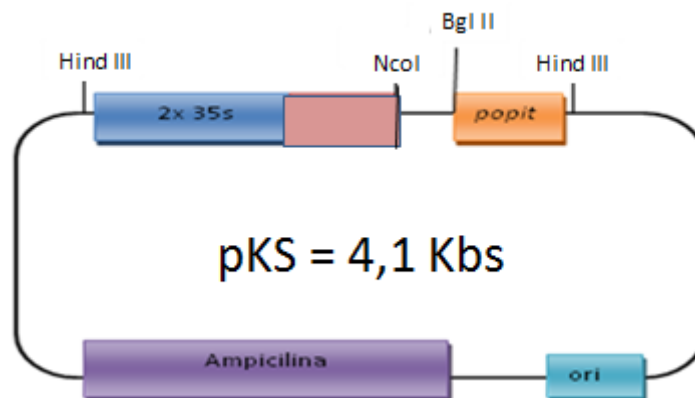
El plásmido contiene un origen de replicación para *E. coli*, resistencia a ampicilina y un sistema de selección bajo un gen letal que facilita la identificación de las colonias recombinantes. El plásmido viene preparado para proceder a la ligación del fragmento de DNA de interés. Tras la ligación el gen letal se interrumpe y sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes podrán formar colonias. Las moléculas de vector pJET1.2/blunt en las que no se produce la ligación expresarán la enzima letal provocando la muerte de las bacterias después de la transformación. Esta selección

positiva acelera el proceso de identificación de colonias y elimina los costes adicionales necesarios para la selección de color azul/blanco presentes en otros vectores de clonación.



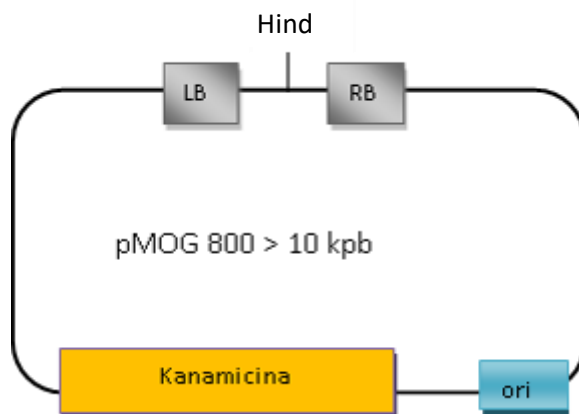
**Figura 10.** Representación esquemática del plásmido pJET1.2/blunt de Fermentas.

El plásmido pKSmyc (figura 11) contiene un MCS (sitio de clonación múltiple) entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) duplicado y el terminador *popit* del gen que codifica el inhibidor II de la proteasa de patata (*Solanum tuberosum*). El plásmido posibilita la clonación de los diferentes genes empleados en este trabajo. El plásmido contiene también un origen de replicación para *E. coli* y resistencia a ampicilina.



**Figura 11.** Representación esquemática del vector intermedio pKS. Consta de un origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina y las secuencias del promotor 35S duplicado y del terminador *popit*, flanqueados por los sitios de restricción *Hind*III. Se indican los puntos de corte de las enzimas *Nco*I y *Bgl* II para facilitar el proceso de clonación.

El plásmido pMOG 800 (figura 12) es un plásmido binario que posibilita la clonación de los diferentes genes entre los bordes izquierdo y derecho del plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Además, presenta resistencia a kanamicina y un origen de replicación de amplio espectro que permite su replicación tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*.



**Figura 12.** Representación esquemática del vector binario de expresión pMOG 800. Consta de un origen de replicación, un gen de resistencia a kanamicina y los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Se indica el sitio de restricción *Hind*III para facilitar el proceso de clonación.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Reacción de ligación de DNA

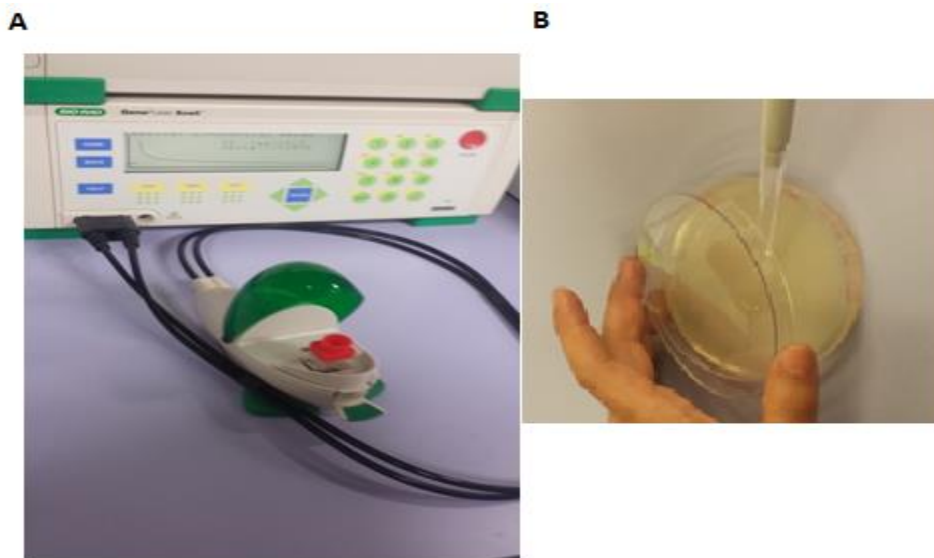
Esta reacción permite insertar un fragmento de DNA en un vector de clonación o circularizar un plásmido previamente linealizado. En los casos de ligación inserto:vector se trató de mantener una relación molar 4:1. El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ l o 20  $\mu$ l dependiendo del volumen de inserto y vector que se utilizó. Se añadió 1  $\mu$ l (si el volumen final era de 10  $\mu$ l) o 2  $\mu$ l (si el volumen final era de 20  $\mu$ l) del tampón de la T4 DNA ligasa (x10). Seguidamente, se adicionó 1  $\mu$ l de la enzima T4 DNA ligasa (5 U/ $\mu$ l) (Fermentas) y el volumen de agua necesario para alcanzar el volumen final. La reacción se incubó durante 1-2 h a 22°C.

### 3.2.2. Electroporación de plásmidos en *E. coli*

En este caso la transformación de las células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se realizó mediante electroporación. Esta técnica consiste en someter las células a un pulso eléctrico que da lugar a la apertura de poros en la membrana plasmática bacteriana, permitiendo la entrada del plásmido a su interior.

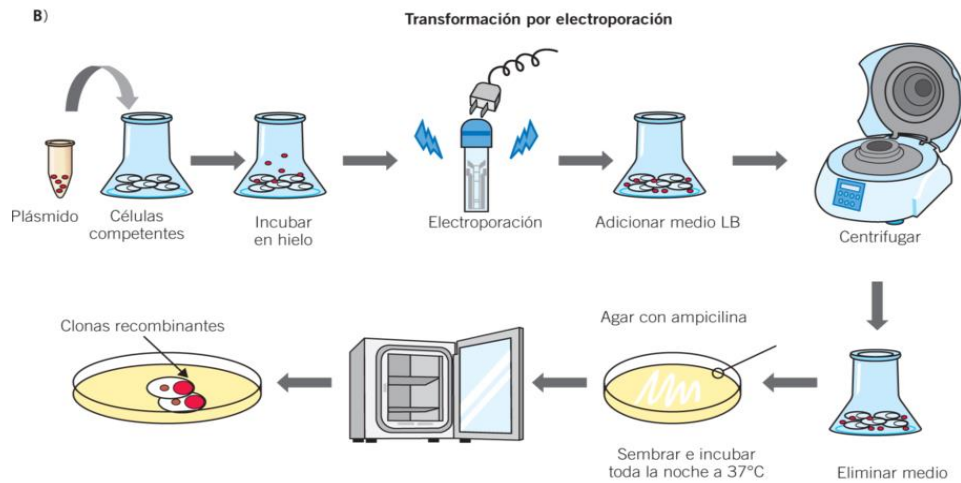


Se partió de alícuotas de células electrocompetentes congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se mezclaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, 50  $\mu\text{l}$  de células competentes (una vez descongeladas) con 2-3  $\mu\text{l}$  del plásmido de interés. Posteriormente, la mezcla de plásmido y células se introdujo en una cubeta de electroporación atemperada sobre hielo. Se secaron los electrodos de la cubeta y se situó en el electroporador (BTX ECM399) (Figura 13). Se le sometió a un pulso eléctrico (1500 V durante 5 ms). Tras la aplicación del pulso se pipeteó rápidamente sobre la cubeta de electroporación 500  $\mu\text{l}$  de solución SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , ajustado todo ello a pH 7 con NaOH). La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h.



**Figura 13.** A) Electroporador, B) siembra en placas.

Tras la incubación se sembraron las bacterias en medio LB con agar en presencia de ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para asegurar que se conseguían colonias aisladas, el total de células se repartió en dos placas. En una de ellas se sembraron 50  $\mu\text{l}$  y en la otra el resto del cultivo. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que crecieran las colonias (figura 14).



**Figura 14.** Proceso de electroporación.

### 3.2.3. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias

En todos los casos la identificación de las colonias recombinantes se realizó mediante PCR. En función de los cebadores empleados la técnica permite identificar tanto las colonias recombinantes como la orientación del inserto clonado. La reacción típica de PCR de colonias se realizó en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo los siguientes reactivos:

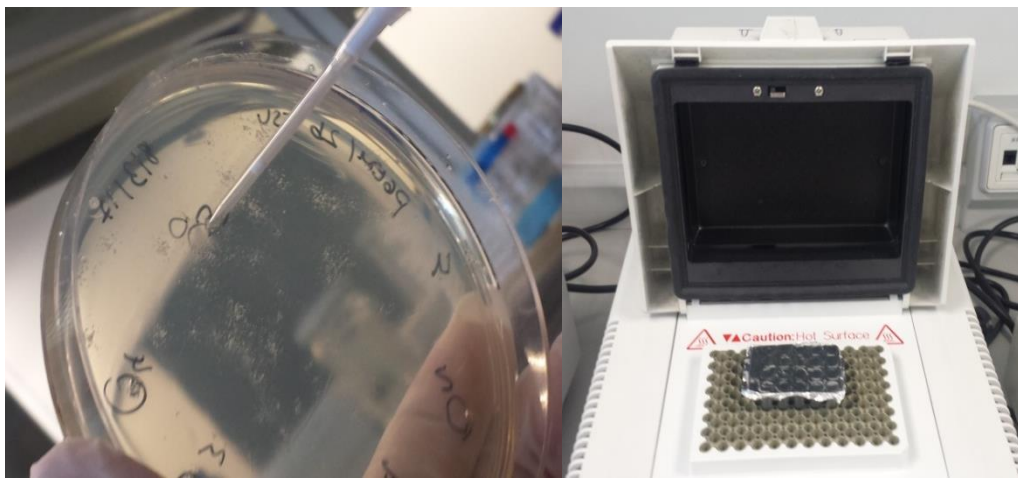
1. H <sub>2</sub> O	6,8 $\mu\text{l}$
2. Tampón 10 x	1 $\mu\text{l}$
3. MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,4 $\mu\text{l}$
4. dNTPs (10 mM)	0,2 $\mu\text{l}$
5. Cebador directo (10 mM)	0,2 $\mu\text{l}$
6. Cebador reverso (10 mM)	0,2 $\mu\text{l}$
7. Taq DNA polimerasa (1 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$
8. Colonia de bacterias	1 $\mu\text{l}$

En cada tubo de PCR se añadió 1  $\mu\text{l}$  de la colonia de bacterias a analizar (previamente la colonia se había diluido en 10  $\mu\text{l}$  de agua) mezclando la solución por pipeteo hacia arriba y abajo varias veces. La desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94°C durante 5 minutos, siendo las condiciones de los 30 ciclos las siguientes:

Desnaturalización:	94°C	15 s
Hibridación:	55°C	15 s
Extensión:	72°C	30s a 2 min

Para finalizar, tuvo lugar una extensión final de 5 minutos a una temperatura de 72°C.

El tiempo de extensión de la PCR varió en función del tamaño de DNA amplificado y para el cálculo se considera que la Taq DNA polimerasa incorpora 1000 nt por cada min de extensión (figura 15).



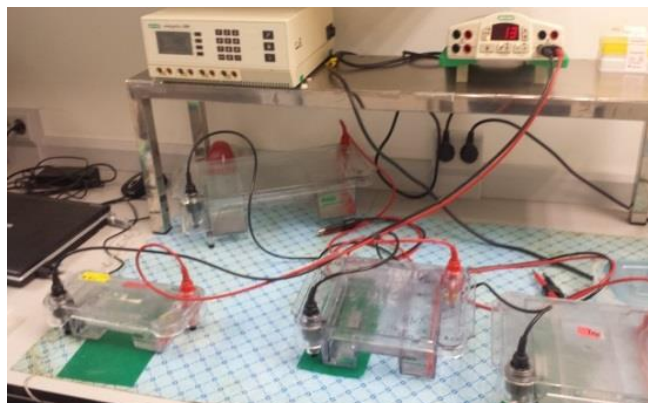
**Figura 15.** Selección de colonias y termociclador.

### 3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar los fragmentos de DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (figura 16). La agarosa se preparó añadiendo 0,8g de agarosa a 100 ml TAE x 1 (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA) y calentando la mezcla hasta su disolución. Una vez preparado el gel, a las muestras se les añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga LB (x10) (50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0,0025% azul de bromofenol y 0,0025% xilencianol) y se cargaron en los pocillos.

El DNA separado en el gel se detectó mediante tinción con bromuro de etidio y observación bajo luz ultravioleta. El gel se tiñó colocándolo en una cubeta de plástico con agua y bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15-20 minutos a temperatura ambiente y visualizándose posteriormente en un transiluminador (BIORAD) bajo luz

UV. Para determinar el tamaño de cada fragmento se emplearon el marcador de tamaños de DNA GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus.



**Figura 16.** Cubetas y fuentes de Electroforesis.

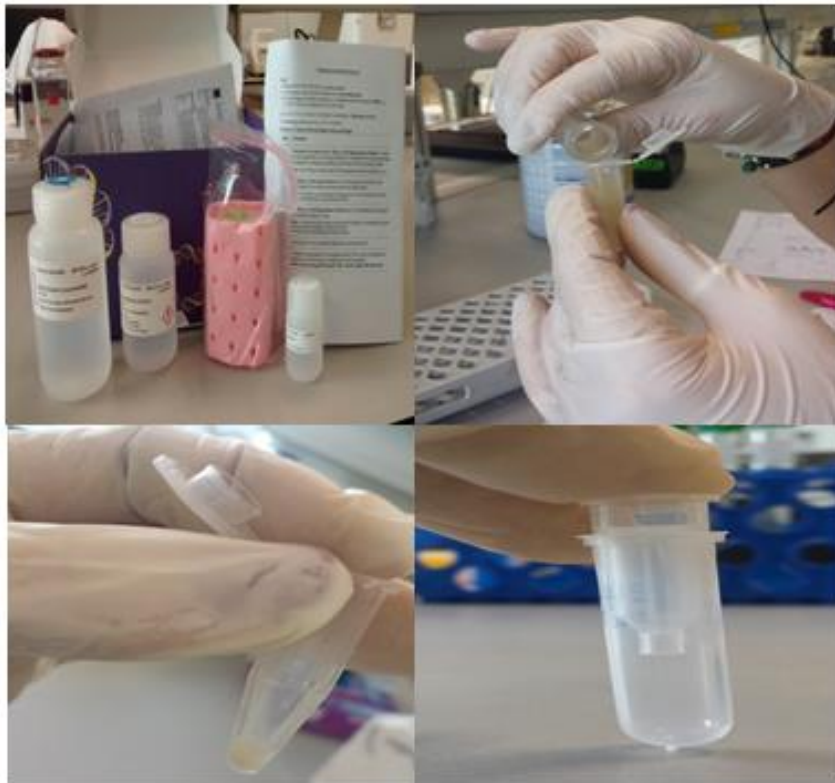
### **3.2.5. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa**

Para la purificación de los fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se utilizó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El kit permite obtener altas concentraciones de DNA puro para su utilización en reacciones posteriores. Los fragmentos de gel con los DNAs deseados se cortaron con un bisturí bajo luz ultravioleta y se colocaron en tubos Eppendorf. Se pesaron y se añadieron tres volúmenes de tampón de disolución de agarosa (Buffer QG) por volumen de gel. Se incubó a 50°C durante 5-10 min hasta que el fragmento de gel quedó totalmente disuelto y se traspasó la mezcla a una columna de gel de sílice colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se descartó el filtrado. Después se procedió al lavado de la columna añadiendo 0,75 ml de tampón de lavado (Buffer PE), centrifugando 1 min a 13.000 rpm y retirando el filtrado. Se volvió a centrifugar 1 min a 13.000 rpm para dejar completamente seca la columna y se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf. Por último, el DNA retenido en la columna se eluyó en un volumen adecuado de agua (30-50  $\mu$ l), incubando durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugando 1 min a 13.000 rpm. La cantidad de agua en la que se eluyó depende del volumen de eluido requerido para los pasos posteriores.

### **3.2.6. Purificación de plásmidos recombinantes (minipreps)**

La purificación de los plásmidos presentes en la bacteria (*E. coli*) se llevó a cabo según el protocolo GeneJET Plasmid Miniprep kit de Thermo Scientific (figura 17). Previamente, las bacterias que habían dado resultado positivo tras la PCR de las

colonias, se habían crecido a 37°C durante alrededor de 18 horas en medio líquido de LB con el antibiótico correspondiente. Se partió de 3 ml de cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min y el sedimento (células bacterianas) se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión conteniendo RNAsa A (0,1 mg/ml). Se agitó con el vórtex hasta resuspenderlo totalmente y seguidamente se añadieron 250 µl de solución de lisis celular. Se mezcló por inversión (más de 10 veces) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a la columna de cromatografía. Se colocó la columna en un tubo (proporcionado en el kit) y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. Se descartó el filtrado y se añadieron a la columna 500 µl de solución de lavado. Se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se descartó el filtrado. Se repitió el lavado añadiendo otros 500 µl de de solución de lavado, se centrifugó durante 1 min y se transfirió la columna a un tubo Eppendorff. Para eluir el plásmido de la columna se añadieron 30 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm. El DNA eluido se guardó a -20°C hasta su uso.



**Figura 17.** Kit y proceso de purificación de plásmidos recombinantes.

### **3.2.7. Cuantificación del DNA plasmídico**

Para cuantificar el DNA plasmídico después de realizar una miniprep se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La medición de la concentración se hizo con 1  $\mu$ l de muestra, obteniéndose la concentración en ng/ $\mu$ l.

### **3.2.8. Digestión del DNA plasmídico**

Las digestiones realizadas se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se partió de un volumen determinado del DNA a digerir. Se añadieron 2  $\mu$ l del tampón adecuado para la enzima de restricción (Fermentas) y 1  $\mu$ l de la correspondiente enzima (10 U). Finalmente se añadió agua hasta alcanzar los 20  $\mu$ l. Posteriormente se incubó a 37°C durante 1-2 h.

### **3.2.9. Purificación de DNA de una solución**

Este proceso se llevó a cabo para la purificación del DNA después de someterlo a una reacción, como la de digestión o ligación, mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit. El procedimiento seguido fue similar al descrito en el apartado 3.2.5., con la excepción de que las muestras no fueron incubadas a 50°C tras la adición de los tres volúmenes del tampón de disolución QG.

### **3.2.10. Secuenciación de ácidos nucleicos**

Para las secuenciaciones realizadas se recurrió al servicio de secuenciación del IBMCP (CSIC-Universidad Politécnica de Valencia). En todos los casos se entregaron 5-10  $\mu$ l del plásmido a secuenciar. La cantidad óptima para secuenciar son 400 ng de plásmido. Dependiendo de la concentración a la que se encuentre el plásmido se utiliza un volumen determinado. En cada caso se aportó un cebador específico (3,2  $\mu$ M) que permitía secuenciar la región de interés.

### **3.2.11. Análisis informático**

Con el fin de verificar la correcta clonación de los genes en cada uno de los pasos de clonación, las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron mediante la herramienta informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). BLAST es una herramienta

informática de alineamiento de secuencias de tipo local. Compara una secuencia problema contra otra de referencia o contra una gran cantidad de secuencias disponibles en las bases de datos. Además, las secuencias nucleotídicas se tradujeron a sus correspondientes secuencias polipeptídicas mediante el uso del portal ExPASy ([www.expasy.org/tools/translate](http://www.expasy.org/tools/translate)).

### **3.2.12. Agroinoculación de plantas**

#### **3.2.12.1. Electroporación de plásmidos en *A. tumefaciens***

La introducción de los plásmidos de interés en la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* se realizó mediante electroporación tal y como se describe en el apartado 3.2.2., con la diferencia de que las bacterias se crecieron a 28°C durante 48 h en medio LB con agar en presencia de antibióticos rifampicina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Cuando se observó un crecimiento óptimo de las colonias, (descartando las más desarrolladas y las que tenían un tamaño menor), se seleccionó una muestra representativa y se cultivó en medio LB con las mismas cantidades de los antibióticos antes mencionados y tras 24 h en agitación a 28°C. Posteriormente, se sedimentaron las bacterias por centrifugación 1 min a 5.000 rpm, se resuspendieron en glicerol al 10% y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

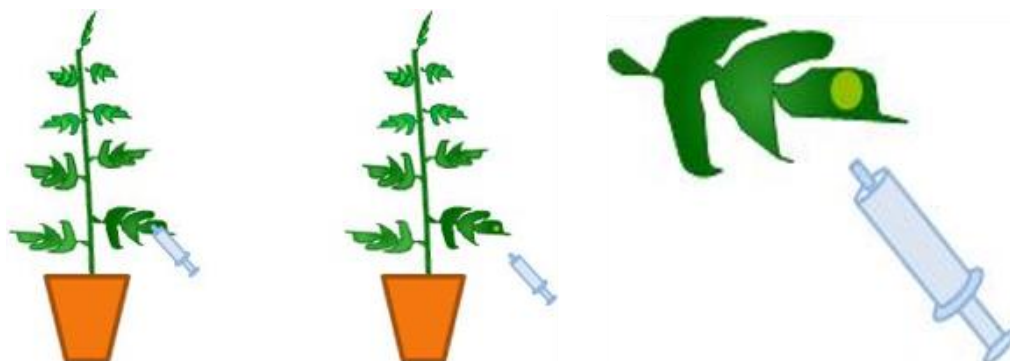
#### **3.2.12.2. Preparación del inóculo**

Los cultivos líquidos crecidos el día anterior fueron precipitados mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 5 min. Una vez eliminado el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de solución de agroinoculación (10 mM MES-NaOH pH5,6; 10 mM Mg<sub>2</sub>Cl) y se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectofotómetro. Los cultivos se diluyeron en solución de agroinoculación hasta alcanzar la densidad óptica de 1. A estas soluciones se les añadió acetosiringona a una concentración final de 150 µM y se incubaron 2 h a temperatura ambiente antes de proceder a la infiltración de las plantas.

#### **3.2.12.3. Agroinfiltración**

Las agroinfiltraciones se realizaron con una jeringuilla sin aguja cargada con la solución de *A. tumefaciens*. La agroinfiltración consistió en introducir en las hojas la solución de las bacterias, para lo cual la boquilla de la jeringa se apoya sobre el envés y se coloca la yema de un dedo en el lado sobre el haz de la hoja, de forma que al

presionar el émbolo lentamente, la solución bacteriana penetra generando un halo en los espacios intercelulares del tejido vegetal (figura 18).



**Figura 18.** Proceso de agroinoculación. Izquierda: Momento de la agroinoculación en el envés de la hoja. En medio: Herida tras la agroinoculación. Derecha: Gráfico ampliado de la herida tras la agroinoculación.

### 3.2.13. Análisis de proteínas mediante Western blot

#### 3.2.13.1. Preparación del gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

La separación de proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida en presencia del detergente sodiododecilsulfato (SDS), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de dos fases; la inferior (7 cm) de separación o *resolving* al 10% (30% mezcla de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 1,5M Tris pH 8,8, 10% SDS, 0,01% de APS al 10% y 0,001% TEMED) y la superior (3 cm) de compactación, concentración o *staining* (30% mezcla de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 1M Tris pH 6,8, 10% SDS, 0,01% de APS al 10% y 0,001 % TEMED). Una vez polimerizada la acrilamida, los geles se montaron en cubetas de electroforesis y se cubrieron con tampón de electroforesis de proteínas (0,025 M Tris-HCl pH 8,3; 0,2 M glicina; 1% SDS).

#### 3.2.13.2. Extracción de proteínas totales de plantas agroinfiltradas

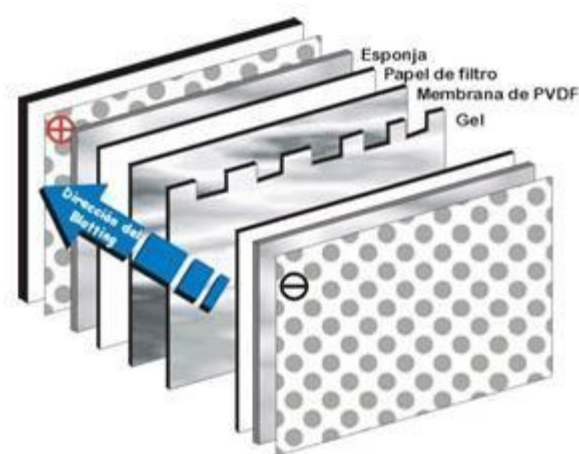
Para la extracción de proteínas totales se utilizaron muestras de material vegetal agroinfiltrado con un peso de unos 50 mg. El material vegetal se trituró en presencia de nitrógeno líquido, se resuspendió en 200 µl de tampón de extracción de proteínas (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM dithiothreitol, 10% glicerol y 0.01% azul de bromofenol) y se incubó a 95°C durante 10 min para inducir la desnaturización de las proteínas. Seguidamente, las muestras se clarificaron mediante centrifugación a 13.000



rpm durante 30 s y se cargaron 20  $\mu$ l del sobrenadante en el gel de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 35 mA durante aproximadamente 2 h. Como marcador de peso molecular de proteínas se empleó el marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder de Invitrogen.

### 3.2.13.3. Transferencia de las proteínas a membrana

Tras su separación por PAGE-SDS, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polivinilideno fluoruro, Amersham) para su posterior reconocimiento serológico con un anticuerpo específico que reconoce el epítipo myc. La membrana fue tratada previamente, sumergiéndola en metanol al 100% durante 1 min y posteriormente realizando 3 lavados de 5 minutos con agua destilada en agitación. La transferencia de proteínas a la membrana se realizó con el equipo de transferencia semiseca TE 70 de Hoefer™. Para ello, la membrana y el gel se colocaron entre papeles whatman 3MM (figura 19) humedecidos con tampón de electrotransferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina). La transferencia de las proteínas se realizó mediante la aplicación de un campo eléctrico constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 1 h.



**Figura 19.** Esquema de transferencia de las proteínas a membranas de PVDF.

### 3.2.13.4. Inmunodetección de proteínas transferidas a la membrana

Finalizada la transferencia, la membrana se lavó durante 5 min con solución TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) y posteriormente se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 5%, disuelta en TBST (TBS más Tween 20 al 0,3%). A continuación se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en solución de hibridación (5% de leche desnatada en solución TBST) a la que se

añadió el antisuero específico contra la proteína myc (en dilución 1:7.000). Seguidamente se hicieron 3 lavados de 5 min cada uno en agitación con TBST para eliminar el exceso del anticuerpo de la membrana. Una vez lavada, la membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente con solución de hibridación a la que se añadió el anticuerpo secundario (dilución 1:10.000), que reconoce la fracción constante del anticuerpo anti-myc, conjugado a fosfatasa alcalina. Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 min cada uno a temperatura ambiente con tampón TBST y un lavado de 5 min a temperatura ambiente con TBS.

Finalmente, el revelado de la membrana se realizó preparando el sustrato quimioluminiscente especial para la fosfatasa alcalina, siguiendo las instrucciones del kit de revelado fotosensible ECL plus Western Blotting System de Amersham. La solución que contenía el sustrato se aplicó sobre la membrana durante 5 min en oscuridad. Para la detección de la señal quimio-luminiscente, la membrana se expuso a películas autorradiográficas (Amersham) durante 30-60 min y se revelaron automáticamente. Todos los pasos del revelado se llevaron a cabo en oscuridad y a temperatura ambiente.

### **3.2.13.5. Visualización de las proteínas en la membrana**

Tras la transferencia de proteínas a la membrana, esta se tiñó durante 40 min en solución de azul coomassie (0,1% azul coomassie (p/v), 40% metanol y 10% ácido acético) y, posteriormente, se eliminó el exceso de colorante durante 1-2 h en solución de lavado (20% isopropanol, 5% ácido acético) hasta que pudieron apreciarse las bandas de proteínas.

## **4 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. Resultados y discusión

La enfermedad de la necrosis apical del tomate causada por el virus del moteado de la parietaria (PMoV) ha provocado numerosas pérdidas económicas en algunos cultivos hortícolas desde su primera detección en España en 2000 (Aramburu et al., 2001). Las plantas infectadas se protegen de su infección mediante una serie de mecanismos de defensa, siendo uno de ellos el del silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS (postranscriptional gene silencing). Como respuesta al silenciamiento de RNA en plantas, los virus han desarrollado estrategias específicas basadas en la utilización de proteínas propias con capacidad de suprimir el silenciamiento. Estas proteínas son diversas en secuencia y origen evolutivo y pueden actuar en diferentes pasos de la ruta de silenciamiento. Son capaces de inhibir la respuesta antiviral del huésped por medio de la interacción con factores clave de la maquinaria de silenciamiento implicados en el reconocimiento de RNA viral, el procesamiento de dsRNAs, el ensamblaje del complejo RISC y la amplificación de señal. De hecho un virus puede presentar varias proteínas con actividad supresora del silenciamiento de forma que cada una puede afectar a etapas diferentes de la ruta. En algunos virus de la familia *Bromoviridae* se ha encontrado un supuesto gen que codificaría la proteína 2b. En el caso del Cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) se ha comprobado que la proteína 2b se expresa y que dicha proteína interviene en el movimiento sistémico a larga distancia del virus y actúa como supresor del PTGS. Por homología en cuanto a la organización genómica se ha propuesto que esa misma proteína 2b en los *Ilarvirus* género al que pertenece PMoV, debería tener funciones similares.

En un proyecto anterior se comprobó la presencia del sgRNA 4A en plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas con PMoV, pero no la proteína 2b. Además, en experimentos de expresión transitoria de la proteína 2b, realizados con plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c (expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente GFP), se comprobó la expresión de la proteína, pero ésta no actuaba como supresor del silenciamiento génico a nivel local ni sistémico (door Peeters, 2009). Queremos determinar si la ausencia de actividad supresora del PTGS es específica de la proteína 2b de PMoV, o este hecho es extensible a la misma proteína de todos los *Ilarvirus*. El objetivo general de este Trabajo Final de Máster consiste en realizar experimentos similares con la proteína 2b de otros dos *Ilarvirus* del mismo subgrupo que PMoV, como son: el virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV) y el virus de las

manchas cloróticas anulares de la zarzamora (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV). Para ello, la proteína 2b de ambos virus (y la proteína 2b de PMoV usada como control) se expresarán transitoriamente en plantas de *N. benthamiana* 16c y se determinará su capacidad o no para romper el PTGS.

#### 4.1. Obtención, clonación y comprobación de la secuencia de DNA del gen que codifica la proteína 2b de TSV y BCRV

Debido a que en nuestro grupo no disponemos de los virus TSV y BCRV, se procedió a obtener la secuencia del ORF 2b disponible en la base de datos del Genbank y se solicitó la síntesis del correspondiente gen a la casa comercial Thermo Scientific. Para facilitar el proceso de clonación, cada una de las secuencias se equipó con un punto de corte en *NcoI* (CCATGG) en el extremo 5' y un punto de corte *Bgl II* (AGATCT) en el extremo 3' (precedidas ambas de los 5 nucleótidos AAAAA para optimizar la posterior restricción). Previamente, se confirmó la ausencia de corte de estos dos enzimas de restricción en la secuencia de ambos genes, mediante el análisis de la misma con el programa informático *Restriction Map*. Además, para comprobar la correcta expresión de las proteínas, cada secuencia se etiquetó con el epítipo myc (secuencia de aminoácidos E Q K L I S E E D L, codificados en la secuencia de nucleótidos gaacaaaaactcatctcagaaggatctg). La síntesis solicitada incluía las siguientes secuencias mostradas en la figura 20.

#### **Tobacco streak virus (TSV) putative 2b protein gene, NCBI Reference Sequence: NC 003842.1**

AAAAACCATGGaacaaaaactcatctcagaaggatctgtttattccgatcttgttcctcactttgact  
ctcgcgtcagcagatgtgatgactctgatggagtccgaacctcaaccttcgacgacagaaagtcgtccaa  
gcatgcctccgataaaactcaggaaaaccgagtggttacggagaagcccgggtgtagaattaaaccccgaga  
aacggtaaaagtgaagcggagcagttcaatacagtcaatccagtggaattgaaactggaaaagcgaatt  
cctcccgaagggttaggatcaaattgcattgactgtgctatttccaacttgccaaaggcgatgttctctg  
tcaaggttccgaagttgaatatcaacttcgaggtgtctgattttccgtcttcaaggttaatatttgccac  
gtagcccaaagagtgagtgatctattccctttattgagtcctctgagtttccagcgatattcaaggatg  
cagcttcgtgctctaggtgacgtagaagtcctcatcttcattccaaaatttggttggaacaaatttga  
aattgctgatgtggtttccgggttgatattccgaagatcccgtccatagctcccaagtgagtcag  
tgtcgggtgattgcctaaattcttgaAGATCTAAAAA

#### Secuencia de aminoácidos deducida de la proteína 2b de TSV

MEQKLI SEEDLFIPIILFLTLTLASADVMTLMESEPQPSTTESRPSMPPINSKGKPSVTEKPGVELNPGETV  
KVKAEQFNTVNPVELKLEKRI PPGRVGSNCIDCAISNLPKAMFSVKVPKLNINFEVSDFPSSRLIFATLA  
QRVKSIPFIESLSFSPSDIQRMQLRALGDVEVLIFIPKFGWKQILKLSDVVSGFDIPKIPSIAPKVESCVG  
DCLNS-

## Blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV) putative 2b protein gene, NCBI

### Reference Sequence: NC 011554.1

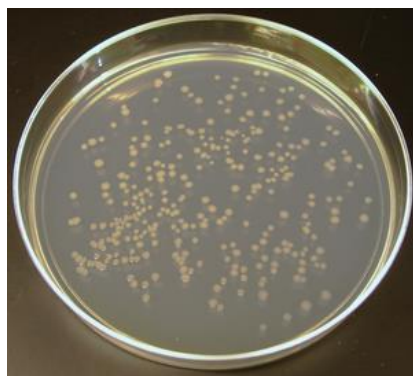
AAAAACCATGGaacaacaaaactcatctcagaagaggatctgatgtttattccaatcttggtgatgctcttg  
agcccatgtgtgctcgcagacttgatgcctcaccagaagatccgagatttggtccgaaacgagaaagt  
ccgaatcgggtcccgaactccagatgtggttcttgagaaaggaataccgagccggagataaaattgag  
accccgcaatctgtgaagggtgtccacggacggggaaagagagagcccagtgcaaaccctcaacgaattt  
cgtttagaggaaaggagctcacctggaaagggtggcaacaaattgccttgattgtgctatcactcatcttc  
cagaggtagctttctctgtgaaggtagcgaagttgaatataaacttcaagtttcagattttccttcac  
aaggtaaatctttgccagcttgccagtagaattaaggacttaccctttggtcgatcattgaggtatccc  
actgatcatcaaaggattcagttacgttctattggtgatgttgaagtacacatccatattccaaaatttg  
gttgaaacaagttttgaagatgtctgatgtgatttccggttttgaattaccgaagattcccaccatcgc  
tccaaaagtggagtcgtgtgttggatgatttaaccattaaAGATCTAAAAA

### Secuencia de aminoácidos deducida de la proteína 2b de BCRV

MEQKLI SEEDLMFIPILLMLLSPCVLADLMPHPEDPRFVVPETRKSESVPETPDVVPGERNTEPEIKLRPR  
ESVKVSTDGERESPVQTLNEFRLEERSSPGKVATNCLDCAITHLPEVAFSVKVPKLNINFEVSDFPSSRL  
IFASLASRIKDLPFVRSRLRYPTDHQRIQLRSIGDVEVHIHI PKFGWKQVLKMSDVISGFELPKIPTIAPK  
VESC VGECLTH-

**Figura 20.** Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos (en rosa) del gen 2b de TSV y BCRV. Se indican en rojo los codones de inicio y fin de cada gen. En mayúsculas y subrayados los puntos de corte de los enzimas de restricción *NcoI* y *Bgl II*. En amarillo se indica la secuencia de nucleótidos (gen) o de aminoácidos (proteína) del epítipo myc. Después podemos observar una alineación de la secuencia solicitada con la recibida, así comprobamos que corresponde con lo solicitado.

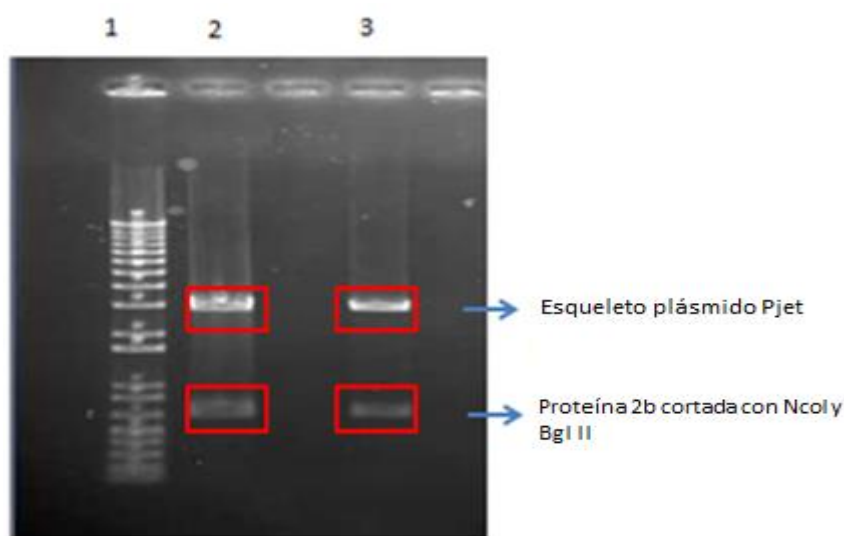
Los respectivos genes sintetizados por la empresa Thermo Scientific se clonaron en el vector pJET1.2/blunt según se describe en el apartado XXX con el objetivo de disponer de suficiente cantidad para las posteriores subclonaciones. Tras la ligación, se introdujo el plásmido recombinante mediante electroporación en la cepa DH5a de *E. coli* y la mezcla se distribuyó en placas con agar y se dejaron a 37° C hasta el desarrollo de las colonias (Figura 21).



**Figura 21.** Crecimiento de bacterias portadoras de los plásmidos recombinantes pJET1.2/blunt + gen 2b de TSV y BCRV.

La presencia del gen 2b (de TSV y/o de BCRV) en las colonias recombinantes se comprobó mediante PCR. Se aisló el plásmido recombinante de una colonia de bacterias de cada tipo y se procedió a su secuenciación empleando cebadores específicos del vector de clonación. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinearon con las secuencias de síntesis solicitadas usando el programa blast del NCBI, con el fin de descartar cualquier error durante el proceso de síntesis química de cada uno de los genes. Comprobada la secuencia correcta de cada gen, los plásmidos pJET-TSV (colonia número 5) y pJET-BCRV (colonia número 8) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *Bgl II*, para su posterior ligación en el vector pSK digerido con las mismas enzimas de restricción entre el doble promotor 35 S y el terminador popit (Anexo 1).

Una vez llevada a cabo la restricción, los fragmentos de DNA se separaron en una electroforesis en gel de agarosa (figura 22) y el fragmento de DNA conteniendo el gen 2b (aproximadamente 650 pb) se purificó del gel de agarosa.

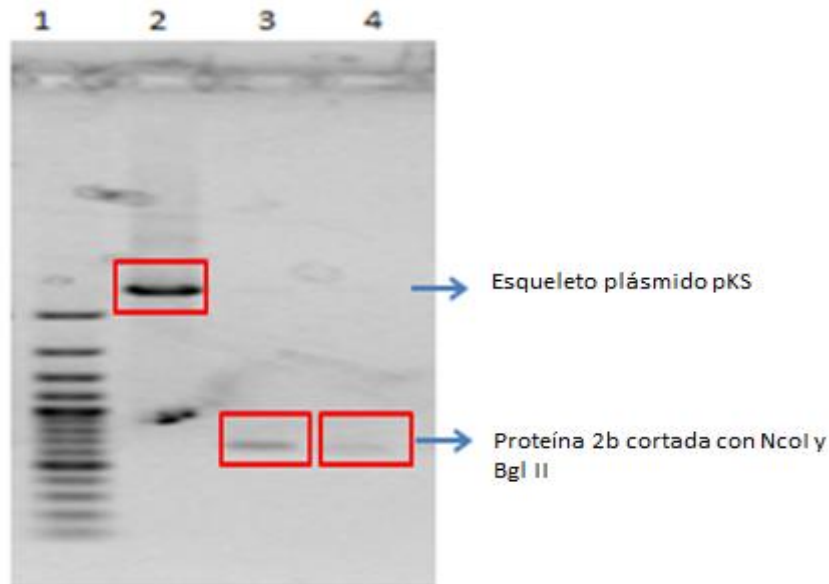


**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de muestras de DNA tras la digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *Bgl II*. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, pJET + gen 2b TSV (colonia 5) cortado con *NcoI* y *Bgl II*. Carril 3, pJET + gen 2b BCRV (colonia 8) cortado con *NcoI* y *Bgl II*. Se indica con un recuadro la banda de DNA con el gen 2b cortada para purificar.

#### **4.2. Subclonación del gen 2b en el vector pSK entre el doble promotor 35S y el terminador popit**

Tras la purificación, los fragmentos de DNA conteniendo el gen 2b se comprobaron y cuantificaron mediante un gel de electroforesis, junto con el vector

pKS digerido con las dos mismas enzimas de restricción y purificado de igual forma (figura 23). El objetivo de esta digestión fue generar extremos cohesivos entre los insertos (genes 2b de TSV y BCRV) y el vector pKS con el fin de facilitar la clonación.



**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de muestras de DNA purificadas tras la digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *Bgl II* del vector de clonación pKS (Carril 2) y del gen 2b de los aislados TSV (carril 3) y BCRV (carril 4). Carril 1, marcador de tamaños de DNA 100 pb Ladder Plus (Fermentas).

Los fragmentos de DNA conteniendo el gen 2b de los dos virus aislados se ligaron en el vector intermedio pKS siguiendo el esquema de la figura 24.

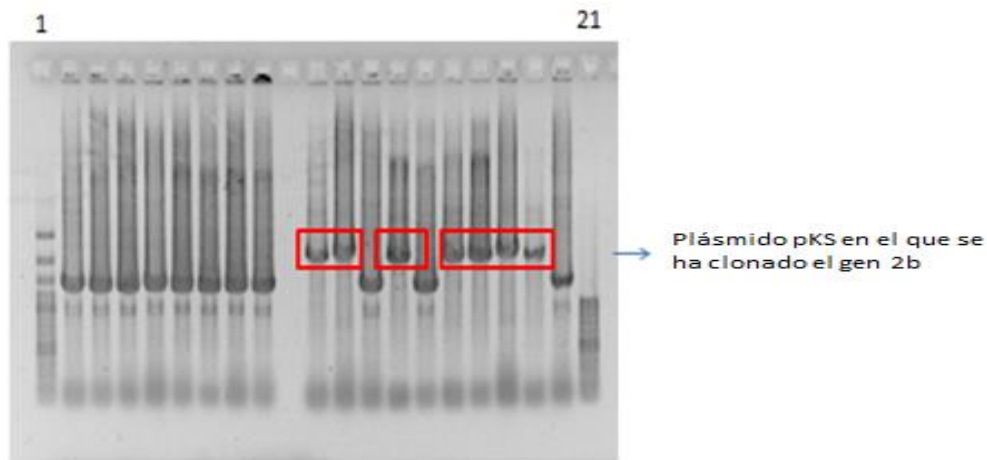


**Figura 24.** Representación esquemática del proceso de ligación entre el vector pKS digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *Bgl II* y el gen 2b de TSV o BCRV digerido con las mismas enzimas. El casete de expresión consta del gen 2b clonado entre la secuencia del doble promotor 35S y del terminador *popit*.

Como el vector pKS no lleva ningún gen reportero, para identificar las colonias portadoras del vector recombinante se realizó una PCR de colonias con dos cebadores

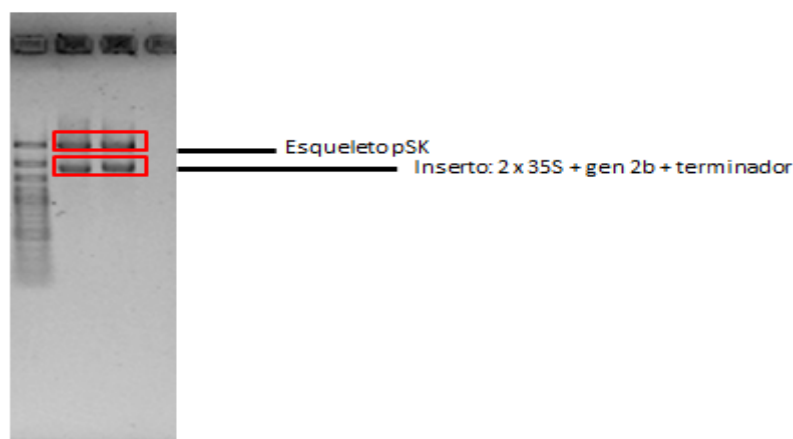


del vector. En la figura 25 se muestra un ejemplo de amplificación a partir de diferentes colonias de bacterias transformadas con pKS + gen 2b de TSV.



**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de amplificación a partir de diferentes colonias de bacterias transformadas con pKS + gen 2b de TSV. En la parte superior de la imagen se indica el número de cada colonia. Los productos de amplificación de 1200 pb corresponden al tamaño del doble promotor 35S + terminador popit. Los productos de amplificación recuadrados de unos 2000 pb corresponden a los que han insertado el gen 2b entre promotor y terminador. Carriles 1 y 21, marcadores de DNA 100 bp Ladder Plus y DNA 100 bp Ladder, respectivamente, ambos de Fermentas.

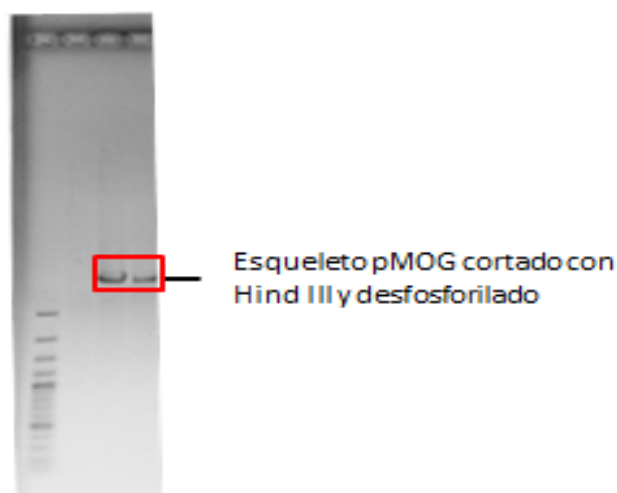
Utilizando esta estrategia se obtuvieron las dos construcciones pKS-gen 2b TSV y pKS-gen 2b BCRV. La comprobación de los dos plásmidos recombinantes seleccionados se realizó mediante secuenciación con un cebador que hibrida en el terminador popit, y mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII* (figura 26).



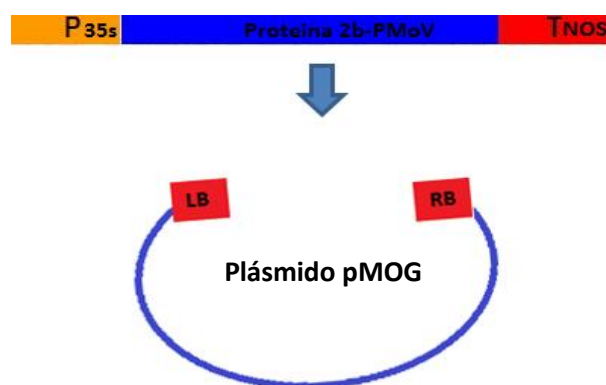
**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los plásmidos recombinantes pKS + gen 2b de los virus TSV (carril 2) y BCRV (carril 3) tras la digestión con la enzima de restricción *HindIII*. La banda superior de los carriles 2 y 3 corresponde al esqueleto del vector y la inferior al casete liberado 2 x 35S + gen 2b + terminador popit. Carril 1, marcador DNA 100 pb Ladder Plus de Fermentas.

### 4.3. Subclonación de los casetes de expresión en el vector binario pMOG 800

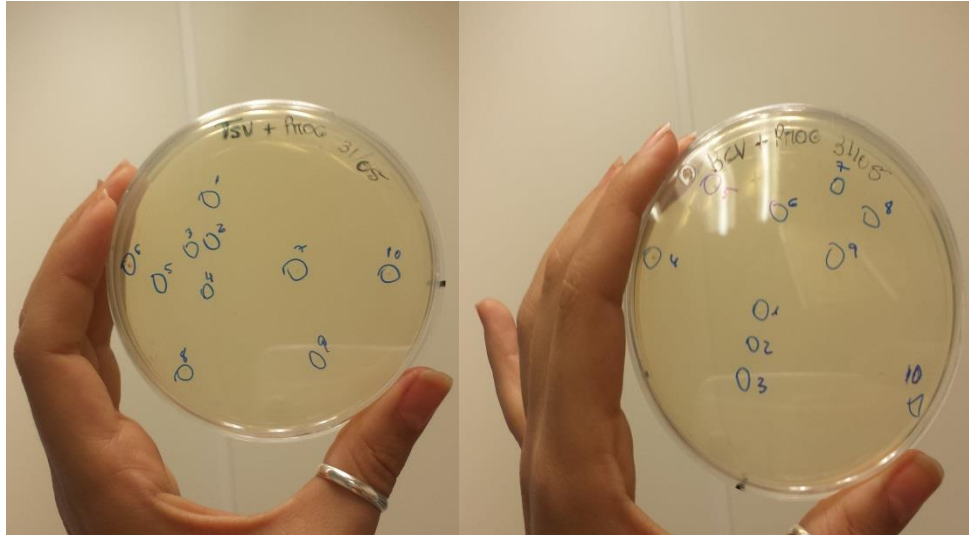
Finalmente, los dos plásmidos recombinantes una vez comprobados y digeridos con la enzima de restricción *Hind*III se subclonaron en el vector de expresión pMOG 800, previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado para evitar la religación (Figura 27). En cada carril de la figura 26 aparecen dos bandas; la superior que corresponde al esqueleto del vector pKS y la inferior al casete liberado (aprox. 2.000 pb). En la figura 28 se muestra una representación esquemática del proceso de clonación en dicho vector.



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del vector de clonación pMOG cortado con la enzima de restricción *Hind*III y desfosforilado (Carriles 2 y 3). Carril 1, marcador de tamaños de DNA 100 pb Ladder Plus (Fermentas).

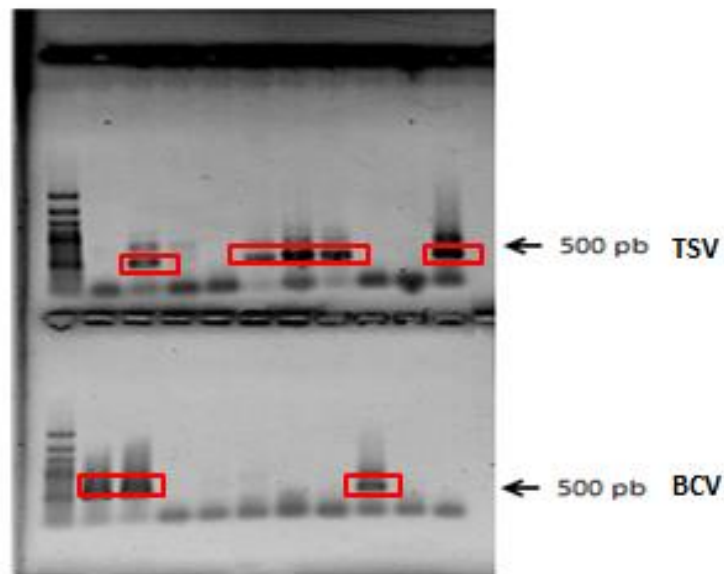


**Figura 28.** Representación esquemática del proceso de clonación del formado por el doble promotor 35S + gen 2b + terminador popit en vector binario pMOG. El vector consta de un origen de replicación, un gen de resistencia a kanamicina y los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del plásmido Ti de *A. tumefaciens*.



**Figura 29.** (A) Placas de colonia de pMOG con TSV (B) placas de colonias de PmOG con BCRV.

Después de llevar a cabo la transformación y esperar al desarrollo de las colonias en un medio de agar con kanamicina (figura 29) la correcta clonación en el vector pMOG se comprobó mediante PCR con un cebador específico del terminador popit y otro del vector pMOG (figura 30).



**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de amplificación a partir de diferentes colonias de bacterias transformadas con pMOG + casete de expresión del gen 2b de TSV (panel superior) o de BCRV (panel inferior). En la parte superior de la imagen se indica el número de cada colonia. Los productos de amplificación de unos 500 pb proceden de colonias de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes con la construcción de DNA correcta. Los productos de amplificación recuadrados de unos 2000 pb corresponden a los que han insertado el gen 2b entre promotor y terminador. Carriles 1, marcadores de DNA 100 bp Ladder Plus de Fermentas.

Posteriormente, tras crecer las colonias en un medio líquido con kanamicina y realizar la purificación del plásmido pMOG recombinante, éstos se comprobaron mediante digestión de los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción *HindIII*.

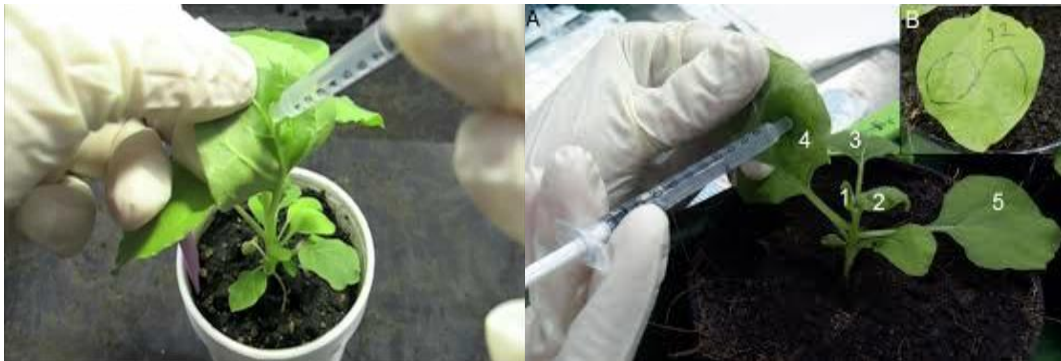
#### **4.4. Agroinfiltración de los plásmidos pMOG recombinantes en plantas de *N. benthamiana*. Análisis de la expresión de las proteínas 2b**

Los ensayos de expresión transitoria de proteínas mediados por *Agrobacterium*, para determinar la función de genes, se utilizan cada vez más como una alternativa a la complementación genética y a la transformación estable de plantas. La expresión transitoria proporciona un método rápido para el ensayo de la función de algunos tipos de genes y los transgenes se pueden ensayar en unos pocos días tras la infiltración. No obstante, estos ensayos son variables y no tienen el mismo éxito en todas las especies de plantas. Las plantas modelo *N. benthamiana* y *N. tabacum* suelen mostrar altos niveles de expresión transitoria. Por otro lado, la cepa de laboratorio C58C1 de *A. tumefaciens* es la más utilizada en estas especies de plantas modelo debido a que no provoca ningún tipo de respuesta necrótica en la hoja inoculada y por los elevados niveles de expresión que se obtienen.

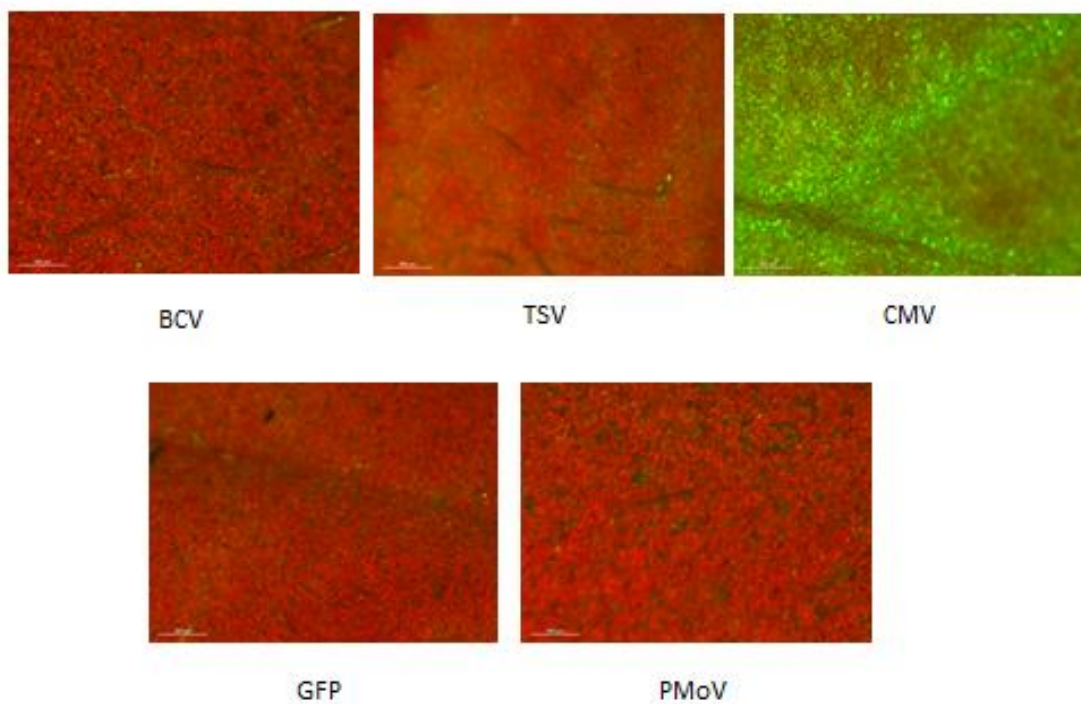
En el caso del análisis de la actividad supresora de PTGS de una proteína determinada se utilizan plantas *N. benthamiana* 16c. Estas plantas constitutivamente expresan el mRNA de la GFP con lo que bajo luz UV muestran un color verde en contraste con el color rojo de las plantas silvestres debido a la emisión de los cloroplastos tras ser irradiados con luz UV. Así, las plantas 16c se co-infiltran con una mezcla de *Agrobacterium* que expresa el mRNA de la GFP y la de la proteína problema. La sobreexpresión del mRNA de la GFP desde las células de *agrobacterium* activará el PTGS contra este mensajero de modo que las plantas 16c al cabo de 4-6 días pasan a mostrar un color rojo bajo luz UV. Por el contrario, si junto a la GFP se co-expresa una proteína que presente actividad supresora esta impedirá la degradación del mRNA de la GFP con lo que la planta se mantendrá de color verde.

Una vez obtenidos los dos plásmidos binarios recombinantes (pMOG/TSV2b y pMOG/BCRV2b) se electroporaron en *A. tumefaciens*. Las bacterias se plaquearon en presencia de los antibióticos tetraciclina (7,5 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), y rifampicina (50 µg/ml) y se incubaron durante 3 días. Se seleccionaron dos colonias de

*A. tumefaciens* correspondientes a cada plásmido y se cultivaron en 10 ml de LB con kanamicina (50 µg/ml). Los cultivos se dejaron crecer a 28°C hasta que se observó turbidez y se midió la D.O. Tras esto, se prepararon a partir de cada cultivo 10 ml de solución de agroinoculación a una DO igual a 0,5 y se agroinfiltraron las plantas (Figura 31). Las plantas se dejaron crecer a con un fotoperiodo de 12 h de luz a 22°C y 12 h de oscuridad a 20°C.



**Figura 31.** Agroinoculación en plantas de *N. benthamiana*. 16c.

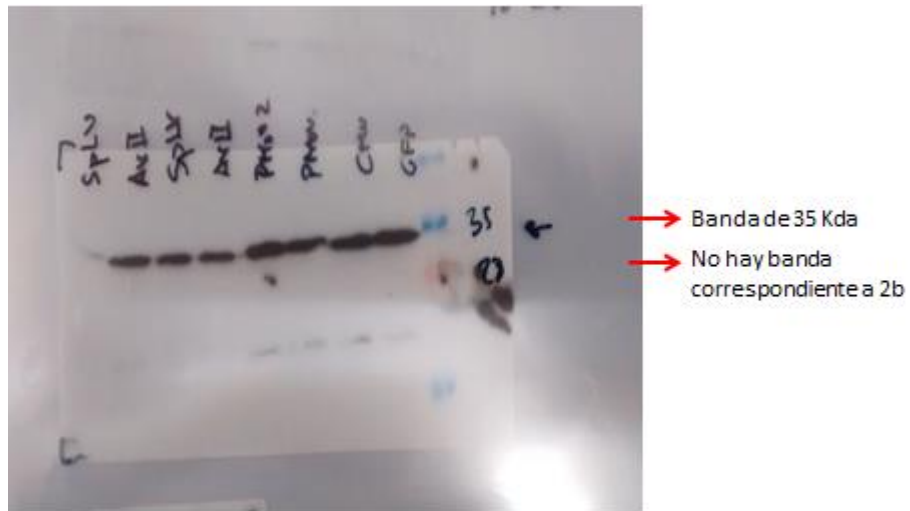


**Figura 32.** Micrografía con luz UV de hojas infiltradas con GFP y la proteína 2b del virus indicado en la parte inferior a 6 días post inoculación.

A 6 días post-infiltración se analizó la presencia de GFP mediante la observación de la emisión de fluorescencia con una lupa equipada con luz ultravioleta. Tal y como esperábamos, las hojas co-infiltradas con GFP+CMV2b presentaron la emisión de fluorescencia lo que indica la acumulación de la proteína GFP y por tanto el su mRNA no está siendo degradado por el PTGS (Figura 32). Por el contrario, las hojas infiltradas solamente con GFP o con GFP+PMoV2b no mostraron fluorescencia indicando que el mRNA de la GFP está siendo degradado por el PTGS (Figura 32). Así, como se ha demostrado anteriormente, la proteína 2b del CMV presenta actividad supresora del silenciamiento a nivel local mientras que la del PMoV no la tiene (Xin et al., 1998; door Peters, 2009). Por otro lado, tal y como muestra la misma figura, las hojas infiltradas con GFP+TSV2b o GFP+BCRV2b) no mostrarán acumulación de GFP indicando que ninguna de las proteínas presenta actividad supresora de PTGS. Así, nuestros resultados junto a los previamente presentados en el caso del PMoV y AV2 (Shimura y col., 2013), sugieren que las proteínas 2b de los *Ilarvirus* no serían funcionalmente homologas a la del CMV en su actividad como supresor de PTGS a nivel local.

#### **4.5. Análisis tipo Western blot.**

Finalmente, para confirmar la expresión de las proteínas TSV2b y BCRV2b se realizaron análisis tipo western. Para ello, se realizaron extractos de proteínas totales a 2 dpi de hojas agro-infiltradas que se separaron en geles 14% PAGE y posteriormente se transfirieron a membranas de PDVF. Las membranas se incubaron con anticuerpo contra el epitopo myc (presente en las proteínas 2b de PMoV, BCRV y TSV). Desafortunadamente, los resultados obtenidos no fueron concluyentes ya que probablemente el anticuerpo utilizado no estaba funcionando correctamente, ya que ni el control positivo pudo ser detectado (proteína 2b de PMoV evaluada en trabajos anteriores, door Peters 2009). Como se observa en la Figura 33, el revelado muestra la presencia de una proteína de unos 35 Kda presente en los extractos de todas las plantas, pero no la presencia de una banda específica alrededor de los 28 Kda correspondiente a las proteínas 2b de PMoV, BCRV y TSV.



**Figura 33.** Resultado del Western, donde se muestra la banda de una proteína de 35 Kda presente en todas las muestras, pero ninguna muestra la banda de 28 Kda correspondiente a la proteína 2b.

Este experimento se repetirá cuando se disponga de un nuevo anticuerpo anti-myc con el objetivo de comprobar que la proteína 2b se expresa en las plantas agroinoculadas, y que su función no esta relacionada con la supresión del PTGS a nivel local.

## **5. Conclusiones**



## 5. Conclusiones

1. Se ha clonado en un vector binario, para la expresión transitoria mediante agroinfiltración, el gen que codifica la supuesta proteína 2b de los *Ilarvirus*: virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV) y virus de las manchas cloróticas anulares de la zarzamora (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV).
2. Mediante la expresión transitoria en el sistema de plantas de *N. benthamiana* 16c se ha determinado que ninguna de estas proteínas presentan actividad supresora del PTGS a nivel local.

## **6. Bibliografía**

## 6. Bibliografía.

- Adenot, X., Elmayan, T., Laussergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H., (2006).** DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* 16:927-932.
- Aparicio, F., Vilar, M., Perez-Paya, E. and Pallas, V. (2003).** The coat protein of prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. *Virology* 313:213-223.
- Aramburu, J., (2001).** First report of Parietaria mottle virus on tomato in Spain. *Plant Disease* 85, 1210.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Aparicio, F., Soler, S., López, C., (2010).** Mode of transmission of Parietaria mottle virus. *Journal of Plant Pathology* 92, 679-684.
- Bol, J. F., (1999).** Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *J Gen Virol* 80:1089-1102.
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X., Vaucheret, H., (2003).** Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* 13, 843-48.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D., (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739-6746.
- Burgyan, J., and Havelda, Z., (2011).** Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 16:265-272.
- Caciagli, P., Bocardo, G., Lovisolo, O., (1989).** Parietaria mottle virus, a possible new Ilavirus from *Parietaria officinalis* (Urticaceae). *Plant Pathology* 38, 577-584.

- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyan, J., (2015).** Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host pathogen coexistence. *Virology* 479:85-103.
- Ding S.W., Li, W.X. and Symons, R.H., (1995).** A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.*, 14, 5762–5772.
- Ding, S.W., Voinnet, O., (2007).** Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- door Peeters, A., (2009).** Characterisation of a potential suppressor of RNA silencing of *Parietaria mottle virus* (PMoV). Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Eamens, A.L., Kim, K.W., Curtin, S.J., Waterhouse, P.M., (2012a).** DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PloS ONE* 7, e35933.
- Eamens, A.L., Wook, Kim, K., Waterhouse, P.M., (2012b).** DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1224–1229.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., (2001).** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15, 188-200.
- Garcia, J. A. and Pallas, V., (2015).** Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr Opin Virol* 11:21-30.
- Guo, H.S., Ding, S.W., (2002).** A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal* 21, 398-407.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T., (2005).** Specific interactions between dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57, 173–188.
- Hong-Wu, X., Liang-Hui, J., Simon, W. S., Robert, H. S., and Shou-Wei, D., (1998).** Ilarviruses encode a Cucumovirus-like 2b gene that is absent in

other genera within the Bromoviridae. *Journal of Virology* 72, 6956 – 6959.

**Janssen, D., Saez, E., Segundo, E., Martin, G., Gil, F., Cuadrado, I.M., (2005).**

*Capsicum annuum* – a new host of *Parietaria mottle virus* in Spain. *Journal of Plant Pathology* 54, 567.

**Kim, V. N., (2003).** RNA interference in functional genomics and medicine. *J Korean*

*Med Sci* 18:309.

**Lisa, V., Ramasso, E., Ciuffo, M., Roggero, P., (1998).** Tomato apical necrosis

caused by a strain of *Parietaria mottle virus*. Proc. 9th Conference of the international Society for Horticultural Science. VVWG, Recent Advances in Vegetable Research, Turin, pp. 290-291.

**Marchoux, G., Parrella, G., Gebre-Selassie, K., Gagnalon, P., (1999).**

Identification de deux *ilarvirus* sur tomate dans le Sud de la France. *Phytoma* 522, 53 – 55.

**Mayers, C.N., Palukaitis, P. and Carr, J.P., (2000).** Subcellular distribution

analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J. Gen. Virol.*, 81, 219–226.

**Minois, N., Sykacek, P., Godse, B., and Kreil, D. P., (2010).** RNA interference in

ageing research - a minireview. *Gerontology* 56:496-506

**Olsthoorn, R.V.L., Mertens, S., Brederode, T.B., Bol, J.F., (1999).** A

conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication. *The EMBO Journal* 18, 4856-4864.

**Pallás, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A. and Scott, S. W.,**

**(2013).** The molecular biology of ilarviruses. *Adv Virus Res* 87:139-181.

**Riz-Ferrer, V., Voinnet, O., (2009).** Roles of plant small RNAs in biotic stress

responses. *Annual Review Plant Biology* 60, 485-510.

**Roggero, P., Ciuffo, M., Katis, N., Alioto, D., Crescenzi, A., Parrella, G.,**

**Gallitelli, D., (2000).** Necrotic disease in tomatoes in Greece and southern

Italy caused by the tomato strain of Parietaria mottle virus. *Journal of Plant Pathology* 82, 159.

**Roth, B. M., Pruss, G. J. and Vance, V. B., (2004).** Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102:97-108.

**Sen, G. L., and Blau, H. M., (2006).** A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J* 20:1293-1299.

**Shimura, H., Masuta, C., Yoshida, N., Sueda, K., Suzuki, M., (2013).** The 2b protein of Asparagus virus 2 functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442, 180-188.

**Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyán, J., Masuta, C., (2011).** A viral satellite RNA induces yellow symptoms on Tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLOS Pathogens* 7, e1002021.

**Tzanetakis, I.E., Martin, R.R., (2005).** New features in the genus Ilavirus revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus. *Virus Research* 112, 32-37.

**Vaucheret, H., (2006).** Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development* 20, 759-771.

**Voinnet, O., (2001).** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17, 449–459.

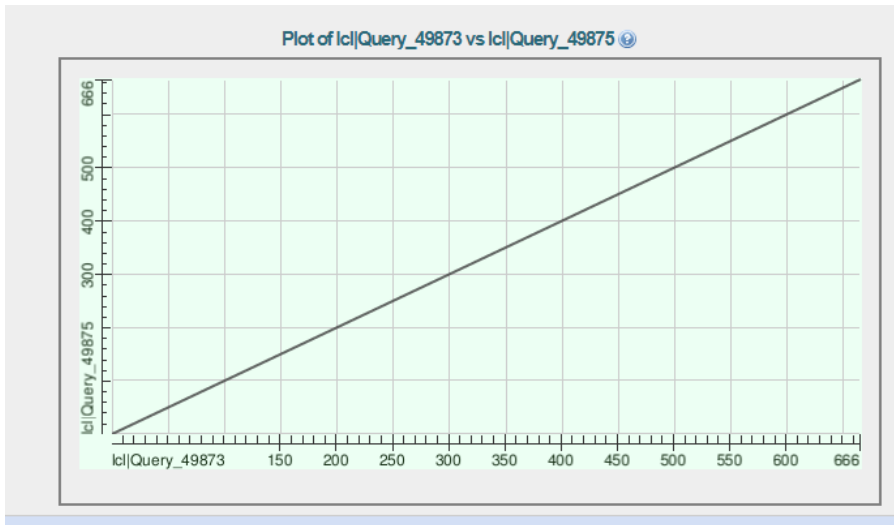
**Wang, M. B., Masuta, C., Smith, N. A. and Shimura, H., (2012).** RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1275-1285.

**Xin, H.W., Ji, L.H., Scott, S.W., Symons, R.H., Ding, S.W., (1998).** Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the Bromoviridae. *Journal of Virology* 72, 6956-6959.

# **Anexos**

## Anexos.

### TSV



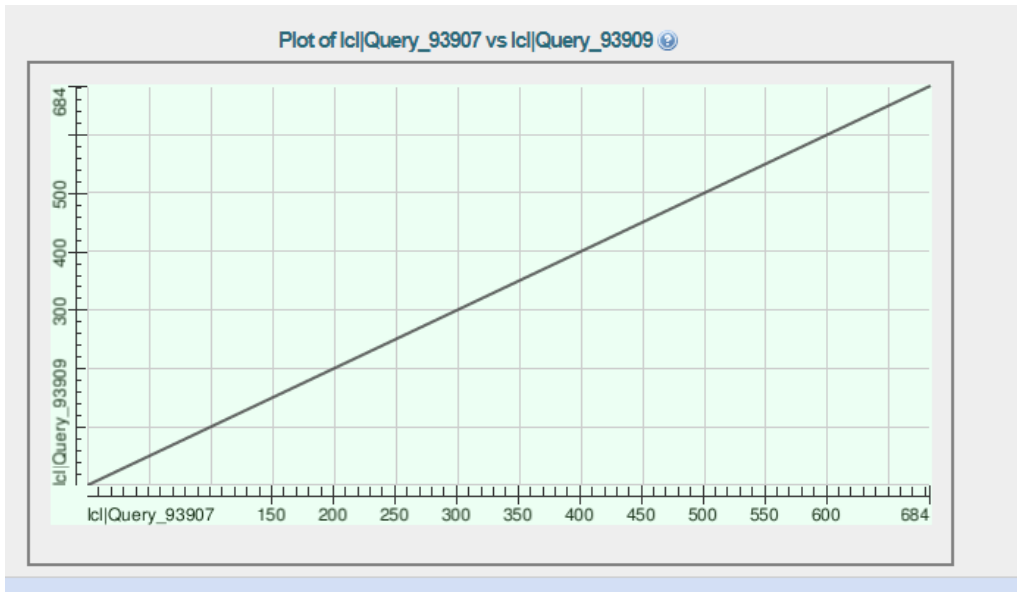
Range 1: 1 to 666 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

NW Score	Identities	Gaps	Strand
1302	660/666(99%)	0/666(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTTTATTCCGATCTTGTTCCT		60
Sbjct 1	AAAAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTTTATTCCGATCTTGTTCCT		60
Query 61	CACTTTGACTCTCGCGTCAGCAGATGTGATGACTCTGATGGAGTCCGAACCTCAACCTTC		120
Sbjct 61	CACTTTGACTCTCGCGTCAGCAGATGTGATGACTCTGATGGAGTCCGAACCTCAACCTTC		120
Query 121	GACGACAGAAAGTCGTCCAAGCATGCCTCCGATAAACTCAGGAAACCGAGTGTTACGGA		180
Sbjct 121	GACGACAGAAAGTCGTCCAAGCATGCCTCCGATAAACTCAGGAAACCGAGTGTTACGGA		180
Query 181	GAAGCCCGTGTAGAATTAAACCCGGAGAAACCGTAAAAGTGAAAGCGGAGCAGTTCAA		240
Sbjct 181	GAAGCCCGTGTAGAATTAAACCCGGAGAAACCGTAAAAGTGAAAGCGGAGCAGTTCAA		240
Query 241	TACAGTCAATCCAGTGGAAATTGAAACTGGAAAAGCGAATTCCTCCGGAAGGGTAGGATC		300
Sbjct 241	TACAGTCAATCCAGTGGAAATTGAAACTGGAAAAGCGAATTCCTCCGGAAGGGTAGGATC		300
Query 301	AAATTGCATTGACTGTGCTATTTCCAACCTGCCAAAGCGGATGTTCTCTGTCAAGGTTCC		360
Sbjct 301	AAATTGCATTGACTGTGCTATTTCCAACCTGCCAAAGCGGATGTTCTCTGTCAAGGTTCC		360
Query 361	GAAGTTGAATATCAACTTCGAGGTGTCTGATTTCCGTCCTCAAGGTTAATATTTGCCAC		420
Sbjct 361	GAAGTTGAATATCAACTTCGAGGTGTCTGATTTCCGTCCTCAAGGTTAATATTTGCCAC		420
Query 421	GTTAGCCCAAGAGTGAAGTCTATTCCTTTATTGAGTCTCTGAGTTTTCCAGCGATAT		480
Sbjct 421	GTTAGCCCAAGAGTGAAGTCTATTCCTTTATTGAGTCTCTGAGTTTTCCAGCGATAT		480
Query 481	TCAAAGGATGCAGCTTCGTGCTCTAGGTGACGTAGAAGTCTCATCTTCATTCCAAAATT		540
Sbjct 481	TCAAAGGATGCAGCTTCGTGCTCTAGGTGACGTAGAAGTCTCATCTTCATTCCAAAATT		540
Query 541	TGGTTGGAAACAAATTTTGAATTTGTCTGATGTGGTTTCCGGGTTTGATATCCCGAAGAT		600
Sbjct 541	TGGTTGGAAACAAATTTTGAATTTGTCTGATGTGGTTTCCGGGTTTGATATCCCGAAGAT		600
Query 601	CCCGTCCATAGCTCCCAAAGTGGAGTCATGTGTCGGTGATTGCCTAAATCTTGAAGATC		660
Sbjct 601	CCCGTCCATAGCTCCCAAAGTGGAGTCATGTGTCGGTGATTGCCTAAATCTTGAAGATC		660
Query 661	TAAAAA		666
Sbjct 661	CAAAAA		666

Aquí podemos observar como se comprobó mediante una alineación que la secuencia solicitada para la síntesis y lo recibido son idénticas en un 99%.



## BCRV



NW Score	Identities	Gaps	Strand
1338	678/684(99%)	0/684(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAACCATGGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGTTTATTCCAATCTTGTT		60
Sbjct 1	AAAAACCATGGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGTTTATTCCAATCTTGTT		60
Query 61	GATGCTCTTGAGCCCATGTGTGCTCGCAGACTTGATGCCTCACCCAGAAGATCCGAGATT		120
Sbjct 61	GATGCTCTTGAGCCCATGTGTGCTCGCAGACTTGATGCCTCACCCAGAAGATCCGAGATT		120
Query 121	TGTTCCGAAACGAGAAAGTCCGAATCGGTTCCCGAAACTCCAGATGTGGTTCCTGGAGA		180
Sbjct 121	TGTTCCGAAACGAGAAAGTCCGAATCGGTTCCCGAAACTCCAGATGTGGTTCCTGGAGA		180
Query 181	AAGGAATACCGAGCCGGAGATAAAATTGAGACCCCGCAATCTGTGAAGGTGCCACGGA		240
Sbjct 181	AAGGAATACCGAGCCGGAGATAAAATTGAGACCCCGCAATCTGTGAAGGTGCCACGGA		240
Query 241	CGGGGAAAGAGAGAGCCAGTGCAAAACCTCAACGAATTTTCGTTTAGAGGAAAGGAGCTC		300
Sbjct 241	CGGGGAAAGAGAGAGCCAGTGCAAAACCTCAACGAATTTTCGTTTAGAGGAAAGGAGCTC		300
Query 301	ACCTGGAAAGGTGGCAACAAATTGCCTTGATTGTGCTATCACTCATCTCCAGAGGTAGC		360
Sbjct 301	ACCTGGAAAGGTGGCAACAAATTGCCTTGATTGTGCTATCACTCATCTCCAGAGGTAGC		360
Query 361	TTTCTCTGTGAAGGTACCGAAGTTGAATATAAACTTCGAAGTTTCAGATTTTCCTTCATC		420
Sbjct 361	TTTCTCTGTGAAGGTACCGAAGTTGAATATAAACTTCGAAGTTTCAGATTTTCCTTCATC		420
Query 421	AAGGTTAATCTTTGCCAGCTTGGCCAGTAGAATTAAGGACTTACCCTTTGTTCCGATCATT		480
Sbjct 421	AAGGTTAATCTTTGCCAGCTTGGCCAGTAGAATTAAGGACTTACCCTTTGTTCCGATCATT		480
Query 481	GAGGTATCCCACTGATCATCAAAGGATTCAGTTACGTTCTATTGGTGATGTTGAAGTACA		540
Sbjct 481	GAGGTATCCCACTGATCATCAAAGGATTCAGTTACGTTCTATTGGTGATGTTGAAGTACA		540
Query 541	CATCCATATCCAAAATTTGGTTGGAACAAGTTTTGAAGATGCTGATGTGATTTCCGG		600
Sbjct 541	CATCCATATCCAAAATTTGGTTGGAACAAGTTTTGAAGATGCTGATGTGATTTCCGG		600
Query 601	TTTTGAATTACCGAAGATCCCAACCATCGCTCCAAAAGTGGAGTCGTGTGTTGGTGAATG		660
Sbjct 601	TTTTGAATTACCGAAGATCCCAACCATCGCTCCAAAAGTGGAGTCGTGTGTTGGTGAATG		660
Query 661	TTTAACCCATTAAGATCTAAAAA 684		
Sbjct 661	TTTAACCCATTAAGCTAGCAAAAA 684		

Ocurre lo mismo en el caso del virus BCRV, donde se comprobó mediante una alineación que la secuencia solicitada al laboratorio para su síntesis corresponde en un 99% a la secuencia recibida.