

ESTUDIO PRELIMINAR DE LAS INTERACCIONES DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) Y SU HUÉSPED

MEMORIA DE TESIS PRESENTADA POR

Josep A. Navarro López

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA
UNIVERSIDAD POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DIRECTORES

Dra. Silvia Ambrós Palaguerri

Dra. Susana Ruiz Ruiz

Julio 2017

Silvia Ambrós Palaguerri, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Postdoctoral en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia - Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia, y Susana Ruiz Ruiz, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora Postdoctoral en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el licenciado en Biología Josep Amadeu Navarro López ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con el título “Estudio preliminar de las interacciones del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y su huésped”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 1 de junio de 2017.



Fdo.: Silvia Ambrós Palaguerri



Susana Ruiz Ruiz

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	7
NOMENCLATURA PASES CAPÍTULO IV	17
RESUMEN	23
RESUM	31
ABSTRACT	35
INTRODUCCIÓN GENERAL	41
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	95
CAPÍTULO I	101
CAPÍTULO II	185
CAPÍTULO III	219
CAPÍTULO IV	267
DISCUSIÓN GENERAL	375
CONCLUSIONES	391
BIBLIOGRAFÍA	399
ANEXO	479

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, virus de las manchas cloróticas de la hoja de la manzana

AGO: *Argonaute*, Argonauta

AM: *sour orange*, naranjo amargo

AP-MS: *affinity purification – mass spectroscopy*, purificación por afinidad – espectroscopía de masas

ATP: *adenosine triphosphate*, adenosina trifosfato

BAC: *bacterial artificial chromosome*, cromosoma artificial bacteriano

BaMV: *Bamboo mosaic virus*, virus del mosaico del bambú

BiFC: *bimolecular fluorescent complementation*, complementación bimolecular fluorescente

BMV: *Brome mosaic virus*, virus del mosaico del bromo

BNYVV: *Beet necrotic yellow vein virus*, virus del amarilleo necrótico de las venas de la remolacha

BSBMV: *Beet soil-borne mosaic virus*, virus del mosaico de la remolacha

BWYV: *Beet western yellows virus*, virus del amarilleo de la remolacha del oeste

BYV: *Beet yellows virus*, virus del amarilleo de la remolacha

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*, virus del mosaico de la coliflor

CC: *coiled coil*, hélice superenrollada

cDNA: *complementary DNA*, DNA complementario

CE: *controller element*, elemento controlador

CfMV: *Cocksfoot mottle virus*, virus del moteado del dátilo

CIRV: *Carnation italian ringspot virus*, virus de la mancha anular del clavel italiano

CM: *Citrus macrophylla*

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

CNV: *Cucumber necrosis virus*, virus de la necrosis del pepino

co-IP: *co-immunoprecipitation*, co-inmunoprecipitación

CP: *capsid protein*, proteína de la cápsida

CPm: *capsid protein minor*, proteína de la cápsida minoritaria

cRNA: *complementary RNA*, RNA complementario

CTV: *Citrus tristeza virus*, virus de la tristeza de los cítricos

CW: *cell wall*, pared celular

CWMV: *Chinese wheat mosaic virus*, virus del mosaico del trigo chino

DAS-ELISA: *double antibody sandwich ELISA*, ELISA mediante sándwich de dos anticuerpos

DCL: *Dicer-like protein*, proteína de la familia Dicer

DL: *decline*, decaimiento

DNA: *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

dNTPs: *triphosphate deoxynucleotide*, desoxirribonucleótido trifosfato

DPI: *days post-inoculation*, días post-inoculación

DRB: *dsRNA binding protein*, proteína de unión a dsRNA

dRNA: *defective RNA*, RNA defectivo

dsRNA: *double-stranded RNA*, RNA de doble cadena

EDS: *enhanced disease susceptibility*, susceptibilidad a enfermedades aumentada

EF: *elongation factor*, factor de elongación

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FL: *full length*, longitud completa

FLG: *full length GFP*, longitud completa con GFP

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GDP: *guanosine diphosphate*, guanosina difosfato

GFP: *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde

gRNA: *genomic RNA*, RNA genómico

GRV: *Groundnut rosette virus*, virus de la roseta del cacahuete

GST: *glutathione S-transferase*, glutatión S-transferasa

GTP: *guanosine triphosphate*, guanosina trifosfato

HAV: *Hepatitis A virus*, virus de la hepatitis A

HCRSV: *Hibiscus chlorotic ringspot virus*, virus de las manchas cloróticas en anillo del hibisco

HEL: *helicase*, helicasa

HIV: *Human immunodeficiency virus*, virus de la inmunodeficiencia humana

HR: *hypersensitive response*, respuesta hipersensible

HSP: *heat shock protein*, proteína de choque térmico

HSV: *Herpes simplex virus*, virus del herpes simple

IAV: *Influenza A virus*, virus de la influenza A

IF: *initiation factor*, factor de iniciación

LHC: *light harvesting complex*, complejo de captación de luz

LM: *Mexican lime*, Lima mexicana

LMT: *low molecular-weight tristeza*, virus de la tristeza de bajo peso molecular

LRR: *leucine rich region*, región rica en leucinas

MET: *methyltransferase*, metiltransferasa

miRNA: microRNA

MNSV: *Melon necrotic spot virus*, virus de las manchas necróticas del melón

MPI: *months post-inoculation*, meses post-inoculación

mRNA: *messenger RNA*, RNA mensajero

MS: *mass spectroscopy*, espectroscopía de masas

NB: *nucleotide binding domain*, dominio de unión a nucleótidos

ND: *sweet orange*, naranjo dulce

NES: *nuclear export signal*, señal de exportación nuclear

NLS: *nuclear localization signal*, señal de localización nuclear

NoLS: *nucleolar localization signal*, señal de localización nucleolar

NOSt: *nopaline synthase terminator*, terminador de la nopalina sintasa

ORF: *open reading frame*, pauta de lectura abierta

PAD: *phytoalexin deficient*, falta de fitoalexina

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida

PCD: *programmed cell death*, muerte celular programada

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

PD: *plasmodesmata*, plasmodesmos

PDR: *pathogen-derived resistance*, resistencia derivada de patógeno

PIP: *protein-protein interactions*, interacciones proteína-proteína

POM: *grapefruit*, pomelo

PoPit: *potato protease inhibitor terminator*, terminador del inhibidor de proteasa de la patata

PPV: *Plum pox virus*, virus de la sharka

PRO: *protease*, proteasa

PS: *photosystem*, fotosistema

PTGS: *post-transcriptional gene silencing*, silenciamiento génico post-transcripcional

PVA: *Potato virus A*, virus A de la patata

PVX: *Potato virus X*, virus X de la patata

qRT-PCR: *quantitative RT-PCR*, RT-PCR cuantitativa

RAR: *required for Mla12 resistance*, requerido para la resistencia de Mla12

RCA: *RubisCO activase*, RubisCO activasa

RCNMV: *Red clover necrotic mosaic virus*, virus del mosaico necrótico del trébol rojo

RDR: *RNA dependent RNA polymerase*, RNA polimerasa dependiente de RNA

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

RE: *endoplasmic reticulum*, retículo endoplásmico

RFP: *red fluorescent protein*, proteína fluorescente roja

RISC: *RNA-induced silencing complex*, complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNA: *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

RNA^t: *total RNA*, RNA total

- RNP:** *ribonucleoprotein*, ribonucleoproteína
- ROS:** *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno
- RSV:** *Rice stripe virus*, virus del rayado del arroz
- RT-PCR:** *reverse transcription PCR*, PCR de transcripción reversa
- SAR:** *systemic acquired resistance*, resistencia sistémica adquirida
- SARS:** *severe acute respiratory syndrome*, síndrome respiratorio agudo grave
- SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- siRNA:** *small interfering RNA*, RNA de interferencia pequeño
- sgRNA:** *subgenomic RNA*, RNA subgenómico
- SGT:** *suppressor of the G2 allele of Skp1*, supresor del alelo G2 de Skp1
- SMV:** *Soybean mosaic virus*, virus del mosaico de la haba de soja
- SOD:** *superoxide dismutase*, superóxido dismutasa
- SP:** *stem pitting*, acanaladuras en la madera
- SPCSV:** *Sweet potato chlorotic stunt virus*, virus del enanismo clorótico de la batata
- SqLCV:** *Squash leaf curl virus*, virus de las hojas enrolladas de la calabaza
- SSCP:** *single-stranded conformational polymorphism*, polimorfismo conformacional de cadena sencilla
- ssDNA:** *single-stranded DNA*, DNA de cadena sencilla
- ssRNA:** *single-stranded RNA*, RNA de cadena sencilla
- SY:** *seedling yellows*, amarilleo de plantas de semilla
- TAV:** *Tomato aspermy virus*, virus de la aspermia del tomate

TBSV: *Tomato bushy stunt virus*, virus del enanismo arbustivo del tomate

TCV: *Turnip crinkle virus*, virus del arrugamiento del nabo

TEV: *Tobacco etch virus*, virus del grabado del tabaco

TGB: *triple gene block*, bloque triple de genes

TGS: *transcriptional gene silencing*, silenciamiento génico transcripcional

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

ToLCJV-A: *Tomato leaf curl Java virus A*, virus A del rizado de las hojas del tomate de Java

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

TOM: *tonoplast transmembrane protein*, proteína transmembrana del tonoplasto

ToRSV: *Tomato ringspot virus*, virus de las manchas anulares del tomate

tRNA: *transfer RNA*, RNA de transferencia

TRV: *Tobacco rattle virus*, virus del cascabeleo del tabaco

TuMV: *Turnip mosaic virus*, virus del mosaico del nabo

TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*, virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate

TYMV: *Turnip yellow mosaic virus*, virus del mosaico amarillento del nabo

UTR: *untranslated region*, región no traducible

VIGS: *virus-induced gene silencing*, silenciamiento génico inducido por virus

VSV: *vesicular stomatitis virus*, virus de la estomatitis vesicular

WDV: *Wheat dwarf virus*, virus del enanismo del trigo

WPI: *weeks post-inoculation*, semanas post-inoculación

WT: *wild type*, tipo salvaje

WYMV: *Wheat yellow mosaic virus*, virus del mosaico amarillento del trigo

Y2H: *yeast two-hybrid system*, sistema del doble híbrido en levadura

YFP: *yellow fluorescent protein*, proteína fluorescente amarilla

NOMENCLATURA PASES CAPÍTULO IV

NOMENCLATURA PASES CAPÍTULO IV

CTV-C: viriones correspondientes al aislado original T36 de CTV procedentes de cítricos.

CTV-Cit o CTV-T36: aislado original (salvaje) T36 de CTV procedente de cítricos.

CTV-T36-GFP (o T36G): aislado clonal T36-GFP de CTV (que contiene el gen foráneo de la GFP) mantenido en cítricos y procedente de la inoculación mecánica del clon de cDNA infeccioso original de T36 (cedido por el grupo del Dr. Dawson, Florida, CREC).

CTV-NB: aislado T36 (o T36-GFP) de CTV procedente de la infección sistémica de *N. benthamiana* obtenida mediante agroinfiltración o inoculación mecánica de CTV-T36 o CTV-T36G.

CTV-FL: linaje FL (*full length*) del aislado T36 de CTV correspondiente al clon de cDNA infeccioso del aislado T36 de CTV.

CTV-FLG: linaje FLG (*full length* que incorpora el gen de la GFP) correspondiente al clon de cDNA infeccioso del aislado T36 de CTV.

P-FL: pase parental de T36 en *N. benthamiana* procedente de la infección sistémica obtenida mediante agroinoculación del clon de cDNA infeccioso CTV-T36, definido como linaje FL.

PG: pase parental de T36-GFP en *N. benthamiana* procedente de la infección sistémica obtenida mediante agroinoculación del clon de cDNA infeccioso CTV-T36-GFP, definido como linaje FLG.

PxFL (o abreviado Px): pase evolutivo número x del linaje FL de CTV en *N. benthamiana*.

PxFLG (o abreviado PxG): pase evolutivo número x del linaje FLG de CTV en *N. benthamiana*.

PxFL-Citz (o abreviado Px-Citz): secuencia consenso del pase PxFL (correspondiente al experimento de evolución de pases seriados en *N. benthamiana*), una vez de regreso a cítricos después de z años de evolución.

PxG-Citz: secuencia consenso del pase PxG (correspondiente al experimento de evolución de pases seriados en *N. benthamiana*), una vez de regreso a cítricos después de z años de evolución.

Ino-M Px: inoculaciones mecánicas del linaje FL en plantas de *N. benthamiana* no pre-tratadas y procedente del pase evolutivo x obtenido previamente en el experimento general de pases evolutivos.

Ino-M PxG: inoculaciones mecánicas del linaje FLG en plantas de *N. benthamiana* no pre-tratadas y procedente del pase evolutivo xG obtenido previamente en el experimento general de pases evolutivos.

RESUMEN

RESUM

ABSTRACT

RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el agente causal de la virosis más destructiva de los cítricos a nivel mundial. Es un closterovirus con un RNA genómico (gRNA) de ssRNA (+) y ~20 Kb organizado en 12 pautas de lectura abierta (ORFs) que codifican al menos 17 proteínas, algunas de función desconocida. Las proteínas p25 (CP mayoritaria) y p27 (CP minoritaria) forman parte de un grupo de genes implicados en el ensamblaje del virión, y se ha demostrado que p25 junto con p20 y p23 son supresores de silenciamiento génico en algunas especies de *Nicotiana*, y la última es también un determinante de patogénesis. CTV tiene una gama de huéspedes muy restringida y de forma natural sólo infecta el floema de algunas especies de cítricos. La complejidad biológica y molecular de este virus y sus huéspedes naturales dificulta el estudio de los determinantes patogénicos y/o los mecanismos responsables de los síndromes económicamente más importantes. Por ello, para trabajar con este patosistema virus-huésped, se requiere un huésped experimental adecuado y un sistema genético eficiente de CTV. Durante los últimos años hemos desarrollado un sistema genético de CTV basado en la agroinfección sistémica de *Nicotiana benthamiana*, una especie no-natural de este virus, con clones infecciosos del genotipo T36. Dicha infección va acompañada de síntomas característicos, algunos de los cuales son similares a los que el virus induce en cítricos. Por ello, en el presente trabajo hemos utilizado este patosistema como base para abordar dos objetivos principales: i) el análisis preliminar de las interacciones virus-huésped, realizando diversas aproximaciones a la función de algunas proteínas de CTV y ii) un estudio de evolución y adaptación del virus a este nuevo huésped herbáceo.

La interacción CTV-*N. benthamiana* es muy variable y genotipo-dependiente, sólo algunos aislados se replican en esta especie y únicamente T36 la infecta sistémicamente. La respuesta diferencial de los genotipos de CTV en esta especie permitiría analizar los factores de la interacción virus-huésped como paso previo a su estudio en cítricos. En este trabajo, abordamos la función de las proteínas p20 y p25 de tres aislados de CTV que difieren en sus características patogénicas. La expresión transitoria de las p20 y

p25 fusionadas a proteínas fluorescentes y su observación al microscopía confocal, reveló su idéntica localización subcelular en *N. benthamiana* y cítricos. La proteína p20 de los aislados T36, T318A y T385 se localizó en el citosol y el núcleo celular en agregados amorfos asociados a regiones perinucleares e inclusiones nucleares puntuales. Su co-expresión con el marcador nucleolar de fibrilarina mostró su potencial interacción con ésta y su re-distribución a regiones asociadas a membrana. Esta localización sería importante para su acción patogénica y supresora.

En cambio, la expresión transitoria, y también estable en el contexto de una infección viral, de la p25 de T36, T318A y T385 de CTV reveló una localización diferencial. Mientras la de T36 y T385 fue nuclear, la de T318A fue citosólica. Un análisis detallado de las regiones implicadas en dicha localización, reveló la existencia de una señal de exportación nuclear NES rica en leucinas en la región Nt de la proteína, en la que el aminoácido 31, una leucina en los aislados agresivos como T318A y una valina en T36 y T385, es esencial para la exportación nuclear. Un clon infeccioso de T36 con este único cambio en su p25 fue incapaz de infección sistémica en *N. benthamiana*. Otros residuos de la región Nt proximal y un motivo rico en aminoácidos hidrofóbicos en la región 64 a 74, también regularían la localización celular de p25.

Un análisis de la capacidad patogénica de p20 y p25 en *N. benthamiana* en un contexto de infección viral heterólogo a través de PVX, mostró que p25 no es un determinante de patogenicidad en esta especie, pero p20 sí. Su expresión acentúa los síntomas y la necrosis inducida por PVX de forma similar a p23. Se determinó que la p20 de T36 tiene un mayor efecto patogénico. Hemos determinado que la capacidad supresora del silenciamiento génico a larga distancia de p25 en el huésped *N. benthamiana* es débil, y que la p25 de T36 suprime mejor que la de los otros aislados.

Por otra parte, hemos obtenido el interactoma de las proteínas p25 de T36 y T318A con proteínas del huésped *N. benthamiana* mediante su expresión transitoria fusionadas a una etiqueta Strep-tag II, posterior purificación de los complejos proteína-proteína y análisis proteómico. El interactoma de la p25-T36 resultó mucho más complejo y diverso que el de la p25-T318A, interviniendo potencialmente en mayor número de procesos metabólicos de fotosíntesis, actividad redox, homeóstasis y transporte celular,

biosíntesis y degradación de proteínas, unión a proteínas de los plastidios y ácidos nucleicos o de respuesta a estrés (biótico y oxidativo) o defensa mediada por la ruta del jasmónico, del ciclo de metilación, señalización por ROS y proteínas HSP. Las interacciones mayoritarias de la p25-T318A se relacionaron con transporte/localización y respuesta a estrés, principalmente con interactores implicados en procesos de apoptosis, patogénesis y proteínas HSP, de unión a calcio o redoxinas. Ambas p25 tendrían como interactores principales gran número de componentes de los fotosistemas I y II y de la estructura del citoesqueleto implicadas en la citocinesis y organización celular, como actinas y tubulinas, diferentes co-chaperonas y el factor de elongación eEF1. La p25-T36 mostró interactores potenciales diferenciales con factores de despolimerización de actina, de elongación de la traducción, determinadas subunidades de las ATP sintasas de orgánulos, acuaporinas de membrana y transporte intracelular y vacuolar, proteínas nucleares de regulación de la transcripción o del proteasoma. Muchos de estos interactores del huésped se han descrito en otros virus como necesarios en interacciones/infecciones virales susceptibles y podrían determinar en parte la respuesta diferencial de los aislados T36 y T318A en esta especie.

Con respecto al segundo objetivo, hemos conseguido la evolución experimental de CTV por pases seriados en *N. benthamiana* mediante injertos y pre-tratamiento de las plantas. Dicha evolución conlleva un conjunto de características adaptativas significativas como: el aumento del prendimiento de injertos, de la tasa neta de infectividad, del título viral y del adelanto de los síntomas causados en esta especie herbácea con el aumento de los pases. La mayor eficacia biológica de los virus evolucionados en este nuevo huésped permitió su capacidad de infectar directamente *N. benthamiana* por inoculación mecánica sin un tratamiento previo, con las tasas de infectividad sistémica más elevadas para los virus más evolucionados. Su adaptación al huésped quedó reflejada también en una mayor acumulación de siRNAs derivados de CTV a lo largo de los pases evolutivos, y un perfil enriquecido en siRNAs de menor tamaño, similar al de cítricos infectados de forma natural por CTV.

Las características adaptativas también se reflejaron a nivel molecular en la variabilidad genética y estructura de las poblaciones

de los virus evolucionados en dos linajes independientes. Ambos linajes mostraron convergencias evolutivas a nivel molecular. A lo largo de los pases evolutivos se acumularon numerosas mutaciones concentradas en una región de la poliproteína y en el gen *p23*. La mayoría aparecieron a partir del sexto pase (P6) y se fijaron en las poblaciones de ambos linajes de forma convergente, tres en la poliproteína, y cinco en el gen *p23*, sugiriendo su naturaleza adaptativa. En las poblaciones más evolucionadas también se detectaron sustituciones *de novo* que afectaban a los genes *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* y *p20*, y los extremos del virus.

Las filogenias de las poblaciones virales evolucionadas en *N. benthamiana* reflejaron su historia evolutiva y los sucesos de convergencia. La estructura de las cuasiespecies virales de *p23* reveló que éstas siguen el concepto de “memoria de cuasiespecies”, con la variante ancestral de T36 salvaje retenida en la población como un genoma minoritario. Se detectaron dos posiciones en la poliproteína y tres en *p23* sometidas significativamente a selección negativa, y en general la mayoría de sustituciones observadas eran sinónimas y seguían procesos de selección purificadora.

Virus evolucionados en *N. benthamiana* resultaron menos infecciosos inicialmente por inoculación mecánica de regreso a cítricos, y se acumularon menos que el virus parental durante el primer año. Los virus del último pase once (P11) se re-adaptaron más rápidamente a su regreso a cítricos recuperando antes su capacidad infecciosa y título viral durante los dos años posteriores. Dicha re-adaptación de los virus evolucionados en *N. benthamiana* a cítricos, se reflejó a nivel molecular en la pérdida progresiva de las mutaciones adquiridas en el huésped herbáceo a lo largo de los años de evolución en cítricos. De hecho, después de tres años la secuencia consenso de las poblaciones virales había revertido por completo a la del virus salvaje T36 de cítricos, que representaría la más eficaz biológicamente en el huésped natural.

Con respecto a las características biológicas de los virus evolucionados en *N. benthamiana* de regreso a su huésped natural, se comprobó que los de pase quinto infectaron peor los huéspedes *Citrus macrophylla*, *Lima mexicana* y naranjo amargo, mientras que los de P11 fueron menos patogénicos en los huéspedes resistentes naranjo amargo y pomelo e indujeron síntomas más suaves de *seedling yellows* y enanismo. Ello indicaba que la evolución y

adaptación al huésped de CTV habría tenido un cierto coste en la pérdida de la capacidad infecciosa del virus en determinados de sus huéspedes cítricos y en la inducción de patogénesis.

RESUM

El virus de la tristesa dels cítrics (CTV) és l'agent causal de la virosi més destructiva dels cítrics a nivell mundial. És un closterovirus amb un RNA genòmic (gRNA) de ssRNA(+) i ~20 Kb organitzat en 12 pautes de lectura oberta (ORFs) que codifiquen, al menys, 17 proteïnes, algunes de les quals de funció desconeguda. Les proteïnes p25 (CP) i p27 (CPm) formen part d'un grup de gens implicat en l'assemblatge del virió, i s'ha demostrat que p25, junt a p20 i p23, són supressors de silenciament gènic en algunes espècies de *Nicotiana*, i la última també és un determinant de patogènesi. La gama d'hostes de CTV és molt restringida i de forma natural sols infecta el floema d'algunes espècies de cítrics. La complexitat biològica i molecular d'aquest virus i els seus hostes naturals dificulta l'estudi dels determinants patogènics i/o els mecanismes responsables de les síndromes econòmicament més importants. Per això, per a treballar amb aquest patosistema virus-hoste, es requereix un hoste experimental adequat i un sistema genètic eficient de CTV. Durant els últims anys hem desenvolupat un sistema genètic de CTV basat en l'agroinfecció sistèmica de *Nicotiana benthamiana*, una espècie no-natural d'aquest virus, amb clons infecciosos del genotip T36. Aquesta infecció va acompanyada de símptomes característics, alguns dels quals són similars als que el virus indueix en cítrics. Per tant, en el present treball hem utilitzat aquest patosistema com a base per abordar dos objectius principals: i) l'anàlisi preliminar de les interaccions virus-hoste, realitzant diverses aproximacions a la funció d'algunes proteïnes de CTV, i ii) un estudi d'evolució i adaptació del virus a aquest nou hoste herbaci.

La interacció CTV-*N. benthamiana* és molt variable i genotip dependent, ja que sols alguns aïllats es repliquen en aquesta espècie i únicament T36 la infecta sistèmicament. La resposta diferencial dels genotips de CTV en aquesta espècie permetria analitzar els factors de la interacció virus-hoste com a pas previ al seu estudi en cítrics. En aquest treball hem abordat la funció de les proteïnes p20 i p25 de tres aïllats de CTV que difereixen en les seues característiques patogèniques. L'expressió transitòria de les p20 i p25 fusionades a proteïnes fluorescents, i la seua observació al microscopi confocal, va revelar la seua idèntica localització

subcel·lular en *N. benthamiana* i cítrics. La proteïna p20 dels aïllats T36, T318A i T385 es va localitzar al citosol i el nucli cel·lular formant agregats amorfs associats a regions perinuclears, i inclusions nuclears puntuals. La seua co-expressió amb el marcador nucleolar de fibril·larina va mostrar la seua potencial interacció amb aquesta i la seua re-distribució a regions associades a la membrana. Aquesta localització seria important per a la seua acció patogènica i supressora.

En canvi, l'expressió transitòria, i també estable en el context d'una infecció viral, de la p25 de T36, T318A i T385 de CTV va revelar una localització diferencial. Mentre la de T36 i T385 fou nuclear, la de T318A fou citosòlica. Una anàlisi detallada de les regions implicades en eixa localització va revelar l'existència d'una senyal d'exportació nuclear (NES) rica en leucines a la regió Nt de la proteïna, on l'aminoàcid 31, una leucina en aïllats agressius com T318A i una valina en T36 i T385, és essencial per a l'exportació nuclear. Un clon infeccios de T36 amb aquest únic canvi a la seua p25 no fou capaç d'infectar sistèmicament *N. benthamiana*. Altres residus de la regió Nt proximal i un motiu ric en aminoàcids hidrofòbics a la regió 64-74, també regularien la localització cel·lular de p25.

L'anàlisi de la capacitat patogènica de p20 i p25 en *N. benthamiana* en un context d'infecció viral heteròloga a través de PVX, va mostrar que p25 no és un determinant de patogenicitat en aquesta espècie, però p20 sí. La seua expressió accentua els símptomes i la necrosi induïda per PVX de forma similar a p23. Es va determinar que la p20 de T36 té un major efecte patogènica. Hem determinat que la capacitat supressora del silenciament gènic a llarga distància de p25 en l'hoste *N. benthamiana* és dèbil, i que la p25 de T36 supprimeix millor que la dels altres dos aïllats.

Per altra banda, hem obtingut l'interactoma de les proteïnes p25 de T36 i T318A amb les proteïnes de l'hoste *N. benthamiana* mitjançant la seua expressió transitòria fusionades a una etiqueta Strep-tag II, posterior purificació dels complexos proteïna-proteïna i anàlisi proteòmica. L'interactoma de la p25-T36 va resultar molt més complex i divers que el de p25-T318A, intervenint potencialment en un major nombre de processos metabòlics de fotosíntesi, activitat redox, homeòstasi i transport cel·lular, biosíntesi i degradació de proteïnes, unió a proteïnes dels plastidis i àcids nucleics o de

resposta a estrés (biòtic i oxidatiu) o defensa mediada per la ruta del jasmònic, del cicle de metilació, senyalització per ROS i proteïnes HSP. Les interaccions majoritàries de la p25-T318A es relacionaren amb transport/localització i resposta a estrés, principalment amb interactors implicats en processos d'apoptosi, patogènesi i proteïnes HSP, d'unió a calci o redoxines. Ambdues p25 tindrien com a interactors principals un gran nombre de components dels fotosistemes I i II i de l'estructura del citoesquelet implicades en la citocinesi i organització cel·lular, com actines i tubulines, diverses co-xaperones i el factor d'elongació eEF1. La p25-T36 va mostrar interactors potencials diferencials com factors de despolimerització d'actina, d'elongació de la traducció, determinades subunitats de les ATP sintases d'òrgànuls, aquaporines de membrana i transport intracel·lular i vacuolar, i proteïnes nuclears de regulació de la transcripció o del proteasoma. Molts d'aquests interactors de l'hoste s'han descrit en altres virus com necessaris en les interaccions/infeccions virals susceptibles i podrien determinar, en part, la resposta diferencial dels aïllats T36 i T318A en esta espècie.

Respecte al segon objectiu, hem aconseguit l'evolució experimental de CTV per passes seriatos en *N. benthamiana* mitjançant empelts i pre-tractament de les plantes. Aquesta evolució comporta un conjunt de característiques adaptatives significatives com: l'augment de la supervivència dels empelts, de la taxa neta d'infectivitat, de la càrrega viral i de l'ajornament dels símptomes causats en aquesta espècie herbàcia amb l'augment dels passes. La major eficàcia biològica dels virus evolucionats en aquest nou hoste va permetre la seua capacitat d'infectar directament *N. benthamiana* per inoculació mecànica sense un tractament previ, amb les taxes d'infectivitat sistèmica més elevades per als virus més evolucionats. La seua adaptació a l'hoste va quedar reflectida també amb una major acumulació de siRNAs derivats de CTV al llarg del passes evolutius, i un perfil enriquit en siRNAs de menor tamany, similar al de cítrics infectats de forma natural per CTV.

Les característiques adaptatives també es reflectiren a nivell molecular amb la variabilitat genètica i estructura de les poblacions dels virus evolucionats en dos llinatges independents. Ambdós llinatges mostraren convergències evolutives a nivell molecular. Al llarg del passes evolutius s'acumularen nombroses mutacions concentrades a una regió de la poliproteïna i al gen *p23*. La majoria

aparegueren a partir del sisé passe (P6) i es fixaren en les poblacions d'ambdós llinatges de forma convergent, tres a la poliproteïna i cinc al gen *p23*, suggerint la seua naturalesa adaptativa. A les poblacions més evolucionades també es detectaren substitucions *de novo* que afectaven als gens *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* i *p20*, i als extrems del virus.

Les filogènies de les poblacions virals evolucionades en *N. benthamiana* reflectiren la seua història evolutiva i els successos de convergència. L'estructura de les quasiespècies virals de *p23* va revelar que aquestes segueixen el concepte de "memòria de quasiespècies", amb la variant ancestral de T36 salvatge retinguda a la població com un genoma minoritari. Es detectaren dues posicions a la poliproteïna i tres a *p23* sotmeses significativament a selecció negativa, i en general la majoria de substitucions observades eren sinònimes i seguien processos de selecció purificadora.

Virus evolucionats a *N. benthamiana* resultaren menys infecciosos inicialment per inoculació mecànica de tornada a cítrics, i s'acumularen menys que el virus parental durant el primer any. Els virus del passe onze (P11) es re-adaptaren més ràpidament a la seua tornada a cítrics, recuperant abans la seua capacitat infecciosa i càrrega viral durant els dos anys posteriors. Aquesta re-adaptació dels virus evolucionats a *N. benthamiana* de tornada a cítrics es va reflectir a nivell molecular amb la pèrdua progressiva de les mutacions adquirides a l'hoste herbaci al llarg dels anys d'evolució en cítrics. De fet, després de tres anys, la seqüència consens de les poblacions virals va revertir per complet a la del virus T36 salvatge de cítrics, que representaria la més eficaç biològicament en l'hoste natural.

Respecte a les característiques biològiques dels virus evolucionats a *N. benthamiana* de tornada al seu hoste natural, es va comprovar que els del passe cinqué (P5) infectaren pitjor els hostes *Citrus macrophylla*, llima mexicana i taronger amarg, mentre que els de P11 foren menys patogènics als hostes resistent taronger amarg i pomelo, i induïren símptomes més suaus de *seedling yellows* i nanisme. Tot això indicava que l'evolució i adaptació de CTV a l'hoste hauria tingut un cert cost en la pèrdua de la capacitat infecciosa del virus en determinats dels seus hostes cítrics i en la inducció de patogènesi.

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of the most devastating citrus disease worldwide. It is a viral species of the Closterovirus genus, having a ~20 kb single-stranded and positive sense genomic RNA (gRNA) organized into 12 open reading frames (ORFs) potentially coding 17 protein products, some of which of unknown function. CTV proteins p25 (CP) and p27 (CPm) belong to a gene block involved in virion assembly. It has been demonstrated that p25, along with p20 and p23, are RNA silencing suppressors in some species of *Nicotiana*, being the latter a pathogenesis determinant. CTV host range is very restricted and in nature viral infections are limited to the phloem cells of some citrus species. CTV molecular and biological complexity makes very difficult the study of pathogenic determinants and/or the underlying mechanisms responsible for the most economically important syndromes. Consequently, working with this virus-host pathosystem requires an appropriate experimental host and an efficient CTV genetic system. In our laboratory we have developed a new CTV genetic system based on the agroinfection of *Nicotiana benthamiana* plants, a non-natural host, with infectious clones of the T36 isolate. That infection induces characteristic symptoms, some of which correlate with those caused by the virus in citrus plants. Thus, in the present study we have used this pathosystem to achieve two main objectives: i) a preliminary analysis of the virus-host interactions trying to infer the function of some viral proteins, and ii) an evolutionary and adaptation study of CTV to this non-natural herbaceous host.

CTV-*N. benthamiana* interactions are very variable and genotype-dependent, so only some isolates can replicate in this species and T36 is unique causing systemic infections. The differential response of CTV genotypes in this host would allow the analysis of virus-host interaction factors before its latter approach in citrus species. In this work, we studied the function of CTV p20 and p25 proteins from three different isolates differing in its pathogenic characteristics. Transient expression of p20 and p25 fused to fluorescent proteins and subsequent confocal microscopy analysis, showed an identical subcellular localization for both in *N. benthamiana* and citrus. The p20 protein of T36, T318A and T385

isolates localized in cytoplasm and nucleus forming amorphous aggregates associated with perinuclear regions, together with nuclear punctuate inclusions. Moreover, its co-expression with the nucleolar fibrillarin marker, showed a potential p20-fibrillarin interaction and a re-localization of the latter to membrane-associated regions. This localization would be important for p20 to display its pathogenic and suppressor activities.

On the other hand, transient and *in vivo* expression via a heterologous viral infection, showed a differential p25 subcellular localization dependent on the CTV isolate nature. While p25 of T36 and T385 localized in the nucleus, that of T318A did it in cytoplasm. A detailed analysis of the protein regions involved in this subcellular localization unveiled a leucine-rich nuclear export signal (NES) in the N-terminus (Nt) of the protein, in which aminoacid position 31 (where severe isolates, as T318A, have a leucine and milder ones, as T36 and T385, a valine) is essential for the nuclear export. In fact, an infectious T36 clone containing that mutation in its p25 was unable to infect systemically *N. benthamiana* plants. Additional residues in the proximal Nt region of the protein, together with a group of hydrophobic aminoacids comprising positions 64-74, may also be involved in the regulation of p25 localization.

The pathogenic ability of CTV p20 and p25 in *N. benthamiana* was tested through a PVX heterologous viral infection, showing that p25 was not a pathogenicity determinant in this species, albeit p20 it was. The expression of the latter increased PVX symptoms and necrosis as p23 does, determining the greater pathogenic ability of p20-T36 regarding that of p20-T318A. On the other hand, we have determined that p25 is a weak long distance silencing suppressor in *N. benthamiana*, with p25 of T36 displaying a better suppressor activity than that of the T318A and T385 isolates.

Besides, the interactome of the p25 proteins from isolates T36 and T318A with proteins of *N. benthamiana* was obtained through its transient expression fused to the Strep-tag II, follow by purification of plant protein-protein complexes and proteomic analysis. The p25-T36 interactome was more complex and diverse than that of p25-T318A, involving a greater number of metabolic processes, redox activities, homeostasis and cellular transport, biosynthesis and protein degradation, plastid and nucleic acid protein binding, biotic and oxidative stress, jasmonic-mediated defense, methylation, ROS

signalling and HSP proteins. On the other hand, most p25-T318A potential interactors were related to transport/localization and stress response, like apoptosis, pathogenesis-related and HSP proteins, Ca²⁺-binding proteins and redoxins. Both p25 would share a great number of interactors related to photosystems I and II components, cytoskeleton proteins like actins and tubulins, co-chaperones and translation elongation factors eEF1. The p25-T36 showed potential differential interactors with actin depolymerizing factors, translation elongation factors, ATP synthase subunits, aquaporins, and nuclear transcription and proteasome regulation factors. Most of them have been reported to be required for the infection ability of other plant viruses, and could explain, in part, the differential behaviour-response of CTV T36 and T318A isolates in this species.

Regarding the second objective, the experimental evolution of CTV in *N. benthamiana* was achieved through serial passages by graft inoculation and suppressor pre-treatment of plants. The evolution process showed adaptative traits as the increase of graft survival, infectivity rates and viral titers, and a decreased time for the onset of symptom development in this species. The increase in the biological fitness of these evolved virus populations led to the ability of CTV to infect healthy *N. benthamiana* plants by mechanical inoculation without any pre-treatment. Increase in systemic infectivity rates correlated with the number of passages. The adaptation to *N. benthamiana* was also reflected in: i) the detection of higher levels of siRNAs derived from CTV infection in that plants as long as serial passages increase and ii) an enrichment in smaller siRNAs in the profile, similar to what it is observed in natural infections of CTV in citrus.

Adaptive characteristics of evolved viral populations in *N. benthamiana*, were also correlated to their genetic variability and population structure. Two different evolved lineages showed convergent evolution processes reflected also at the molecular level. Along the serial passaging, several mutations accumulated in a specific region of the polyprotein and in the *p23* gene in the consensus sequences of the viral populations. Most of them appeared in the sixth passage (P6) and got fixed in both population lineages in a convergent way, with three of them in the polyprotein and five in the *p23* gene, thus suggesting its adaptive character. Also, in the most evolved populations, de novo single mutations were

found in *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* and *p20* genes, and in CTV's untranslated regions.

Phylogenies of evolved populations in *N. benthamiana* displayed its evolutionary history and convergent events. Viral quasispecies structure of *p23* followed the "quasispecies memory" concept, in which the ancestral T36 sequence was maintained as a minor genome in the viral populations along evolution. Two genetic positions in the polyprotein and three in the *p23* gene were significantly detected to be under negative selection pressure, and in general most substitutions were synonymous following a purifying selection.

CTV viruses evolved in *N. benthamiana* were found to be less infectious at initial stages of infection when they were back-inoculated to citrus plants, and showed a decreased viral titer during the first year post-inoculation. Viruses from the last eleven passage (P11) re-adapted faster to citrus, recovering its infectious ability and viral titer during the following two years. This re-adaptation of *N. benthamiana* viral populations back to citrus was correlated, at a molecular level, with the progressive loss of the mutations appeared during its evolution process in *N. benthamiana*. In fact, three years after citrus back-inoculations, the complete full-length consensus sequences of evolved lineages completely reverted to that of the T36 wild-type, which is the better adapted with highest fitness in the natural host.

Biological traits of *N. benthamiana* evolved viruses were also tested when back-inoculated to citrus, showing that the ability of viruses from the fifth passage (P5) to infect *Citrus macrophylla*, Mexican lime and sour orange was worse than the ancestral T36 wild-type virus. Conversely, the most evolved P11 viral populations were less pathogenic in resistant hosts like sour orange and grapefruit, thus inducing milder symptoms of seedlings yellows and stunting. Results presented here indicates that CTV evolution and adaptation to *N. benthamiana* species, would have an adaptative cost in the original citrus host, since a loss of infectious ability and pathogenesis induction has been observed in some citrus species.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS Y SU IMPORTANCIA ECONÓMICA

Los cítricos son un conjunto de especies e híbridos que pertenecen a los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*, incluidos en la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioideae*. Su origen se sitúa en el sudeste asiático, probablemente en China, aunque actualmente su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones con clima tropical y subtropical del mundo. Las especies de cítricos con mayor interés comercial se pueden englobar en cuatro grandes grupos: las 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 las zamboas (*C. grandis* (L.) Osb.) y pomelos (*C. paradisi* Macf.). Además de estas especies del género *Citrus*, otros cítricos de interés son los kumquats, pertenecientes al género *Fortunella*, y la única especie del género *Poncirus*, *P. trifoliata* (L.) Raf.

Los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2014) revelan que actualmente se dedican más de 7.5 millones de hectáreas (Ha) al cultivo de los cítricos en todo el mundo, con una producción anual de más de 135 millones de toneladas, siendo así el principal cultivo frutal del mundo. En España, donde las principales zonas de cultivo de cítricos se sitúan en las zonas costeras del este y del sur de la Península, se dedican más de 300.000 Ha a este cultivo con una producción anual de más de 6.4 millones de toneladas, lo que hace que nuestro país ocupe el sexto puesto en cuanto a producción total entre los países productores a nivel mundial, por detrás de China, Brasil, Estados Unidos, India y México.

Sin embargo, España es el principal país exportador de cítricos para consumo en fresco a nivel mundial, donde los productores venden a otros países alrededor del 60% del total cosechado, con unos ingresos brutos anuales de unos 2400 millones de euros, es decir, se trata de una de las fuentes de ingresos más importantes para el país. Además de esto, cabe destacar una fuerte actividad económica secundaria derivada de este cultivo (empresas

de fertilizantes, viveros, etc.), así como una gran demanda de mano de obra.

Debido a la importancia de este cultivo para la economía española, es muy importante disponer de material vegetal de alta calidad, tanto en variedades como en patrones, para asegurar el mantenimiento de la producción y la competitividad en este sector.

2. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

La tristeza es una de las enfermedades transmisibles por injerto que mayor repercusión ha tenido para los cítricos, no sólo por los daños económicos que ha causado, sino también por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo de las zonas afectadas. Esta enfermedad está causada por un closterovirus (*Citrus tristeza virus*, CTV) (Fawcett y Wallace, 1946; Kitajima y Costa, 1963; Bar-Joseph *et al.*, 1970, 1972; Flores *et al.*, 1975; Garnsey *et al.*, 1977) que, al igual que los cítricos, procede probablemente de Asia, donde estaría bien adaptado a las variedades de cítricos locales. Con el movimiento de material vegetal que se llevó a cabo durante los siglos XIX y XX, CTV fue dispersado a nuevas áreas cítricas donde se transmitió a nuevas variedades y combinaciones variedad-patrón.

La incidencia actual de CTV es desigual en casi todas las zonas cítricas del mundo siendo endémico en todas las zonas de África del Sur, Asia, Australia y Sudamérica. En los países cítricos del Mediterráneo, aunque está presente, en la mayoría de ocasiones no se ha estimado su incidencia real en campo directamente (como en Italia, Grecia), o bien la presencia de los aislados agresivos de tristeza es muy baja al sustituirse los patrones durante el siglo pasado por patrones tolerantes como en España (Cambra y Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2008). Se estima que sólo en España CTV causó la muerte de más de 50 millones de árboles de naranjo dulce, mandarina y pomelo injertados sobre naranjo amargo (Moreno *et al.*, 2008), y de unos 100 millones a nivel mundial.

2.1. Gama de huéspedes y síndromes

De forma natural, CTV infecta a plantas de la familia *Rutaceae*, aunque se ha transmitido de forma experimental a algunas especies del género *Passiflora* (Müller *et al.*, 1974; Cambra y Moreno, 2000) y a la especie herbácea *Nicotiana benthamiana* (Ambrós *et al.*, 2011). Dentro de la familia *Rutaceae* se ha detectado en la mayor parte de las especies y variedades de los géneros *Citrus* y *Fortunella*, y en algunas otras especies de géneros afines (Bar-Joseph y Lee, 1989; Bar-Joseph *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 2008). No obstante, especies como *P. trifoliata* (L.) Raf. y algunos híbridos de ésta con naranjo dulce o pomelo son resistentes a la mayoría de los aislados de CTV e impiden su acumulación en la planta (Garnsey *et al.*, 1987).

Un amplio abanico de factores influyen y determinan el tipo e intensidad de los daños causados por CTV en campo, entre los que se encuentran las especies de cítricos infectadas, el patrón sobre el que están injertadas, el aislamiento del virus y las condiciones ambientales (Grant y Costa, 1951; Aubert y Bové, 1984; Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993). Algunos aislados resultan asintomáticos incluso en las especies más sensibles, pero la mayoría de ellos producen uno o varios de los siguientes síndromes: 1) decaimiento de plantas propagadas sobre naranjo amargo (*decline*, DL), síndrome conocido como “tristeza” y que da nombre a la enfermedad; 2) acanaladuras en la madera principalmente de importancia en naranjo dulce y pomelo (*stem pitting*, SP); y 3) amarilleo de las plantas de semilla de algunas especies (*seedling yellows*, SY) (Fig. 1).

El síndrome de decaimiento de plantas injertadas sobre naranjo amargo fue el primero que se describió debido a la importancia económica de los daños causados y a la muerte masiva de árboles en las citriculturas mundiales basadas en este patrón. Este fenómeno es el resultado de la muerte del floema del naranjo amargo por debajo de la línea de injerto causada por el virus (Schneider, 1959), donde desencadena la necrosis de los tubos cribosos. Esto conlleva la desnutrición y muerte de las raicillas y, como consecuencia, el amarilleo y la progresiva defoliación de la copa (Fig. 1A y B). El proceso de decaimiento suele durar varios años, excepto en el síndrome de colapso o *quick decline* que

produce la muerte rápida del árbol, dejándolo totalmente seco, con las hojas y frutos colgando de las ramas (Ben-Ze'ev *et al.*, 1989) (Fig. 1B). Sin embargo, lo que ocurre habitualmente en las infecciones por CTV es un deterioro progresivo de la planta, empezando por un amarilleo general de las hojas, pérdida de follaje y muerte de ramillas, reducción del crecimiento y número de brotaciones y producción de frutos pequeños de color pálido, que termina con la muerte de la planta al cabo de varios años (McClellan, 1974; Moreno *et al.*, 1983, 2008) (Fig. 1A). La mayoría de las especies de cítricos son sensibles al decaimiento cuando están propagadas sobre naranjo amargo, si bien se han descrito aislados que son asintomáticos sobre esta combinación (Bové *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1991).

Las acanaladuras en la madera están producidas por los aislados más agresivos de CTV, tanto en plantas injertadas sobre naranjo amargo, como en muchas especies y variedades de cítricos injertadas sobre cualquier patrón. Este síndrome conlleva la deformación de ramas, troncos y tallos (Fig. 1E) (Grant, 1959; McClellan, 1974), enanismo, fruta de pequeño calibre que conlleva a mermas en la producción y a la calidad de la fruta (Fig. 1F), que además puede ir acompañado de clorosis nervial en hojas jóvenes (Fig. 1C) (Sasaki, 1981; Da Graça *et al.*, 1984).

Por último, el síndrome de SY se caracteriza por un amarilleo (clorosis) generalizado en las nuevas brotaciones (Fig. 1D) y una detención del crecimiento en plantas de semilla de limonero, naranjo amargo o pomelo cuando se inoculan con algunos aislados de CTV (Fraser, 1952; McClellan y Van de Plank, 1955; Wallace, 1978). Este síndrome, vinculado a aislados severos, se detecta experimentalmente en el invernadero sin aparecer normalmente en el campo, y sirve para la caracterización biológica de los aislados.

2.2. Diagnóstico del virus y caracterización de aislados

El diagnóstico de CTV se ha venido realizando de forma tradicional mediante bioensayos de infectividad en invernadero (Roistacher, 1991) utilizando huéspedes sensibles.

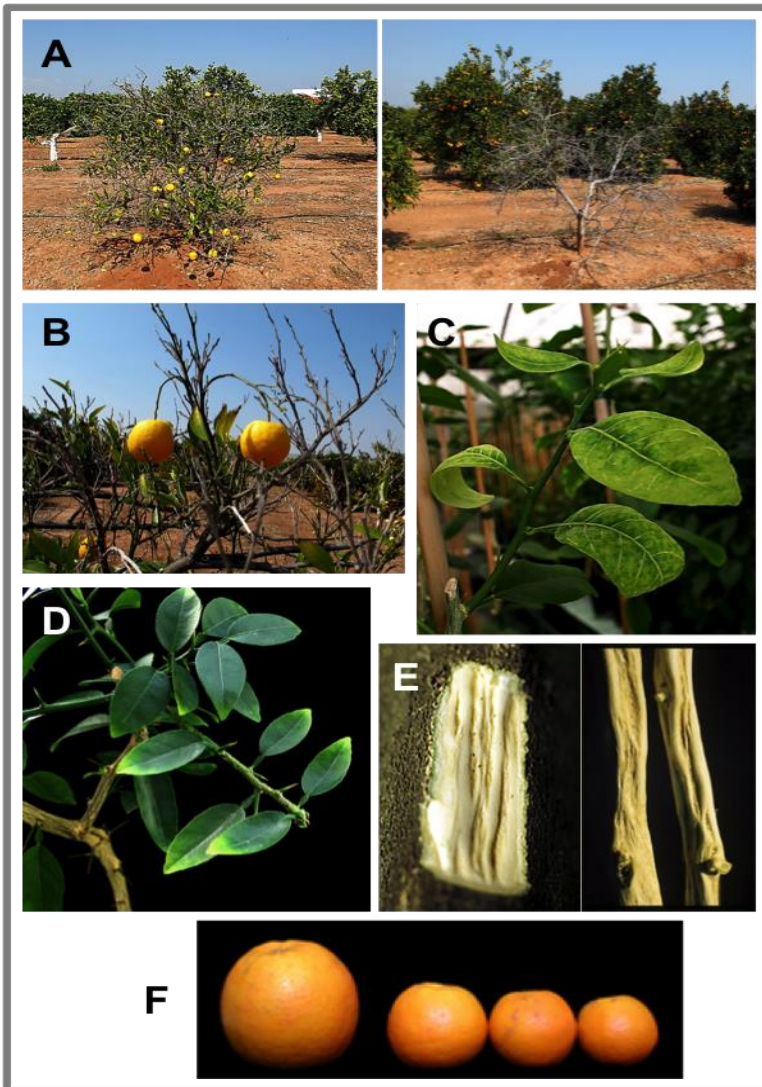


Fig. 1. Síndromes y síntomas característicos inducidos por CTV. A) Decaimiento (DL) de naranjo dulce injertado sobre patrón de naranjo amargo (izquierda) y progresión de la enfermedad hasta la muerte de la planta (derecha). B) Detalle de la seca de ramillas y pérdida de valor del fruto. C) Aclaramiento de las nerviaduras (*vein clearing*) y *vein corking* inducido por el aislado T318A en lima mexicana. D) SY inducido por el aislado T36 en lima mexicana. E) SP inducido por el aislado severo T388 en pomelo injertado sobre patrón *Poncirus trifoliata* (izquierda) y SP inducido por el aislado T318A en dos variedades comerciales de naranjo dulce injertadas sobre *C. carrizo*. F) Producción de fruta pequeña (derecha) frente a fruta normal (izquierda) inducida por aislados de tipo SP.

Para ello, el virus se inocula por injerto en especies indicadoras sensibles a los distintos síndromes de CTV (*C. macrophylla*, lima mexicana, pomelo, etc.) y se observan los síntomas inducidos al cabo del tiempo. Se trata de un procedimiento específico y sensible para el diagnóstico, que permite diferenciar aislados según su virulencia y síntomas específicos, pero a su vez es un proceso lento, caro y poco eficiente para el análisis masivo de muestras. Además, se han detectado aislados de CTV que son asintomáticos incluso en las especies más sensibles (Bové *et al.*, 1988).

Con la purificación del virus y la producción de anticuerpos contra la proteína de la cápsida, el método más utilizado pasó a ser la detección serológica mediante inmunoensayos de tipo ELISA (Fig. 2) (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 1979, 1991; Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990; Garnsey *et al.*, 1993; Nikolaeva *et al.*, 1998; Narváez *et al.*, 2000), cuyo uso combinado, permite la detección de todos los aislados con los que se ha trabajado (Cambra *et al.*, 1990) y una mayor eficiencia en la manipulación de un gran número de muestras ya sea por ELISA convencional o IP-ELISA.

Posteriormente, tras la obtención de la secuencia completa del genoma de varios aislados de CTV, se desarrollaron diversos métodos de diagnóstico basados en la detección específica del RNA viral como técnicas de hibridación molecular con sondas de DNA o RNA (Rosner y Bar-Joseph, 1984; Narváez *et al.*, 2000; Barbarossa y Savino, 2006) y tecnologías de RT-PCR convencional (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Finalmente, las técnicas de detección más sensibles se basan en protocolos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real, que permiten la detección específica, sensible y la cuantificación del virus en diferentes tejidos infectados y pulgones virulíferos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Saponari *et al.*, 2008). Diversas técnicas de este tipo se han optimizado para la detección y cuantificación de variantes de secuencia específicas relacionadas con aislados de distinta virulencia (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) presentes en los aislados de CTV.

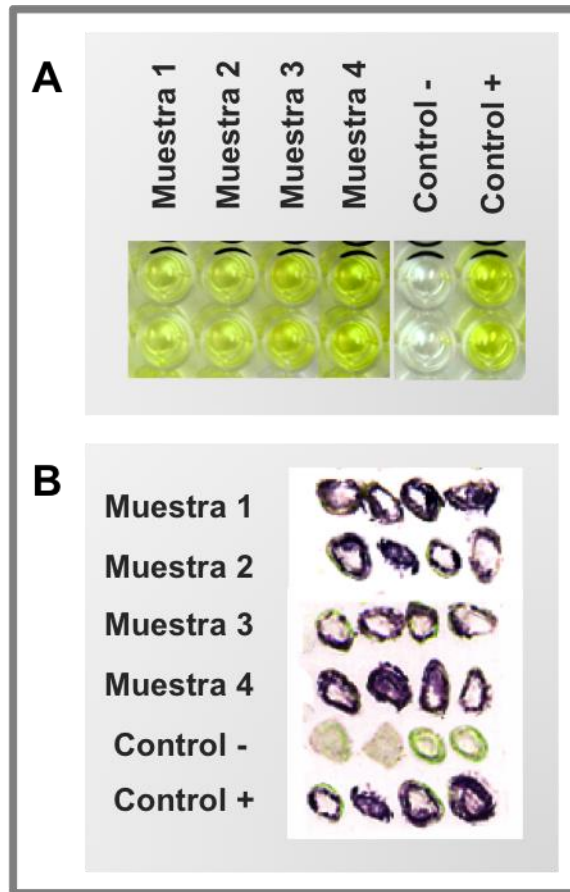


Fig. 2. Detección serológica de CTV mediante inmunoensayos de tipo DAS-ELISA en placa multipocillo a partir de material vegetal homogeneizado (A), o en membrana de nitrocelulosa partiendo de cortes transversales de tallos y peciolo tiernos de cítricos utilizando la técnica de inmunoimpresión IP-ELISA (Garnsey *et al.*, 1993) (B).

2.3. Mecanismos de transmisión

La dispersión de CTV a nuevas áreas ocurre como consecuencia de la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión local dentro de las plantaciones se produce fundamentalmente por diversas especies de pulgones (o por instrumentos de poda en menor medida). El virus puede transmitirse,

de forma experimental, por medio de algunas especies de cuscuta (Weathers y Harjung, 1964) o por inoculación mecánica mediante cortes en el floema con una cuchilla impregnada de savia de planta infectada (Garnsey *et al.*, 1977; Garnsey y Müller, 1988), aunque su eficiencia es muy baja. La transmisión de CTV mediante semilla no se ha podido demostrar (McClellan, 1957).

La eficiencia de la transmisión por pulgones, que ocurre de forma semi-persistente, depende de la especie transmisora, del aislado de CTV, de las especies de planta donante y receptora, y de las condiciones ambientales (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Raccah *et al.*, 1980; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984, 1988; Roistacher y Bar-Joseph, 1987; Yokomi y Garnsey, 1987). El vector más eficiente, *Toxoptera citricida* (Fig. 3) (Costa *et al.*, 1968; McClellan, 1975; Lastra *et al.*, 1991; Grisoni y Riviéri, 1993; Yokomi *et al.*, 1994), está presente en Asia, América del Sur y parte de América Central, islas del Caribe, Florida y África Central y del Sur. En los últimos años también se ha detectado en zonas del norte de España y Portugal (Ilharco *et al.*, 2005), tras pasar por la isla de Madeira, lo que podría suponer una amenaza para la citricultura de la cuenca del Mediterráneo si no queda confinado en el norte de la Península. Además, a este vector se le ha asociado con una mejor eficiencia en la transmisión de aislados virulentos (Roistacher *et al.*, 1980). En cambio, el segundo pulgón transmisor de CTV más eficiente es *Aphis gossypii* (Fig. 3) (Norman *et al.*, 1968; Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher *et al.*, 1984; Raccah y Singer, 1987; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988; Yokomi *et al.*, 1989), que es el principal vector presente en Norteamérica y la cuenca del Mediterráneo. Otras especies de pulgones como *Aphis spiraecola* y *Toxoptera aurantii* (Fig. 3) son menos eficientes, pero pueden tener un papel más importante en la dispersión de CTV en algunas zonas debido a que sus poblaciones son más numerosas que las de *A. gossypii* (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Yokomi y Garnsey, 1987).

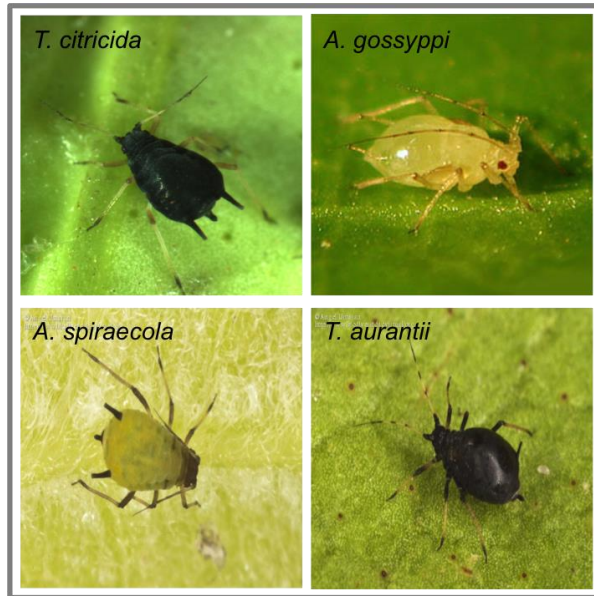


Fig. 3. Principales pulgones responsables de la transmisión de CTV entre las distintas especies de cítricos.

Recientemente, con la obtención de un clon agroinfeccioso de cDNA del aislado T36, se ha conseguido infectar sistémicamente con CTV el huésped herbáceo experimental *Nicotiana benthamiana* (Ambrós *et al.*, 2011) (ver más adelante en el apartado 3.7). Los viriones de CTV que se acumulan en estas plantas resultan infecciosos en cítricos al inocularlos mecánicamente y reproducen los síntomas del aislado original de cítricos.

Por otra parte, partiendo de inflorescencias y peciolo de plantas de *N. benthamiana* infectadas con CTV, como se ha indicado en el párrafo anterior, se ha desarrollado un método de inoculación por injerto con el que se consigue transmitir el virus a nuevas plantas sanas de *N. benthamiana* (descrito en el capítulo 4 de esta tesis). Adicionalmente, a partir de extractos crudos de material vegetal infectado con CTV también se han conseguido infectar, mediante inoculación mecánica, plantas sanas de *N. benthamiana* (resultados obtenidos en esta tesis).

2.4. Control de la enfermedad

Las infecciones producidas por virus de plantas no pueden ser tratadas químicamente, de modo que sólo pueden emplearse medidas de tipo preventivo o que ayuden a disminuir los daños causados. Estas medidas tienen como objetivo evitar la infección y reducir la expansión del patógeno. En países o áreas citrícolas donde CTV no se ha establecido, las mejores medidas de control son los programas de cuarentena y certificación del material propagativo, complementados con un programa de saneamiento de variedades (Navarro *et al.*, 2002).

Cuando el virus se ha introducido en zonas citrícolas donde el patrón predominante es el naranjo amargo, pero su incidencia aún es muy baja, se puede poner en marcha un programa de erradicación de árboles infectados (Dodds y Lee, 1991; Kyriakou *et al.*, 1996; Gottwald *et al.*, 2002). En cambio, si la erradicación no es posible debido a la eficiente dispersión de CTV por los vectores, la propagación de los cítricos sobre patrones tolerantes (citranges Troyer y Carrizo, mandarina Cleopatra, etc.) es la única opción viable para evitar el síndrome de decaimiento inducido por el virus. En áreas donde las cepas más virulentas de CTV son endémicas, los programas de protección cruzada pueden evitar los daños inducidos por el virus (Fig. 4). Estos programas consisten en pre-inocular las plantas con un aislado no agresivo del mismo virus, normalmente alguno de los aislados asintomáticos o suaves endémicos de la zona, que protege frente a la entrada y/o acumulación de las cepas más virulentas (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987). Estos programas se utilizan actualmente en diversas áreas citrícolas del mundo con buenos resultados como en Brasil o Sudáfrica. En España, se han llevado a cabo diversos ensayos en campo durante la última década para validar la utilidad de esta técnica en la zona mediterránea de Valencia. En ellos, se ha comprobado el poder protector de diversos aislados suaves de CTV endémicos de la zona (Moreno *et al.*, datos no publicados y Fig. 4) con objeto de poder volver a utilizar patrones de gran rendimiento y robustez como el naranjo amargo o *C. macrophylla* en las zonas donde la tristeza es endémica y otros patrones son agrónomicamente mucho peores.



Fig. 4. Fenómeno de protección cruzada. Naranjos dulces injertados sobre patrón naranjo amargo en un campo experimental de Moncada donde la tristeza es endémica. El naranjo de la izquierda fue preinoculado con el aislado asintomático T385 al inicio del bioensayo, mientras que el de la derecha no. En la zona predominan los aislados de CTV asintomáticos tipo T385.

Sin embargo, una de las formas más eficaces para controlar los daños producidos por el virus consiste en la obtención de plantas resistentes por mejora genética, con selección asistida por marcadores ligados al gen de resistencia (Mestre *et al.*, 1997), o la generación de plantas con resistencia mediada por genes de CTV mediante transformación genética (Beachy *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 1995; Peña y Séguin, 2001; Ghorbel *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2005). Pese a que en algunas especies de cítricos se han identificado genes de resistencia a CTV (Mestre *et al.*, 1997; Fang y Roose, 1999; Yang *et al.*, 2001, 2003; Rai, 2006), éstos no se han podido incorporar en variedades comerciales mediante cruzamientos convencionales debido a la compleja biología reproductiva de los cítricos, a su elevada heterocigosis, a los largos períodos juveniles de las plantas de semilla y al gran tamaño que tienen en su fase adulta.

En lo que respecta a la incorporación de resistencia derivada del patógeno (PDR) mediante transformación genética, no se han conseguido resultados consistentes hasta el momento debido a factores desconocidos que afectan al fenotipo de resistencia de las distintas propagaciones obtenidas (Moreno *et al.*, 2008).

3. EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) pertenece al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph y Lee, 1989a; Martelli *et al.*, 2000). Los viriones de los miembros de esta familia son de morfología filamentososa (11-12 x 800-2000 nm), tienen genomas formados por una, dos o tres moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que se encapsidan individualmente y, al menos, dos proteínas de cápsida (CP y CPm) que se ensamblan separadamente en cada extremo del virión formando una estructura helicoidal con una morfología similar a una serpiente de cascabel (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996).

En todos los miembros de la familia *Closteroviridae* se encuentra conservado un bloque de 5 genes que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje y movimiento de los viriones. Dentro de este bloque se incluye una pequeña proteína transmembrana, otra homóloga de las proteínas de choque térmico de la familia HSP70, una proteína de cápsida mayoritaria (CP) y una minoritaria de la misma (CPm), y otra proteína de mayor tamaño divergente de la CP (Fig. 5) (Dolja *et al.*, 2006). El miembro tipo de la familia es el virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV).

3.1. Organización genómica

Los viriones de CTV tienen un tamaño de 11 nm de diámetro x 2000 nm de longitud, son flexuosos y contienen una única molécula de RNA genómico (gRNA) de ~19.3 Kb. Están compuestos por dos proteínas de cubierta, la p25 (CP) y la p27 (CPm), que cubren el 97 y el 3% de la longitud del virión, respectivamente (Febres *et al.*, 1996; Satyanarayana *et al.*, 2004).

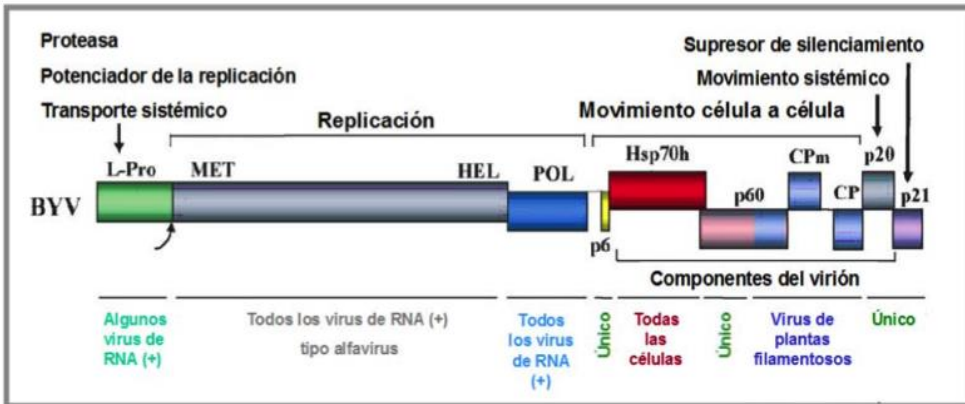


Fig. 5. Organización genómica del *Beet yellows virus* (BYV), miembro tipo del género *Closterovirus*, donde se indican las funciones de las distintas regiones génicas y las conexiones evolutivas de algunas de ellas con virus de otros géneros. Las ORFs se indican con cajas de colores. Tomado de Dolja *et al.*, 2006.

El gRNA de CTV está organizado en 12 pautas de lectura abierta (ORFs) que codifican, al menos, 17 proteínas, y dos regiones no codificantes (UTR) de 107 y 273 nucleótidos en los extremos 5' y 3', respectivamente (Fig. 6) (Sekiya *et al.*, 1991; Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). En la mitad 5' del genoma se encuentra el módulo de replicación, formado por las ORFs 1a y 1b (Fig. 6). La primera de ellas codifica una poliproteína de 349 kDa que contiene dos dominios proteasa tipo papaína (PRO) y regiones con dominios metiltransferasa (MET) y helicasa (HEL), mientras que la segunda codifica una proteína con los dominios típicos de una RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) (Fig. 6) (Karasev *et al.*, 1995).

En cambio, en la mitad 3' del genoma se localiza un grupo de 5 genes (*p6*, *p65*, *p61*, *p27* y *p25*), característico de los closterovirus, que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje del virión y el movimiento célula a célula. Además, se encuentra también el gen *p20*, un homólogo del gen *p21* del *Beet yellows virus* (BYV), y cuatro genes más (*p33*, *p18*, *p13* y *p23*) de los que no se han hallado homólogos en otros closterovirus (Fig. 6) (Dolja *et al.*, 2006).

Las proteínas *p65* y *p61* participan en el ensamblaje del virión, junto a las proteínas de cubierta *p25* y *p27*, actuando como "chaperonas moleculares" (proteínas que ayudan al correcto plegamiento de otras proteínas) (Satyanarayana *et al.*, 2000).

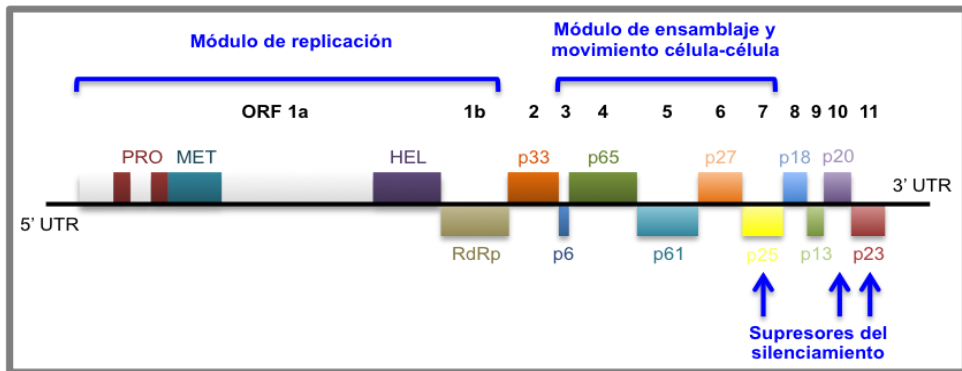


Fig. 6. Esquema representativo de la organización genómica de CTV. Las cajas representan las ORFs con su respectivo número y nombre de la proteína que codifican. Se indican también los dominios homólogos de la metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y proteasa (PRO) de la ORF 1a, así como las regiones no traducibles (UTR) de los extremos 5' y 3'.

La primera de ellas presenta homología con proteínas de choque térmico (HSP) de plantas de la familia HSP70. En el aislado T36 se ha descrito que la proteína p27 recubre los primeros 627 nucleótidos del gRNA (extremo 5'), mientras que p25 recubre el resto del genoma, participando p65 y p61 en este ensamblaje específico, de modo que en ausencia de ambas, la p27 puede recubrir regiones más amplias del genoma e incluso el gRNA completo (Satyanarayana *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que las secuencias localizadas en el extremo 5'-UTR están implicadas en la unión de p27 a este extremo (Satyanarayana *et al.*, 2004). La última proteína integrante de este módulo, p6, podría actuar como proteína de movimiento viral, ya que se ha descrito que su homóloga en BYV es de este tipo (Peremyslov *et al.*, 2004).

La proteína p20 forma cuerpos de inclusión amorfos en las células infectadas debido a su alta afinidad consigo misma (Gowda *et al.*, 2000), mientras que p23 une específicamente RNA de manera cooperativa (López *et al.*, 2000) y controla la acumulación asimétrica de RNAs de ambas polaridades durante la replicación y transcripción del gRNA del virus (Satyanarayana *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que p23 se acumula en el nucléolo, cuerpos de Cajal y plasmodesmos, es un determinante de patogenicidad de CTV en *N. benthamiana* cuando se expresa como RNA subgenómico del virus

X de la patata (PVX) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), y también lo es en cítricos (Fagoaga *et al.*, 2005), ya que plantas de lima mexicana transgénicas que expresan esta proteína muestran síntomas similares a los observados en plantas no transgénicas infectadas por CTV (Ghorbel *et al.*, 2001). Por otra parte, también se ha localizado el determinante de la inducción del síndrome de SY en naranjo amargo en la región p23-3'UTR (Albiach-Martí *et al.*, 2010). A su vez, las proteínas p25, p20 y p23 actúan como supresores del silenciamiento génico mediado por RNA, en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Lu *et al.*, 2004): mientras que p25 suprime el silenciamiento intercelular, p23 actúa a nivel intracelular y p20 a ambos niveles.

Por último, se desconoce la función concreta de las proteínas p33, p18 y p13, aunque estudios recientes sugieren el tipo de implicación que tienen en las infecciones de CTV. Se ha demostrado que estas proteínas no son necesarias para la replicación y ensamblaje del virus (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2000), como tampoco lo son para causar infección sistémica y síntomas normales en algunas especies de cítricos (Tatineni *et al.*, 2008). En cambio, para poder infectar otras especies de cítricos, la presencia de alguna de estas proteínas es esencial, ya que se ha mostrado que CTV evolucionó adquiriendo estos 3 genes para poder ampliar su gama de huéspedes (Tatineni *et al.*, 2011). Así, por ejemplo, la presencia de p33 le permitiría al virus infectar naranjo amargo, limonero, pomelo y calamondín, mientras que si esta proteína está mutada, p18 permite a CTV infectar pomelo y p13 infectar calamondín (Tatineni *et al.*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que p33 es necesaria para el fenómeno de protección cruzada, ya que los mutantes de CTV que no la expresan son incapaces de evitar una nueva infección por parte de otro aislado (Folimonova, 2012). Asimismo, p33 podría estar implicada en el movimiento viral debido a su co-localización, en *N. benthamiana*, en plasmodesmos y endosomas y con p6, la supuesta proteína de movimiento de CTV, además de formar túbulos extracelulares y requerir la ruta de secreción y la red de actina para su tráfico y localización (Bak y Folimonova, 2015).

3.2. Expresión del genoma viral

La expresión del genoma de CTV incluye tres estrategias ampliamente utilizadas por los virus de RNA: procesamiento proteolítico, deriva ribosomal y síntesis de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3' co-terminales (Fig. 7) (Hilf *et al.*, 1995; Karasev *et al.*, 1995, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2002; Gowda *et al.*, 2001, 2003; Ayllón *et al.*, 2003, 2004).

La replicación de CTV conlleva la síntesis de una cadena de RNA complementaria de polaridad negativa que sirve como molde para sintetizar nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva que constituyen el genoma del virus. Las ORFs 1a y 1b se traducen directamente del gRNA dando lugar, la primera de ellas, a una poliproteína de 349 kDa que se procesa proteolíticamente, mientras que la ORF 1b se traduce por un mecanismo de deriva ribosomal de tipo +1 ocasional produciendo una poliproteína de 401 kDa que también es procesada proteolíticamente (Fig. 7) (Karasev *et al.*, 1995).

Los 10 genes restantes de la mitad 3' del genoma de CTV se expresan mediante la síntesis de sgRNAs 3' co-terminales, a partir de los cuales se traduce el gen que ocupa la posición 5' terminal (Fig. 7) (Hilf *et al.*, 1995), lo que permite al virus regular la expresión de cada gen independientemente en tiempo y cantidad (Navas-Castillo *et al.*, 1997). Durante la infección de CTV, el primer sgRNA que se detecta es el que codifica la proteína p23, mientras que los sgRNAs más abundantes son los que codifican las proteínas p20 y p25 (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004).

En el gRNA de CTV se han localizado las secuencias reguladoras (elementos controladores, CE) de la expresión de cada uno de sus sgRNAs, situados en posición 5' respecto al inicio de la transcripción (Fig. 8) (Gowda *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2003). Cada CE induce la formación de tres RNAs diferentes: un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que sirve como mensajero para la expresión del gen adyacente a dicho CE, un RNA de polaridad negativa complementario al anterior, y un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que se extiende desde el extremo 5' del gRNA al extremo 5' del CE (Fig. 8) (Gowda *et al.*, 2001), generado probablemente por la terminación prematura de la síntesis de nuevas copias de gRNA en las proximidades de cada CE.

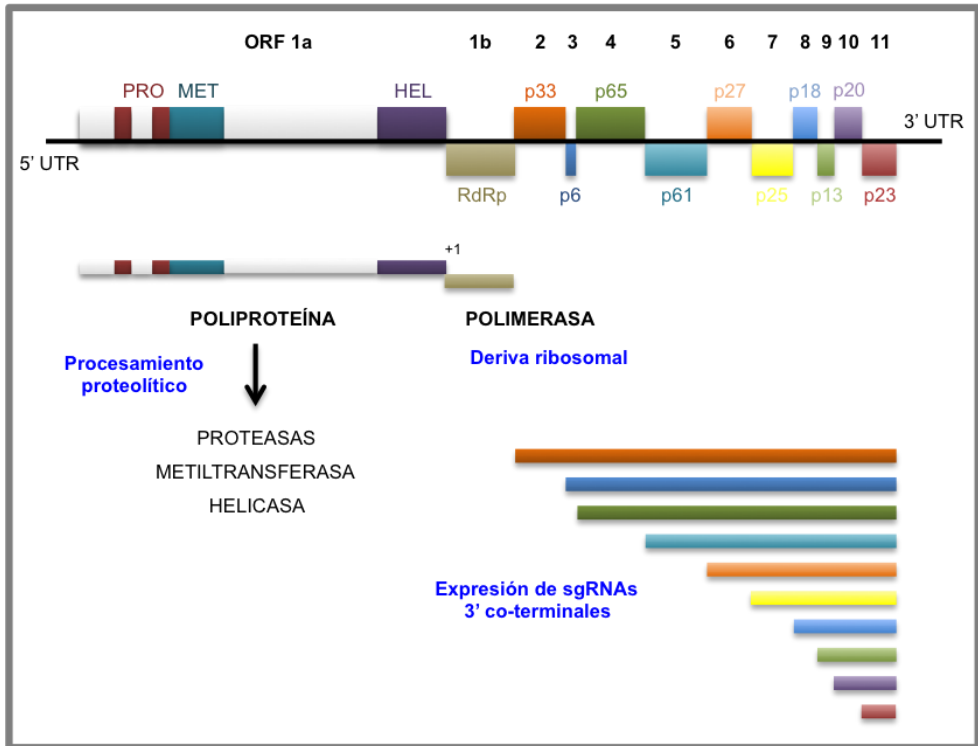


Fig. 7. Expresión de las ORFs de los extremos 5' y 3' de CTV. Las cajas representan las ORFs con su respectivo número y nombre de la proteína que codifican. Se indican también los dominios homólogos de la metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y proteasa (PRO) de la ORF 1a, así como las regiones no traducibles (UTR) de los extremos 5' y 3'.

También se han caracterizado otros dos RNAs 5' co-terminales de cadena sencilla y polaridad positiva llamados LMTs (*low molecular-weight tristeza*) (Fig. 8), con un tamaño de 842-854 (LMT1) y 744-746 nucleótidos (LMT2), y de función desconocida (Che *et al.*, 2001). El primero de ellos (LMT1) se genera durante la replicación debido a la presencia de un CE próximo al extremo 5' (Gowda *et al.*, 2003), mientras que la síntesis del LMT2 está asociada al proceso de ensamblaje del virión (Gowda *et al.*, 2009).

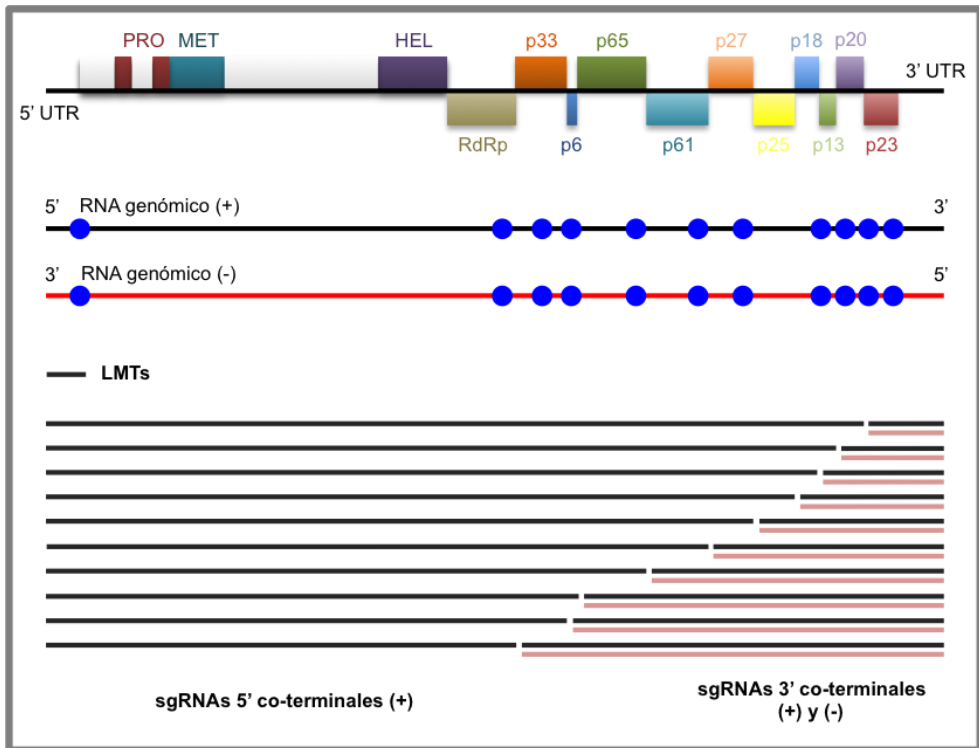


Fig. 8. Modelo propuesto para la replicación y síntesis de los diferentes tipos de RNAs de CTV en células infectadas. Las líneas negras representan las cadenas positivas, y las rojas las negativas, del gRNA, los sgRNAs y los LMTs, mientras que con círculos azules se indican las posiciones relativas de los CE. Modificado de Gowda *et al.*, 2001.

En las células infectadas por CTV es habitual encontrar grandes cantidades de RNAs defectivos (dRNAs) de ambas polaridades, que contienen los extremos 5' y 3', pero que carecen de una porción variable de la región central (Mawassi *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999). Estos dRNAs se generan mediante eventos de recombinación no homóloga (Nagy y Simon, 1997). La mayoría de aislados de CTV presentan uno o varios de estos dRNAs con tamaños que suelen oscilar entre las 2 y las 5 Kb (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995), también se han descrito dRNAs de gran tamaño en el aislado T318A (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009), mientras que en otros se detectan defectivos con una gran semejanza a los RNAs genómicos 1 y 2 de

crinivirus (familia *Closteroviridae*) (Che *et al.*, 2002, 2003). Así, los dRNAs de CTV se han agrupado en 6 clases según el tamaño y las porciones de gRNA que contienen (Bar-Joseph y Mawassi, 2013): 1) contienen fragmentos de pequeño tamaño de los extremos 5' y 3'; 2) formados por un fragmento de 3 Kb del extremo 5' y otro equivalente al sgRNA de p23; 3) presentan las ORFs 1a y 1b completas, y un fragmento variable del extremo 3', son capaces de replicarse de forma autónoma, se encapsidan y son infecciosos cuando se inoculan mecánicamente en cítricos y protoplastos de *N. benthamiana*; 4) contienen todas o casi todas las 10 ORFs del extremo 3' y una pequeña parte del 5', y se pueden inocular mecánicamente en cítricos; 5) formados por 958 nucleótidos del extremo 5' y por porciones variables de p33 y del extremo 3', posiblemente generados por eventos de doble recombinación; y 6) presentan pequeños fragmentos de los extremos 5' y 3' separados por pequeñas secuencias de 14-17 nucleótidos de procedencia no viral.

3.3. Variabilidad genética de las poblaciones de CTV

En la actualidad, se conoce la secuencia completa de un gran número de aislados de CTV con diferentes características patogénicas y orígenes geográficos diferentes, entre los cuales se pueden destacar: T36 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995) y T30 (Albiach-Martí *et al.*, 2000) de Florida, VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 (Vives *et al.*, 1999) y T318A (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006) de España, SY568 de California (Yang *et al.*, 1999), NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001), Qaha de Egipto (GenBank nº AY340974), un aislado de México (GenBank nº DQ272579), los aislados NZ-B18, NZ-M16, NZRB-TH30 y NZRB-G90 de Nueva Zelanda (Harper *et al.*, 2009, 2010), los aislados HA18-9 y HA16-5 de Hawái (Melzer *et al.*, 2010), los aislados B165 (Roy y Brlansky, 2010) y Kpg3 (Biswas *et al.*, 2012) de India, y CT-ZA3 de Sudáfrica (Zablocki y Pietersen, 2014), además de múltiples secuencias parciales de muchos otros aislados del mundo. Los aislados T30, T385 y NZ-M16 son esencialmente asintomáticos, T36 induce los síndromes de DL y SY, VT causa DL y, ocasionalmente, SP suave en pomelo, mientras que los aislados NUagA, Kpg3, SY568 y T318A

son más virulentos y provocan DL y SY intensos en lima mexicana y otros huéspedes y, además, los dos últimos inducen SP en naranjo dulce, pomelo y otras especies. Los aislados NZ-B18 y B165 forman parte de un nuevo genotipo virulento que causa SY y SP intensos en algunas especies de cítricos, mientras que otros como NZRB-TH30 y NZRB-G90 son capaces de superar la resistencia (*resistance breaking*, RB) frente a CTV e infectan los patrones de *P. trifoliata*. Los síntomas inducidos por el aislado Qaha, HA18-9, HA16-5 y CT-ZA3 no han sido descritos.

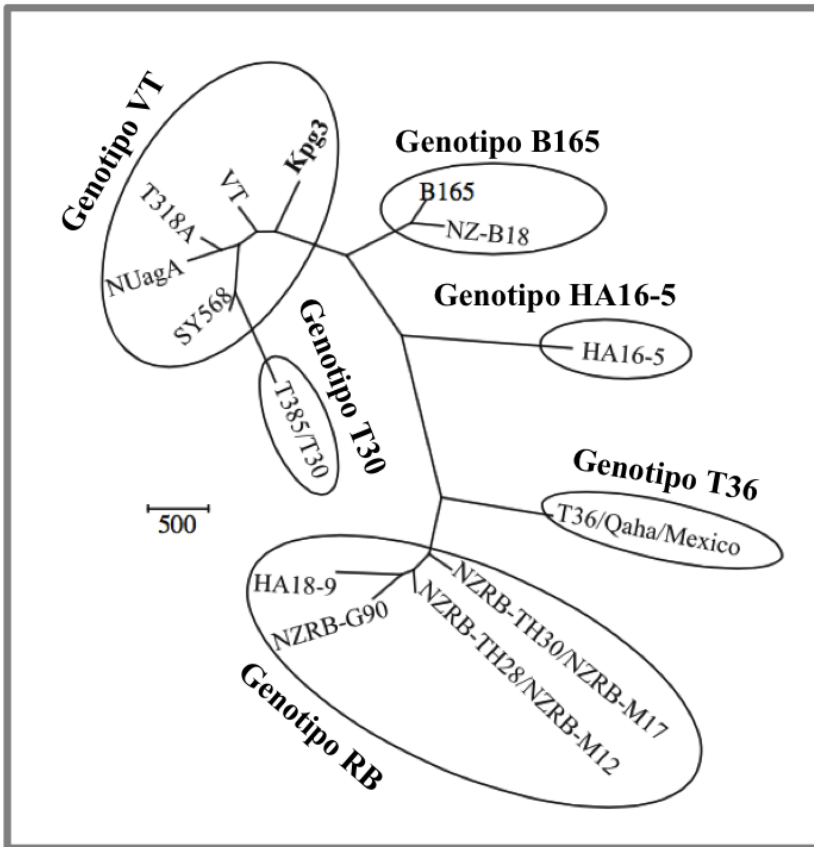


Fig. 9. Árbol filogenético en el que se clasifican los distintos genotipos de CTV. Obtenido a partir de las secuencias completas de los aislados citados con el método Neighbor-Joining y 1000 réplicas de *bootstrap*. Tomado de Biswas *et al.*, 2012.

El análisis filogenético de las secuencias completas de todos estos aislados ha revelado grandes variaciones en su identidad de secuencia, llevando a clasificarlos en seis grupos, designados como genotipos de referencia T36, T30, VT, B165, HA16-5 y RB (Fig. 9) (Biswas *et al.*, 2012).

La variabilidad genética se distribuye de forma irregular a lo largo del genoma de CTV, siendo el extremo 3'-UTR la región más conservada con una identidad entre aislados superior al 95%, y el extremo 5'-UTR la región más variable con valores de identidad, en ocasiones, inferiores al 50% (López *et al.*, 1998). A pesar de ello, la estructura secundaria de este extremo está conservada y es muy similar en todos los aislados (Fig. 10), lo que sugiere que puede tener un papel importante en el ciclo biológico del virus (López *et al.*, 1998; Gowda *et al.*, 2003). Además, se ha visto que el nivel de replicación del aislado T36 en protoplastos de *N. benthamiana* se reduce drásticamente cuando se intercambian sus extremos 5' o 3'-UTR por los de sus respectivos homólogos de otro aislado (Satyanarayana *et al.*, 1999). De igual modo, también se ha descrito una estructura altamente preservada en el extremo 3'-UTR (Satyanarayana *et al.*, 2002) que estaría implicada en el reconocimiento y la unión de la polimerasa viral (Fig. 11).

Asimismo, también existe una distribución desigual de la variación genética entre las regiones codificantes, e incluso dentro de un mismo gen, que probablemente muestran diferentes presiones de selección a lo largo del genoma de CTV (Rubio *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2009). Así, comparaciones de secuencia entre aislados de CTV con diferentes orígenes geográficos y características patológicas, han mostrado un elevado grado de conservación entre los genomas del virus separados en el tiempo y en el espacio (Vives *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009), una estructura poblacional muy variable entre aislados, con algunos de ellos formados por una variante de secuencia mayoritaria y algunas minoritarias estrechamente relacionadas (Albiach-Martí *et al.*, 2000), y otros aislados que muestran una estructura compleja con variantes de secuencia altamente divergentes (Vives *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009), o frecuentes eventos de recombinación entre secuencias divergentes (Sambade *et al.*, 2003; Vives *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2009).

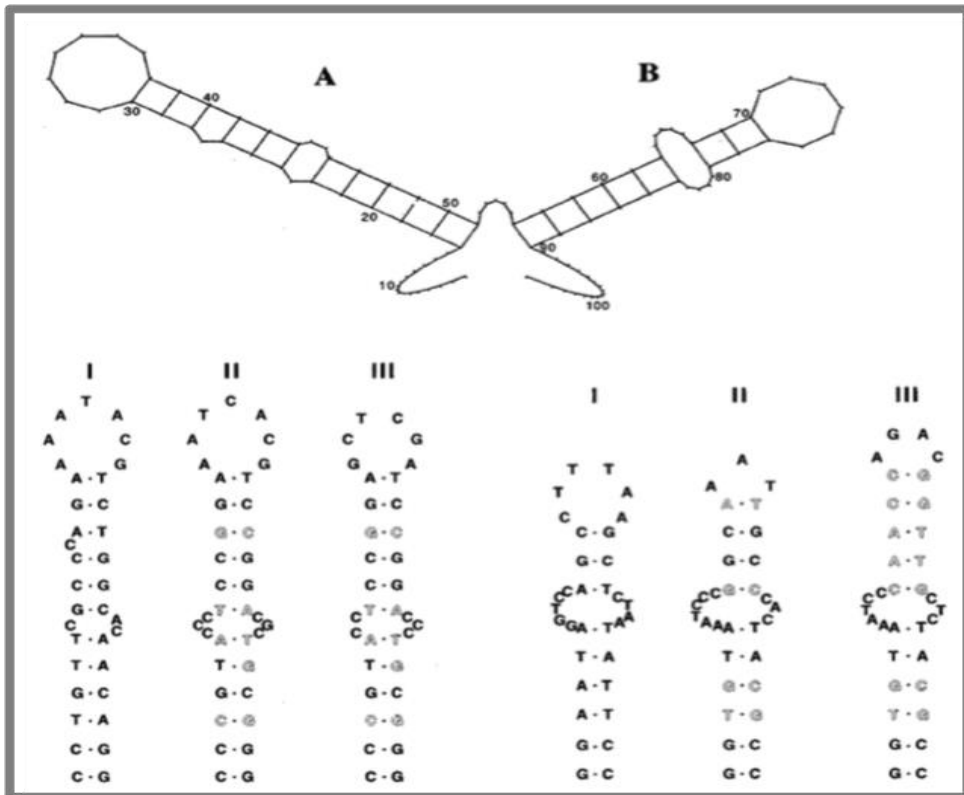


Fig. 10. Estructura secundaria de mínima energía libre predicha con el programa MFOLD para la región 5'-UTR del aislado T36 (arriba). Estructura primaria y secundaria de los bucles/tallos A (izquierda) y B (derecha) de las secuencias 5'-UTR de los grupos I (genotipo T36), II (genotipo VT) y III (genotipo T30) de CTV. En negrita se indican las mutaciones simples o dobles respecto a la secuencia de T36 que mantienen la estructura de los bucles/tallos A y B (abajo). Tomado de López *et al.*, 1998.

El estudio de la variabilidad de los diferentes aislados de CTV ha ido evolucionando a lo largo de los años a medida que las técnicas moleculares han ido avanzando.

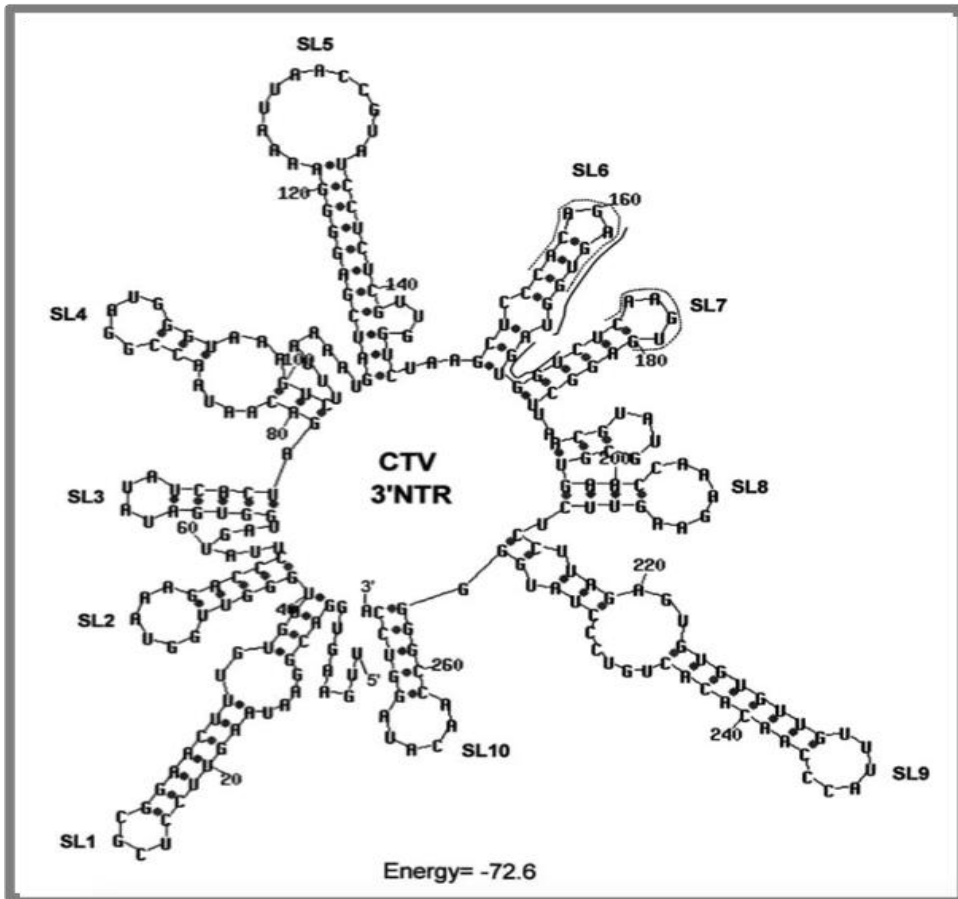


Fig. 11. Estructura secundaria de mínima energía libre predicha con el programa MFOLD para el extremo 3'-UTR del aislado T36 de CTV. Las 10 horquillas se indican como SL1 a SL10. Tomado de Satyanarayana *et al.*, 2002.

Así pues, los primeros procedimientos empleados para este fin consistían en detectar variaciones en el RNA viral, incluyendo: i) diferencias en los patrones de dsRNA entre los aislados debido a la presencia de dRNAs (Dodds *et al.*, 1987; Guerri *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1990, 1993), ii) diversidad de los patrones de hibridación con sondas de cDNA o cRNA en distintas regiones de CTV (Rosner and Bar-Joseph, 1984; Rosner *et al.*, 1986; Albiach-Martí *et al.*, 2000; Narváez *et al.*, 2000), iii) polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *p25* (Gillings *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2003), iv) amplificación mediante RT-PCR con parejas de cebadores

específicos de aislado (Hilf *et al.*, 1999, 2005; Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2003; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006) y calsificación en grupos, y v) diversidad o semejanza en los polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) de diferentes regiones amplificadas del gRNA (Rubio *et al.*, 1996; Ayllón *et al.*, 1999; d'Urso *et al.*, 2000, 2003; Sambade *et al.*, 2002, 2007). Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación se ha obtenido la secuencia completa de un gran número de aislados de CTV, lo que ha permitido realizar estudios filogenéticos y llevar a cabo la clasificación de los aislados de CTV en seis grupos, como se ha comentado anteriormente (Biswas *et al.*, 2012).

Con todos estos estudios se ha concluido que los factores que mayormente influyen en la estructura y variabilidad de las poblaciones de CTV en campo, y en su evolución, son las mutaciones, los eventos de recombinación entre variantes de secuencia divergentes, la selección natural, la deriva genética y el flujo genético generado por las frecuentes inoculaciones de los árboles y movimiento de yemas infectadas entre regiones (Domingo y Holland, 1997; Ayllón *et al.*, 1999, 2006; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995, 1996; Yang *et al.*, 1997; Vives *et al.*, 1999, 2005; Rubio *et al.*, 2001; Albiach-Martí *et al.*, 2000; Sentandreu *et al.*, 2006, Kong *et al.*, 2000; d'Urso *et al.*, 2000, 2003; Sambade *et al.*, 2007). La larga vida media de los cítricos en campo facilita las frecuentes re-inoculaciones de aislados distintos, tanto mecánicamente como por áfidos, aumentando considerablemente la dinámica y complejidad de dichas poblaciones (Moreno *et al.*, 2008) con reiterados fenómenos de cuellos de botella y deriva génica.

3.4. Movimiento viral

La interacción entre los factores del virus y del huésped es esencial para que se pueda establecer una infección sistémica una vez el virus ha conseguido infectar localmente una o varias células. La infección sistémica se produce en dos etapas sucesivas: la primera es el movimiento local, en la que el virus se desplaza por el citoplasma hacia la periferia de la célula infectada, atraviesa los plasmodesmos, e infecta las células adyacentes, y la segunda es el

movimiento a larga distancia que ocurre a través de los tubos cribosos del floema (Waigmann *et al.*, 2004).

El movimiento célula a célula se lleva a cabo a través de los plasmodesmos (PD), unos complejos proteicos transmembrana que interconectan las células de las plantas (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Ruiz-Medrano *et al.*, 2004; Scholthof, 2005). Para ello, gran parte de los virus sintetizan proteínas de movimiento que forman complejos ribonucleoproteicos con el RNA viral y facilitan su paso a través de los plasmodesmos aumentando el límite de exclusión molecular de los mismos (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Herranz y Pallás, 2004; Haupt *et al.*, 2005; Herranz *et al.*, 2005; Boevink y Oparka, 2005; Lucas *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). El número, estructura e interacción de las proteínas de movimiento con los factores de la célula huésped, así como su modo de acción, varían según el tipo de virus. Además, se ha observado que muchas de estas proteínas van a los plasmodesmos vía retículo endoplasmático (RE) y que los filamentos de actina/miosina regulan su flujo, lo que implica el uso del citoesqueleto y otros componentes celulares para el movimiento viral (Boevink y Oparka, 2005; Liu *et al.*, 2005).

Para conseguir la infección sistémica, el virus tiene que llegar al sistema vascular desde las células acompañantes de los tubos cribosos y moverse con el flujo de nutrientes hacia las diferentes partes y órganos distales de la planta (Carrington *et al.*, 1996). En distintos estudios se ha demostrado que la proteína de la cápsida mayoritaria (CP) es esencial para atravesar los elementos cribosos y producir este tipo de infección (Gilberston y Lucas, 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999; Lazarowitz, 2002).

En el caso de los closterovirus, el movimiento célula a célula se ha descrito que se produce con la ayuda de cinco proteínas: CP, CPm, p6, HSP70 y p60 (Peremyslov *et al.*, 1999; Alzhanova *et al.*, 2000). A su vez, la proteasa y p20 participan en el transporte del virus a larga distancia (Peng *et al.*, 2003; Prokhnevsky *et al.*, 2002). La proteína HSP70 interviene, a su vez, en la unión a microtúbulos (Karasev *et al.*, 1992), en el ensamblaje de los viriones (Satyanarayana *et al.*, 2000), en la unión a canales intercelulares (Alzhanova *et al.*, 2000) y en el movimiento célula a célula (Medina *et al.*, 1999; Peremyslov *et al.*, 1999; Napuli *et al.*, 2000), y se localiza en los plasmodesmos de las células infectadas (Medina *et al.*,

1999). Se ha propuesto un modelo para el ensamblaje y movimiento de los closterovirus en el cual la proteína HSP70 permitiría la unión de la CPM al extremo 5'-UTR del RNA viral y formaría parte de una estructura que posibilitaría la translocación del virus mediante la unión de HSP70 a los plasmodesmos (Fig. 12) (Alzhanova *et al.*, 2001). Así, se sugiere que los closterovirus se moverían como una "viral device" que estaría formada por esta estructura.

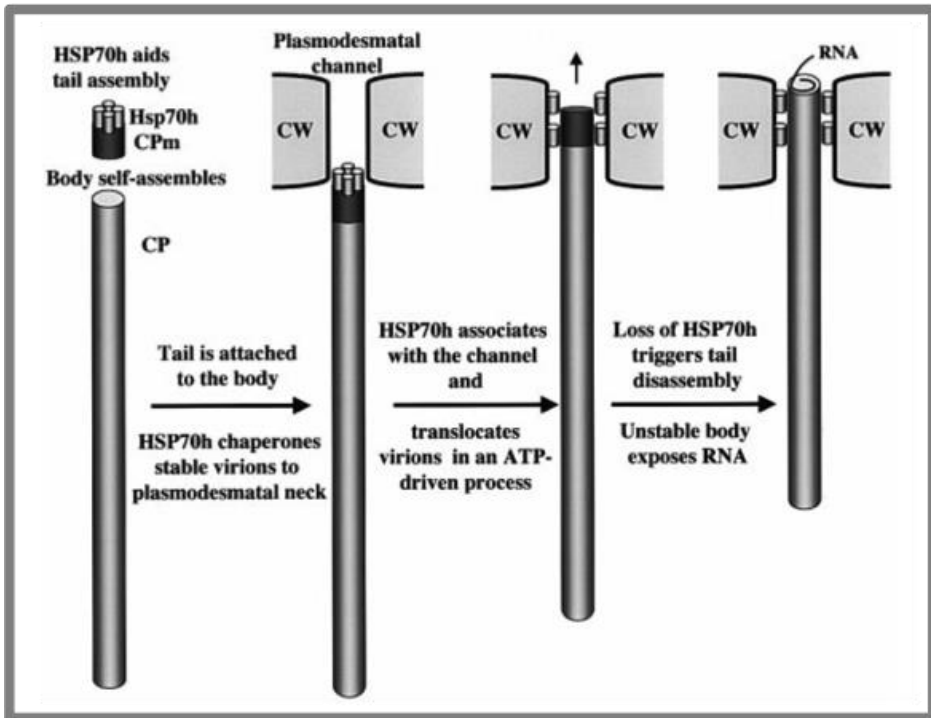


Fig. 12. Modelo propuesto de ensamblaje y movimiento célula a célula de Closterovirus. CW: pared celular que separa las células adyacentes. Tomado de Alzhanova *et al.*, 2001.

Las proteínas de CTV implicadas en el movimiento viral aún no se han identificado con detalle, ya que los cítricos sólo se han podido infectar con viriones completos producidos en células o protoplastos de *N. benthamiana* (Satyanarayana *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2005), y éstos no se ensamblan en ausencia de las proteínas estructurales p65, p61, p27 y p25 (Satyanarayana *et al.*, 2000). Aunque por su similitud con BYV, se propone que estas cuatro

proteínas junto con p6 también serían las encargadas del movimiento sistémico de CTV. Se ha demostrado que p6 y p20 son necesarias para infectar sistémicamente el huésped *C. macrophylla* (Tatineni *et al.*, 2008), y que p33 también podría estar implicada en el movimiento del virus en algunas especies de cítricos debido a su co-localización, en *N. benthamiana*, con plasmodesmos, endosomas y p6, la supuesta proteína de movimiento de CTV (Bak y Folimonova, 2015).

El patrón de infección sistémica que sigue CTV es un poco diferente al que suelen seguir el resto de virus, ya que parece que principalmente utiliza el movimiento a larga distancia (Dawson *et al.*, 2013) e infecta únicamente algunos grupos de células del parénquima floemático o células asociadas a éste (Folimonova *et al.*, 2008). Se sugiere que entre éstas células es donde se movería a corta distancia célula a célula. Por el momento, un mecanismo como éste no se ha descrito en otros virus y se desconoce si es característico de algunos miembros de la familia *Closteroviridae* o de otros virus cuya infección también se limita al floema. Así, se ha observado que en huéspedes sensibles como *C. macrophylla* o lima mexicana, el número de focos de infección de células asociadas al floema es superior, dándose tanto el movimiento a corta como a larga distancia, mientras que en plantas menos sensibles como naranjo amargo (Fig. 13), el movimiento es prácticamente sólo a larga distancia. Además, en el caso de huéspedes sensibles, el número de células infectadas en cada foco de infección es de 3-12, mientras que en huéspedes menos sensibles los focos de infección constan, habitualmente, de una única célula (Fig. 13). Esto sugiere que el movimiento a larga distancia de CTV en naranjo amargo está limitado posiblemente a causa de interacciones poco eficientes entre las proteínas de movimiento virales y/o los componentes celulares de este huésped (Folimonova *et al.*, 2008), y el movimiento célula a célula no existiría apenas (Dawson *et al.*, 2013).

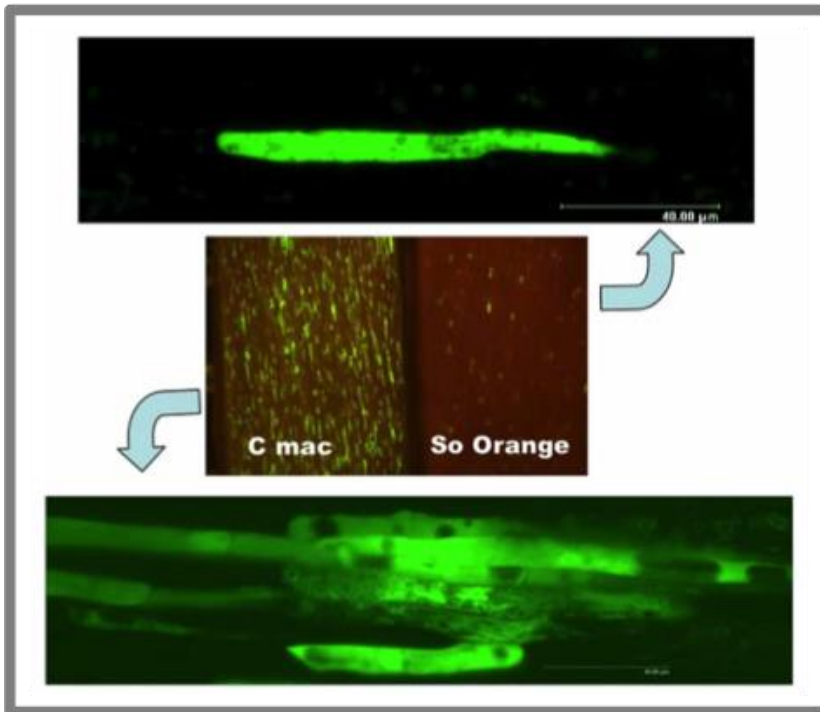


Fig. 13. Detección de CTV-GFP en células asociadas al floema de *C. macrophylla* (C mac) y naranjo amargo (So Orange) mediante microscopía fluorescente o confocal, donde se observa la infección de una única célula (parte superior) y la infección de un pequeño grupo de células (parte inferior). Tomado de Dawson *et al.*, 2013.

3.5. Diferencias importantes entre los aislados T36 y T318A

Los aislados T36 y T318A de CTV, procedentes de Florida y España respectivamente, inducen distintos síndromes en cítricos. El primer aislado es agresivo y causa DL y SY en ciertas especies de cítricos (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995), mientras que T318A, aún más severo, produce además SP en naranjo dulce, pomelo y otras especies (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006). Con el desarrollo de clones agroinfectiosos de cDNA de ambos aislados se ha descrito un comportamiento diferencial entre ellos cuando se inoculan en el huésped herbáceo *N. benthamiana* (Ambrós *et al.*, 2011, 2013). Si bien se ha demostrado que ambos se replican de

forma eficaz en protoplastos de esta especie y dan lugar a viriones normales de CTV (Fig. 15) (Satyanarayana *et al.*, 1999; Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013), cuando se agroinoculan los clones en las hojas de estas plantas, aunque ambos son capaces de replicarse en las hojas infiltradas, la acumulación viral de T318A decae tras 2 semanas post-inoculación (Fig. 14) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009).

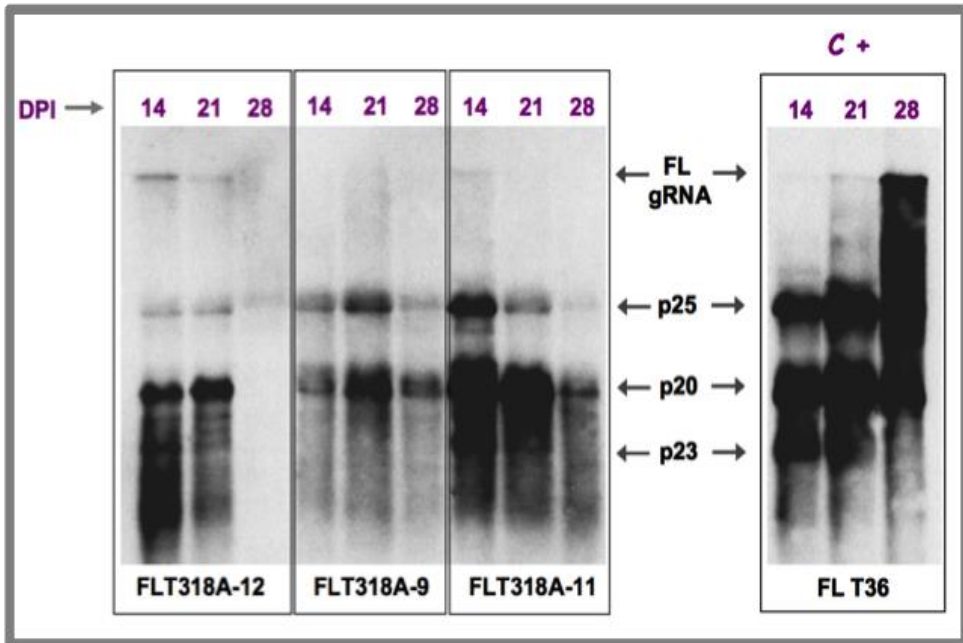


Fig. 14. Hibridación molecular tipo *Northern blot* de RNA de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con tres clones de longitud completa de T318A distintos a diferentes días post-inoculación (DPI) (paneles de la izquierda). Se observa la disminución de la acumulación a partir de los 14 DPI respecto al clon control de longitud completa de T36 (panel de la derecha). Se indican las posiciones del gRNA y sgRNAs 3' co-terminales de p25, p20 y p23.

Además, la proteína p25 de T318A no se detecta a lo largo del tiempo mediante ELISA en las hojas agroinoculadas de *N. benthamiana*, lo que sí sucede con la p25 de T36. Ello podría sugerir algún problema en su síntesis, en la del sgRNA correspondiente, en la encapsidación del virus o en una interacción distinta con algún factor del huésped. Esta hipótesis se ve favorecida por el hecho de que el aislado T318A no es capaz de causar infección sistémica en este huésped en ninguna de las condiciones probadas, al contrario

de lo que ocurre con T36 que además induce síntomas específicos (Ambrós *et al.*, 2011).

Esta respuesta diferencial de ambos genotipos en *N. benthamiana* puede permitir estudiar los factores implicados en la interacción CTV-huésped y permitir dilucidar la posible función de ciertas proteínas.

3.6. Determinantes de patogenicidad de CTV

Como se ha comentado anteriormente, CTV es capaz de causar distintos síndromes (DL, SY y SP) según la interacción aislado-huésped que se produzca. Con el fin de determinar qué gen o genes son los responsables de inducir cada uno de los síndromes, se han llevado a cabo diversos estudios cuyos resultados han logrado esclarecer un poco más cuáles son los determinantes de patogenicidad de este virus.

Se sabe que CTV posee 3 genes no conservados (*p33*, *p18* y *p13*) que no se requieren para la invasión sistémica de ciertas especies de cítricos (Tatineni *et al.*, 2008), lo que ha permitido estudiar el efecto que determinados mutantes de delección del virus en estos genes provoca en el huésped. Así, se ha observado que en *C. macrophylla*, un huésped en el que el aislado CTV-T36 salvaje causa SP moderado, la delección de los genes *p33* y *p18* y/o *p13* induce síntomas más severos de SP, mientras que se observa un SP más suave con la delección de *p13* o *p13* y *p18* (Tatineni y Dawson, 2012). Parece que la proteína p13 estaría asociada a la aparición de SP ya que su delección se correlaciona con un SP más suave, aunque en el triple mutante el síndrome es más severo, lo que indica que la interpretación no es tan sencilla y hay otros elementos implicados (Tatineni y Dawson, 2012). Por otra parte, la presencia de p33 se podría correlacionar con un SP más suave, ya que los mutantes correspondientes presentaban el menor grado de SP y su delección inducía un síndrome más severo. En cambio, la delección de p18 provocaba un SP moderado. Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de p33 y p13 (y posiblemente p18) estarían relacionados con los diferentes grados de SP observados en las distintas especies de cítricos (Tatineni y Dawson, 2012).

El síndrome de SY sólo aparece en ciertos huéspedes cítricos de CTV como naranjo amargo o pomelo indicando que, además de los factores específicos del aislado, existen otros factores dependientes del huésped involucrados en su expresión. El aislado T36 es uno de los que inducen este síndrome, mientras que T30 no lo es, por lo que virus híbridos en los que se intercambiaron regiones de ambos, permitió determinar la región donde se localizaba el determinante de SY (Albiach-Martí *et al.*, 2010). Así, el aislado T36 con la región genómica p23-3'UTR de T30 era incapaz de producir el síndrome de SY, sugiriendo que esta región de T36 es el determinante de patogenicidad responsable de este fenotipo (Albiach-Martí *et al.*, 2010). Recientemente, también se ha demostrado que la proteína p23 es un determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* cuando se expresa como un sgRNA de PVX, siendo la región N-terminal de 157 aminoácidos, que incluye el dominio del dedo de Zn y los motivos básicos flanqueantes, la responsable de inducir la patogénesis. Asimismo, esta región está implicada en la aparición de síntomas foliares característicos de CTV y de SP en plantas de lima mexicana transgénicas que expresan ectópicamente la p23 mutante a la que se le ha deleccionado todo el extremo C-terminal dejando sólo los primeros 157 aminoácidos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Anteriormente, ya se había visto que p23 podría actuar como un determinante de patogenicidad ya que plantas transgénicas de lima mexicana que expresaban p23 inducían los síntomas foliares característicos de CTV-T36 (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005).

Para identificar los determinantes de patogenicidad responsables del síndrome de DL se procedió, al igual que en el caso de SY, a sintetizar híbridos entre los aislados T36 (inductor de SY) y T30 (asintomático). El problema de este tipo de experimento es que los híbridos no se pueden ensayar en plantas pequeñas de invernadero debido a que éstas reemplazan el floema tan rápido como el virus lo daña y, por ello, actualmente se están llevando a cabo nuevos ensayos en plantas de campo (Dawson *et al.*, 2013).

3.7. Desarrollo de un sistema genético de CTV eficiente

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en el conocimiento de la biología molecular de CTV y la función de las distintas partes de su genoma gracias a la obtención de un clon infeccioso de cDNA del aislado T36, y al desarrollo de un sistema genético basado en el mismo. El sistema genético inicial consistía en la obtención *in vitro* de transcritos del gRNA completo del virus que eran infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y daban lugar a viriones normales de CTV (Satyanarayana *et al.*, 1999). Estos viriones se amplificaban mediante pases sucesivos a nuevos lotes de protoplastos hasta conseguir una cantidad suficiente para poder inocularlos mecánicamente en cítricos, ya que la cantidad de viriones y la infectividad que se obtenía en un solo lote de protoplastos era muy baja. Con este procedimiento se demostró que los viriones obtenidos a partir del clon de cDNA inducían los mismos síntomas que el aislado T36 salvaje (Satyanarayana *et al.*, 2001).

Este sistema permitió, a lo largo de una década, el estudio de las estrategias de replicación, regulación y encapsidación de CTV (Gowda *et al.*, 2000, 2001, 2003; Satyanarayana *et al.*, 2000, 2002, 2004), así como el movimiento y distribución del mismo gracias a la adición del gen de la GFP al clon (Folimonov *et al.*, 2007; Tatineni *et al.*, 2008). A pesar de ello, el sistema de protoplastos presentaba serias limitaciones, como la toxicidad de los clones de cDNA en *Escherichia coli* (Satyanarayana *et al.*, 2003), lo que provocaba un crecimiento muy lento de los cultivos y la reorganización del plásmido. Asimismo, la contaminación habitual de los cultivos de protoplastos daba lugar a la pérdida de muchos experimentos, ya que era necesario realizar inoculaciones sucesivas para obtener una cantidad suficiente de viriones. Este sistema tampoco permitía manipular genes implicados en el ensamblaje de los viriones, ya que son necesarios para la inoculación en cítricos.

Los inconvenientes del sistema de protoplastos llevaron a desarrollar un sistema de expresión de los clones de cDNA del aislado T36 de CTV *in planta* mediante *cassettes* de expresión en los que dicho cDNA se colocaba bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), seguido de una ribozima y del terminador de la nopalina sintasa (NOST) para asegurar el procesado correcto de los transcritos. Estos *cassettes* se

subclonaron en vectores binarios y los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transfectados con dichos vectores, se agroinfiltraban en hojas de *N. benthamiana*. En las hojas infiltradas se daba lugar a una infección local por CTV y a la producción de viriones normales (Gowda *et al.*, 2005) que resultaron infecciosos en cítricos al inocularlos mecánicamente. Sin embargo, se requería sobrepasar un umbral de viriones en las hojas infiltradas para conseguir de forma eficiente las infecciones en cítricos, lo cual era difícil y poco reproducible.

En nuestro laboratorio implementamos un sistema genético más eficaz al emplear un vector de tipo BAC en el que se subclonó el *cassette* descrito anteriormente con un intrón de patata en la región más tóxica del genoma para estabilizar las construcciones en bacterias (Ambrós *et al.*, 2006). Por otra parte, también se empleó un nuevo vector de tipo pCAM que portaba en *cis* una copia del gen supresor 2b. El estudio detallado de la cinética de acumulación de estos clones demostró que la acumulación de CTV aumentaba progresivamente en las hojas infiltradas a medida que pasaban los días y semanas (Fig. 15, panel C).

No sólo eso, sino que al cabo de 3 semanas-1 mes (Fig. 15, panel A, B), las plantas de *N. benthamiana* presentaban infección sistémica y una sintomatología característica consistente en enanismo, epinastia, clorosis nervial y muerte de la planta al cabo de 2-4 meses (Ambrós *et al.*, 2011). Era la primera vez que se conseguía infección sistémica de CTV en un huésped experimental, que además es una planta modelo, de una forma eficiente, rápida y reproducible.

La distribución del virus en *N. benthamiana* no se limita al floema (Fig. 16), sino que con el tiempo se extiende a todos los tejidos de la planta y permite producir gran cantidad de viriones con una elevada infectividad en cítricos y que, además, reproducen los síntomas del aislado T36 salvaje (Ambrós *et al.*, 2011). Esto hace que este sistema genético para CTV sea mucho más eficiente que el de protoplastos.

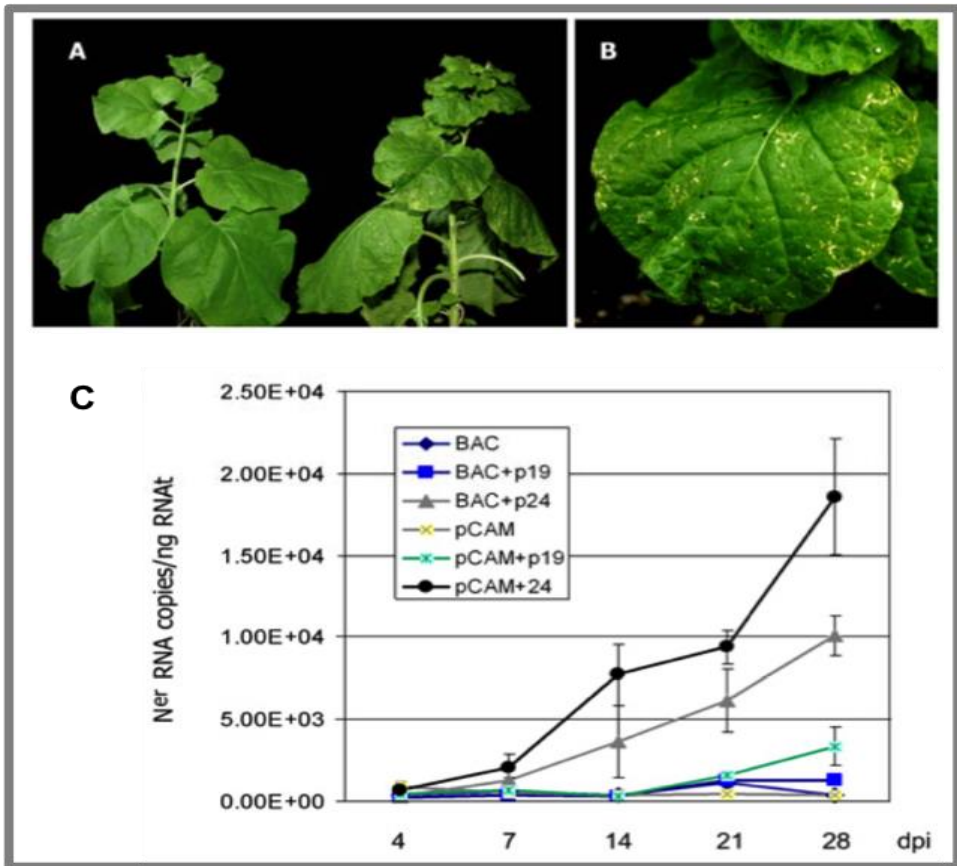


Fig. 15. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el aislado T36 de CTV (A, arrugamiento y epinastia observada en la planta infectada de la derecha respecto a la planta sana de la izquierda, y B, detalle de una hoja que presenta clorosis nervial) y acumulación de CTV en hojas agroinoculadas a lo largo del tiempo según el vector y el supresor de silenciamiento empleado en su inoculación (C). Tomado de Ambrós *et al.*, 2011.

Con el objetivo de estudiar los determinantes de patogenicidad responsables del síndrome de SP en pomelo y naranjo dulce, se obtuvo en nuestro laboratorio, un clon infeccioso de cDNA del aislado español T318A equivalente al de T36, inductor de este síndrome.

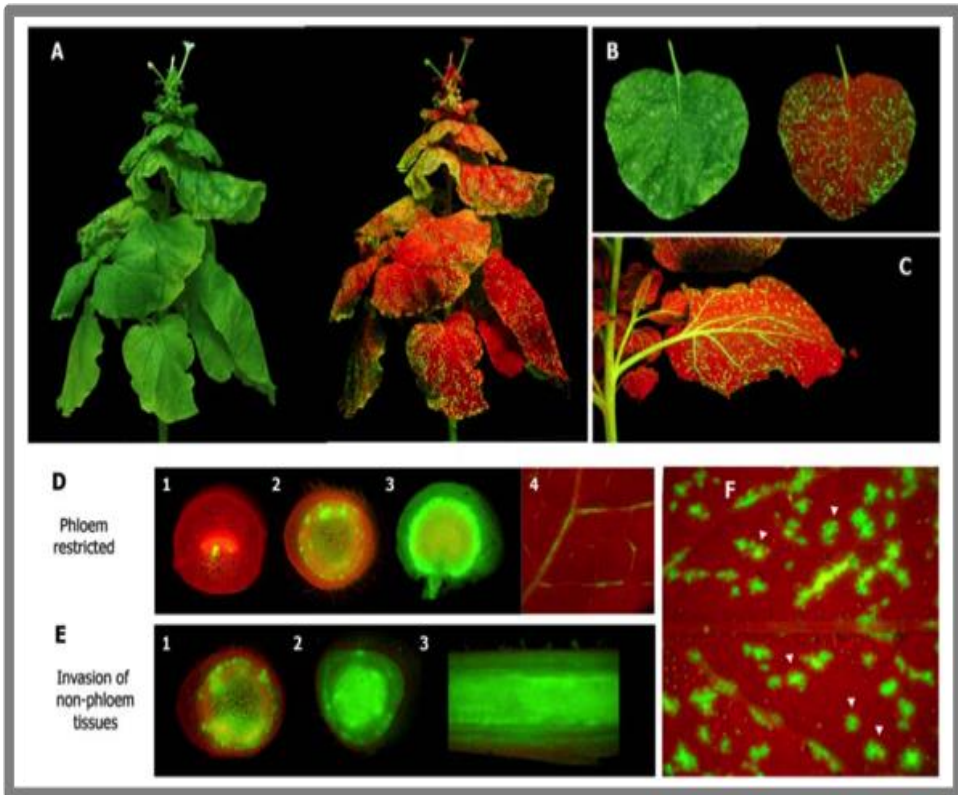


Fig. 16. Invasión sistémica y distribución del virus CTV-GFP, visualizada mediante lámpara y lupa UV, en *N. benthamiana*. A) Planta infectada sistémicamente mostrando epinastia y clorosis nervial. B) Relación espacial entre la clorosis nervial (izquierda) y la presencia del virus marcado con GFP (derecha). C) Progresión de la infección a lo largo del tallo, peciolo y nerviaduras. D) Distribución de CTV en el floema de peciolo joven (1), brote (2), raíz (3) y nerviaduras de las hojas (4). E) Distribución no floemática en brotes (1 y 2) y raíz (3). F) Distribución en hojas donde se observa la acumulación de CTV en las nerviaduras y en el mesófilo (flechas). Tomado de Ambrós *et al.*, 2011.

En primer lugar, se comprobó que viriones procedentes de cítricos infectados con T318A eran capaces de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana* de igual forma que el aislado T36 (Fig. 17). Una vez comprobada la capacidad de replicación de este aislado en protoplastos, se obtuvieron mini-replicones de cDNA basados en un dRNA de gran tamaño con capacidad de replicación autónoma. A partir de los mini-replicones que se replicaban de forma más eficiente en hojas agroinoculadas de *N. benthamiana*, se

sintetizaron clones de cDNA de longitud completa de T318A. Aunque éstos también se replicaron en hojas agroinoculadas de *N. benthamiana*, su acumulación decaía a partir de los 14 dpi impidiendo la infección sistémica (Fig. 17).

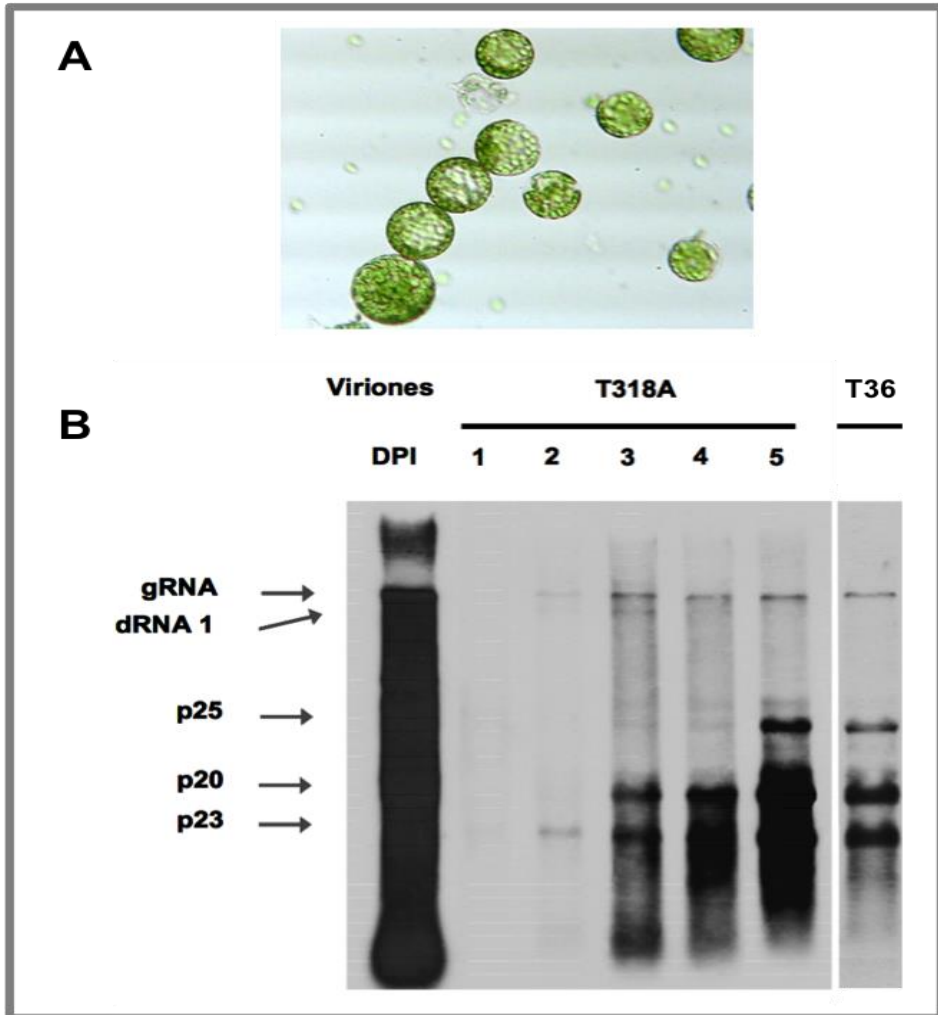


Fig. 17. A) Protoplastos aislados de mesófilo de *N. benthamiana*. B) Hibridación molecular de tipo *Northern blot* de RNAt de protoplastos transfectedos con viriones purificados de cítricos infectados con el aislado T318A de CTV a diferentes DPI y a la derecha el control con los viriones del aislado T36. Se indican las posiciones del gRNA, de los sgRNAs 3' co-terminales de p25, p20 y 23, y de un dRNA de gran tamaño presente en T318A.

Estos resultados sugieren que las proteínas del aislado T318A podrían no interactuar de forma apropiada con los factores del huésped implicados en el movimiento del virus a corta y/o larga distancia, limitando así su acumulación (Ruiz-Ruiz *et al.*, datos no publicados). A pesar de ello, igualmente sería posible estudiar los determinantes de patogenicidad causantes de SP preparando construcciones híbridas entre los clones de T318A y T36 que infectasen sistémicamente *N. benthamiana* y estudiar el tipo de síntomas inducidos al inocularlos mecánicamente en cítricos. Por otra parte, sí se sugiriese una función diferente de alguna de las proteínas de CTV según el aislado, como por ejemplo, alguno de los dos supresores del silenciamiento estudiados a lo largo de este trabajo, sería posible utilizar esta estrategia para confirmar su función diferente *in planta* en el contexto de la infección viral. En los tres primeros capítulos de esta tesis se presentan interesantes resultados en esta dirección.

4. INTERACCIONES VIRUS-PLANTA

Las interacciones entre el virus y la planta son necesarias durante todas las etapas del ciclo viral, de modo que si la planta no es capaz de reconocer al virus como un invasor se establecerá una interacción compatible entre ambos que favorecerá la infección inicial. Por el contrario, si la planta reconoce específicamente al virus se establece una interacción incompatible que conlleva una respuesta de defensa por parte de la primera para intentar impedir la replicación y el movimiento del virus desde el foco inicial (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Entre los mecanismos desarrollados por las plantas para reconocer y hacer frente a los patógenos (virus, bacterias, hongos, ...) se encuentran mecanismos pasivos, como la presencia de paredes celulares, ceras y otras barreras químicas que constituyen una primera barrera de defensa (Osbourn, 1996), y mecanismos activos que comprenden toda una serie de proteínas y rutas que se detallan a continuación, así como las basadas en el silenciamiento génico, siendo el silenciamiento génico mediado por RNA la más importante.

4.1. Principales rutas de defensa frente a la infección viral

4.1.1. Resistencia mediada por genes R

Los genes R de plantas, que generalmente son monogénicos dominantes (Kang *et al.*, 2005), codifican proteínas características que poseen dominios de unión a nucleótidos (NB) y regiones ricas en leucina (LRR) (Collier y Moffett, 2009; Moffett, 2009; Gururani *et al.*, 2012). La especificidad frente al patógeno se regula por pequeñas modificaciones en la LRR (Farnham y Baulcombe, 2006). Estas proteínas también contienen dominios en su extremo Nt, algunos de los cuales son esenciales para la correcta resistencia de la planta, como los dominios TIR (Toll-Interleucina1) y CC (*coiled coil*, hélice superenrollada). Ambos dominios funcionan mediante interacciones intramoleculares y con otras proteínas (cofactores R) para reconocer el patógeno de forma eficiente (Collier y Moffett, 2009; Moffett, 2009). Cuando una proteína R reconoce a un patógeno, su interacción específica desencadena la respuesta hipersensible (HR, descrita en el siguiente apartado), caracterizada por una muerte celular programada (PCD) que induce lesiones necróticas en el sitio de la infección (Staskawicz *et al.*, 1995; Heath, 2000; Shirasu y Schulze-Lefert, 2003; Soosaar *et al.*, 2005), y que va acompañada de la respuesta sistémica adquirida (SAR, descrita en el apartado 4.1.4) que se produce en tejidos alejados del foco de infección (Soosaar *et al.*, 2005).

Además de los genes R dominantes, en infecciones virales también existe una respuesta de defensa regulada por genes recesivos (Robaglia y Caranta, 2006; Iyer-Pascuzzi y McCouch, 2007; Truniger y Aranda, 2009; Gururani *et al.*, 2012). En estas situaciones, las proteínas de defensa intervienen en la traducción de las proteínas virales, afectando tanto a la replicación como al movimiento del virus (Collier y Moffett, 2009; Gururani *et al.*, 2012). Entre estos genes se encuentran factores de iniciación de la elongación, chaperonas o TOMs (proteínas transmembrana del tonoplasto). Además, proteínas de la familia de las lectinas también pueden intervenir en la resistencia frente a patógenos, ya que se unen a mono- u oligosacáridos y son capaces de discriminar entre carbohidratos sintetizados por la propia célula y sintetizados por el patógeno (Van Damme *et al.*, 2004).

A pesar de que algunas especies del género *Citrus* son resistentes a determinados aislados de CTV (Garnsey *et al.*, 1987; Fang y Roose, 1999; Asíns *et al.*, 2004), la resistencia más común se encuentra en especies pertenecientes a la subfamilia *Aurantioideae*, que incluye especies de *Fortunella*, *P. trifoliata*, *Severinia buxifolia* y *Swinglea glutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987; Yoshida, 1996; Mestre *et al.*, 1997). En *P. trifoliata*, una especie resistente a la mayoría de aislados de CTV, el gen dominante *Ctv* es el responsable de la resistencia. Este gen se encuentra en una región de 121 Kb que incluye 10 genes (Yoshida, 1985, 1993; Gmitter *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Rai, 2006). También se ha identificado otro gen (*Ctv-m*) responsable de limitar la dispersión de CTV en plantas de *P. trifoliata* heterocigotos para el gen *Ctv* (Mestre *et al.*, 1997).

4.1.2. Respuesta hipersensible (HR) y necrótica: resistencia o interacción incompatible

Los mecanismos que emplean las células de una planta en la HR y la necrosis para combatir infecciones de virus, bacterias y hongos son similares. Durante una infección viral, la HR se inicia con la interacción de las proteínas Avr (patógeno) y R (planta), que conlleva cambios en los niveles de las hormonas de defensa, como el ácido salicílico o el ácido jasmónico, y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto en tejidos sanos como infectados (Culver y Padmanabhan, 2007; Carr *et al.*, 2010; Pallás y García, 2011; Mandadi y Scholthof, 2012). A nivel celular, la HR afecta a la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) y afecta tanto a la permeabilidad como al potencial de la membrana plasmática, impidiendo así la entrada de nuevos patógenos (Mur *et al.*, 2008). Además, durante la HR, se activan diversas proteasas del tipo caspasa que actúan como efectoras de la necrosis o muerte celular (Mur *et al.*, 2008). A nivel molecular, la HR induce una cascada de señalización que implica múltiples proteínas, incluyendo MAP quinasas. Después de la expresión de este primer grupo de proteínas se expresan otras relacionadas con la defensa como glucanasas, quitinasas y defensinas (Mur *et al.*, 2008).

Cabe destacar que los factores genéticos implicados en la HR están conservados en todos los géneros de plantas. Así, por ejemplo, se han descrito tres módulos de señalización en la HR, dos de los cuales intervienen en infecciones víricas. El primero de ellos está compuesto por las proteínas SGT1 (*suppressor of the G2 allele of Skp1*), que interacciona con RAR1 (*required for Mla12 Resistance-1*), HSP90 y las proteínas R (Austin *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003; Bieri *et al.*, 2004). Este complejo activa las MAP quinasas y los genes de defensa, provoca el cambio en los niveles de hormonas (Dodds y Rathjen, 2010) y facilita el plegamiento y estabilidad de las proteínas R para que reconozcan al patógeno. Asimismo, SGT1 también interacciona con diversas E3-ubiquitina ligasas (Azevedo *et al.*, 2002), lo que sugiere que cuando se activan las proteínas R, la defensa de la célula se lleva a cabo mediante la proteólisis mediada por ubiquitina. El segundo módulo que es capaz de activar la HR requiere la interacción de las lipasas EDS1 (*enhanced disease susceptibility-1*) y PAD4 (*phytoalexin deficient-4*) con SAG101 (*senescence-associated gene 101*) (Aarts *et al.*, 1998; Falk *et al.*, 1999, Feys *et al.*, 2001, 2005), y funciona de un modo similar al anterior.

4.1.3. Necrosis sistémica: interacción compatible

La mayoría de infecciones víricas no disparan el mecanismo de HR, así como tampoco inducen la aparición de lesiones necróticas localizadas para impedir la dispersión del virus en la planta sino que, por el contrario, lo que sucede es una necrosis tardía en los tejidos superiores no infectados. Otra diferencia, respecto a la necrosis mediada por HR, es que la necrosis sistémica es una respuesta capaz de matar a la planta, y no imposibilita la infección y dispersión del virus por la planta (Mandadi *et al.*, 2013). Es una respuesta poco conocida a nivel molecular, pero se sabe que ambos tipos de necrosis comparten algunas características como la PCD, la alteración de la expresión de genes de defensa y la acumulación de ROS (Xu y Roossinck, 2000; Kim *et al.*, 2008; Komatsu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012).

Estudios recientes han concluido que varios genes mediadores de la HR también están implicados en la necrosis

sistémica, como SGT1, RAR1 o las MAP quinasas (Komatsu *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2015), aunque la relevancia biológica de este tipo de necrosis se desconoce. Es probable que la necrosis sistémica se deba a un proceso incontrolado de necrosis mediada por HR que se activa en tejidos distales cuando la HR local es incapaz de impedir la dispersión del virus (Mandadi *et al.*, 2013).

4.1.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

Al igual que la HR, la SAR se activa mediante la interacción de las proteínas R y Avr en las células infectadas, pero en este caso la señal se transmite a las células no infectadas de los tejidos distales. Los mecanismos concretos de la SAR no están definidos, pero se sabe que la interacción local inicial de R y Avr desencadena la acumulación de ácido salicílico y jasmónico en los tejidos alejados del foco de infección (Vlot *et al.*, 2008). La proteína NPR1 (*non-expressor of PR1*) activa la expresión de los genes de defensa cuando los niveles de ácido salicílico aumentan (Dong, 2004; Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012) e interacciona también con algunos componentes de la señalización mediada por la acumulación de ácido jasmónico dependiendo del tipo de patógeno y del estado de la infección (Pieterse *et al.*, 2012; Giménez-Ibáñez y Solano, 2013).

A diferencia de la HR, la SAR es una respuesta inmune de larga duración, sin conocerse el mecanismo por el que se mantiene durante largos períodos de tiempo. No obstante, las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA o la remodelación de la cromatina, son críticas para mantener una SAR estable (Spoel y Dong, 2012). Además, se ha demostrado que este tipo de resistencia puede ser heredada en la siguiente generación de plantas aunque éstas no hayan sido expuestas al patógeno, suceso que requiere la proteína NPR1 (Luna *et al.*, 2012).

La naturaleza de la señalización sistémica de la SAR en los tejidos no infectados es poco conocida, pero se han propuesto distintos metabolitos que podrían estar implicados en dicho proceso como son el glicerol-3-fosfato (Chanda *et al.*, 2011), derivados del indol (Truman *et al.*, 2010), ácido azelaico (Jung *et al.*, 2009), salicilato de metilo (Park *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008) y

glicerolípidos (Chaturvedi *et al.*, 2008). Además, en la señalización de la SAR parece que también intervienen factores ambientales como la luz (Vlot *et al.*, 2008).

4.2. Silenciamiento génico mediado por RNA

El silenciamiento génico mediado por RNA comprende un conjunto de procesos de regulación que provocan la inactivación total o parcial de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas (Tomari y Zamore, 2005). Estos procesos incluyen la producción de dos tipos principales de RNAs en el caso de las plantas, miRNAs (microRNAs), RNAs altamente estructurados con porciones de doble cadena y los siRNAs (*small interfering RNAs*) de pequeño tamaño, a partir de un RNA de doble cadena (dsRNA) derivado de transcritos endógenos o exógenos, respectivamente (Krukko *et al.*, 2009).

La defensa antiviral mediada por el silenciamiento génico, a diferencia de los genes de resistencia (R), se caracteriza por su adaptabilidad a cualquier tipo de patógeno, ya que su especificidad no depende de la genética del huésped, sino de la secuencia del genoma viral (Voinnet, 2001). La activación del silenciamiento se desencadena cuando la célula reconoce el dsRNA viral, generado durante la replicación o por la unión de regiones complementarias de su gRNA. A continuación, una RNasa de tipo III llamada DICER (o *Dicer-like*, DCL) (Bernstein *et al.*, 2001) degrada este dsRNA, generando pequeños RNAs de 20-25 nucleótidos (siRNAs) (Xie *et al.*, 2004; Ghildiyal y Zamore, 2009) que se incorporan al complejo multiproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*), el cual dirige la degradación del RNA homólogo (Fig. 12) (Qu y Morris, 2005; Li y Ding, 2006). La unión de los siRNAs al complejo RISC requiere una proteína de unión a dsRNAs (DRB), que forma heterodímeros con DICER (Hiraguri, *et al.*, 2005; Adenot *et al.*, 2006; Nakazawa *et al.*, 2007). El componente principal del complejo RISC pertenece a la familia de las proteínas Argonauta (AGO) y tiene una estructura similar a la de la RNasa I (Bartel, 2004; Tomari y Zamore, 2005; Song y Joshua-Tor, 2006).

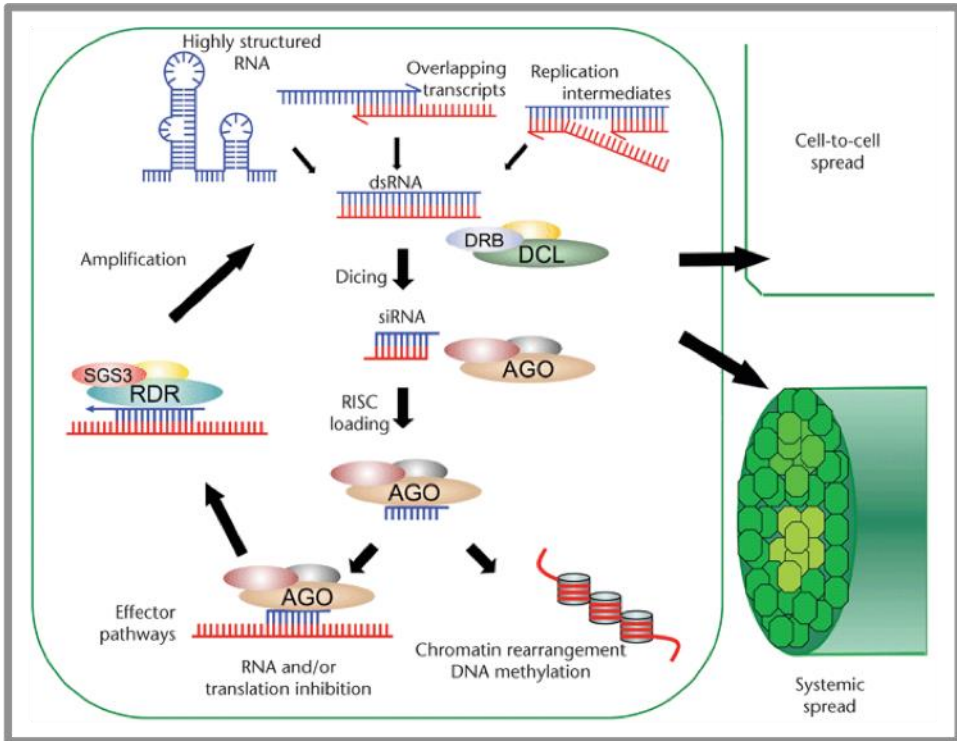


Fig. 18. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA en plantas. El proceso empieza con la formación de dsRNAs a partir del gRNA de un virus. Estos dsRNAs son procesados por DICER (DCL) para formar siRNAs, que son metilados por HEN1 e incorporados al complejo multiproteico RISC desencadenando la inhibición de la traducción, la degradación del mRNA o la metilación de la cromatina. La señal de silenciamiento puede propagarse célula-célula y sistémicamente, y además también puede amplificarse gracias a las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR). Tomado de Valli *et al.*, 2010.

Los siRNAs generados por DICER poseen un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos protuberantes en el 3' (Hamilton y Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002), los cuales son generalmente metilados por la metiltransferasa HEN1 (Boutet *et al.*, 2003) para protegerlos de su degradación (Li *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Frizzi y Huang, 2010). Los dúplex de siRNA metilados se separan gracias a una endonucleasa de la familia AGO y la hebra guía (cadena antisentido) se incorpora al complejo RISC, activándolo, mientras que la cadena sentido es

degradada (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Matranga *et al.*, 2005) (Fig 18).

El último componente importante en el mecanismo de silenciamiento son las enzimas RDR (RNA polimerasa dependiente de RNA), que pueden intervenir en la síntesis inicial de dsRNAs y en la amplificación de la señal de silenciamiento (Dalmay *et al.*, 2000; Wassenegger y Krczal, 2006). En este último proceso, las hebras guía de siRNAs localizan al mRNA complementario y actúan como cebadores para que la enzima RDR lo amplifique, sintetizando nuevas moléculas de dsRNA que serán procesadas por DICER e incorporadas a RISC, haciendo que la respuesta de silenciamiento persista en el tiempo (Fig. 18) (Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002; Voinnet, 2005).

4.2.1. Rutas de silenciamiento en plantas

Las rutas de silenciamiento que han desarrollado las plantas, al igual que otros organismos, incluyen una serie de procesos que pueden actuar a nivel transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) o post-transcripcional (PTGS). En el caso del TGS, el complejo RISC se une a un DNA complementario que resulta modificado por metilación, formando heterocromatina transcripcionalmente reprimida, mientras que en el PTGS el complejo RISC se une a un mRNA diana para degradarlo o impedir su traducción (Pantaleo, 2011).

La heterocromatina está constituida por DNA altamente condensado y mayoritariamente inactivo con regiones que han sufrido modificaciones como la metilación y cambios en ciertos aminoácidos que forman las histonas. En este sentido, el silenciamiento mediado por RNA vía TGS puede modificar el estado de la cromatina ya que los siRNAs son capaces de provocar la metilación del DNA con el que tienen homología de secuencia. Por otra parte, la alteración de ciertos genes implicados en el silenciamiento mediado por RNA induce una reducción del estado de metilación del DNA y una mayor actividad de éstos.

En la regulación de la expresión génica mediada por miRNAs en plantas, los miRNAs procesados por DCL1 se incorporan a un complejo RISC al poseer secuencias complementarias a los RNAs mensajeros de diversos genes con los que hibridan, promoviendo su

corte y degradación (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Muchos genes descritos cuya expresión está regulada por miRNAs son factores de transcripción o genes implicados en el desarrollo (Baulcombe, 2004). La regulación mediante miRNAs es un mecanismo muy eficaz al permitir inducir cambios metabólicos rápidos o en tejidos específicos, puesto que un único miRNA puede regular varios genes relacionados de una misma o distintas rutas y coordinar cambios de expresión en varios genes.

Por otra parte, la activación inicial del silenciamiento en plantas se produce a nivel de célula, pero posteriormente se extiende a las células adyacentes a través de los plasmodesmos mediante los siRNAs de 21 nucleótidos (Hamilton *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003; Dunoyer *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005). Además, estudios recientes han demostrado que tanto los siRNAs como los miRNAs tienen la capacidad de moverse a través de las células y alcanzar el sistema vascular con el fin de propagar la señal del silenciamiento a los tejidos más distales (Kalantidis *et al.*, 2008; Chitwood y Timmermans, 2010; Melnyk *et al.*, 2011). La actividad de la enzima RDR6, amplificando y manteniendo la señal de silenciamiento en las plantas, también estaría relacionada con la transmisión de la señal a larga distancia (Dalmay *et al.*, 2000).

4.2.2. Proteínas virales supresoras del silenciamiento génico mediado por RNA

Una de las estrategias más importantes que poseen los virus para contrarrestar la defensa del hospedador es la síntesis de proteínas supresoras del silenciamiento génico mediado por RNA. La mayoría de virus de plantas, si no todos, codifican al menos un supresor de silenciamiento, y en algunos casos más de uno como en los géneros closterovirus, crinivirus y begomovirus (Ding y Voinnet, 2007; Díaz-Pendón y Ding, 2008).

Como características generales, se puede decir que los supresores de silenciamiento son muy diversos, incluso dentro de una misma familia, ya que parecen haber evolucionado de manera independiente para realizar la misma función (Ding y Voinnet, 2007). Normalmente, las proteínas supresoras también están implicadas en otras funciones del ciclo viral como la replicación, el ensamblaje o el movimiento (Voinnet, 2005), pueden ser determinantes de

patogenicidad (Li y Ding, 2006) y, además, interferir en cualquier etapa de la ruta de silenciamiento (Roth *et al.*, 2004). Asimismo, existe una relación entre la capacidad de supresión de una proteína y la capacidad de movimiento del virus que la codifica, probablemente al permitir alcanzar mayores concentraciones intracelulares del patógeno y/o al bloquear el sistema de defensa en alguna de las etapas (Kasschau y Carrington, 2001; Bayne *et al.*, 2005).

Los mecanismos de acción de las proteínas supresoras de silenciamiento virales son muy variados, complejos y, en muchos casos, poco conocidos. De forma general, los supresores actúan sobre el RNA de la ruta de silenciamiento o interaccionando con los factores proteicos de la misma (Tabla Anexa 1). La estrategia más extendida entre los virus de plantas es la unión a dsRNAs largos y/o cortos como es el caso de los géneros closterovirus, cucumovirus, hordeivirus, ipomovirus, potyvirus, tombusvirus, tobamovirus, tospovirus y vitivirus (Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006). De este modo, si el supresor se une a dsRNAs largos (como es el caso de p38 del virus del arrugamiento del nabo, TCV), la inhibición se produce al competir DICER por su sustrato (Deleris *et al.*, 2006), mientras que si se une a siRNAs (como por ejemplo sería la p21 de BYV), éstos no se pueden unir al complejo RISC (Chao *et al.*, 2005; Mérai *et al.*, 2005, 2006; Lakatos *et al.*, 2006). Otras estrategias empleadas por los virus son la interferencia de la metilación de los siRNAs por parte de HEN1 (Ebhardt *et al.*, 2005; Vogler *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2007; Lozsa *et al.*, 2008) como se ha descrito para el supresor p130 del virus del mosaico del tomate (ToMV), o el corte de los siRNAs en fragmentos más pequeños (Kreuze *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2009) como lo observado en la RNAsa III del virus del enanismo clorótico de la batata (SPCSV), impidiendo así la activación del complejo RISC. Por otra parte, algunos supresores virales interaccionan con los factores proteicos de la ruta de silenciamiento, de modo que algunos de ellos pueden unirse al factor DRB (p6 de CaMV) impidiendo el procesamiento de los dsRNAs (Hiraguri *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008), o bien impedir el funcionamiento del complejo RISC mediante la unión (p0 del virus del amarilleo de la remolacha del oeste, BWYV) o degradación de la unidad catalítica AGO1 (p25 de PVX) (Bayne *et al.*, 2005; Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*,

2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007, 2008; Chiu *et al.*, 2010). Finalmente, también se sabe que algunos supresores actúan sobre las enzimas RDR (p69 del virus del mosaico amarillo del nabo, TYMV), o sobre alguna de sus proteínas asociadas, para impedir la síntesis de dsRNAs (Zrachya *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2008).

En CTV se han identificado tres proteínas que actúan como supresoras del silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Lu *et al.*, 2004): p23 actuaría a nivel intracelular reduciendo la degradación viral (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2013), p25 a nivel intercelular impidiendo la propagación de la señal de silenciamiento, y p20 a ambos niveles.

En esta tesis se analizará la capacidad patogénica de p20 y p25 de tres aislados de CTV que difieren en sus características patogénicas y la capacidad supresora a larga distancia de las p25 de dos de ellos (Capítulo 2).

4.2.3. Localización subcelular

La determinación de la localización subcelular de las proteínas supresoras de silenciamiento virales ha sido muy estudiada ya que puede aportar datos relevantes sobre su modo de acción. Las aproximaciones empleadas incluyen técnicas de fraccionamiento subcelular y microscopía, detección mediante marcaje inmunocitoquímico, mediante la fusión a proteínas fluorescentes o inmunoprecipitación. Los supresores de silenciamiento pueden localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula (Fig. 19) y sus distintos orgánulos y sistema de membranas, ya que es donde se encuentran todos los componentes de la ruta de silenciamiento.

La localización citoplasmática se ha verificado, por ejemplo, en el supresor de silenciamiento V2 de TYLCV (Tabla Anexa 1) (Zrachya *et al.*, 2006), donde forma gránulos que co-localizan con la proteína SGS3, que interviene en la ruta de silenciamiento y la cual es inhibida por V2 (Glick *et al.*, 2008). Hay supresores como la proteína 16K de TRV (Tabla Anexa 1) que, además de localizarse en el citoplasma, también se localizan en el núcleo gracias a una señal de localización nuclear (NLS) bipartita presente en su secuencia (Ghazala *et al.*, 2008). La misma localización se ha descrito para el

supresor NS3 de RSV (Tabla Anexa 1), aunque en este caso la NLS es monopartita (Xiong *et al.*, 2009). Pero también existen proteínas supresoras que, además de en el núcleo, también se localizan en el nucléolo, como es el caso del supresor 2b de CMV (Tabla Anexa 1) (González *et al.*, 2010) o de p14 de BNYVV y BSBMV (Tabla Anexa 1) (Chiba *et al.*, 2013). El nucléolo es esencial en las infecciones por muchos virus, sobre todo para poder infectar sistémicamente a su huésped, por lo que no es nada casual que ciertas proteínas virales se localicen en este orgánulo (Kim *et al.*, 2007; Hiscox *et al.*, 2010; Taliansky *et al.*, 2010).

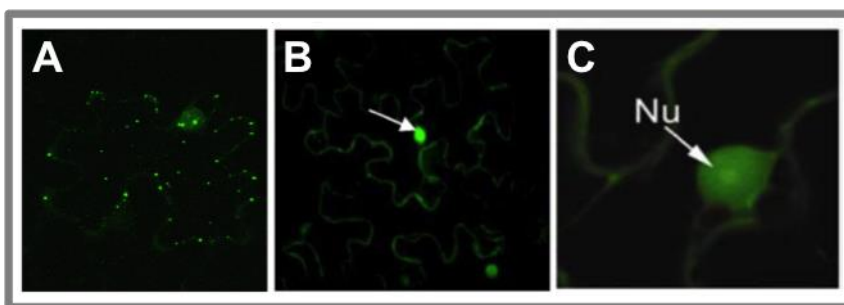


Fig. 19. Localización subcelular de distintas proteínas supresoras del silenciamiento génico en *N. benthamiana*. Se observa la localización citoplasmática de la proteína V2 de TYLCV (A), nuclear de NS3 RSV (B) y nucleolar de 2b de CMV (C). Nu: nucléolo.

A pesar de que el mecanismo de acción de los supresores de silenciamiento de CTV es poco conocido, su localización sí que ha sido estudiada en dos de ellos. Se ha descrito que p20 se localiza en los cuerpos de inclusión amorfos del citoplasma de protoplastos de *N. benthamiana* (Gowda *et al.*, 2000), y que p23 se localiza en el nucléolo, cuerpos de Cajal y plasmodesmos de células de *N. benthamiana* y *C. macrophylla* (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Los determinantes de localización de p23 también se han estudiado ampliamente, describiéndose una NoLS (señal de localización nucleolar) bipartita en la secuencia aminoacídica de esta proteína (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013).

4.3. La interacción CTV-naranja amargo

Se sabe que durante la evolución de CTV, éste adquirió distintos genes que le permitieron aumentar el rango de huéspedes a los que poder infectar. Uno de estos genes es *p33*, sin el cual el virus es incapaz de infectar sistémicamente el naranja amargo, pero sí sus raíces, lo que convierte a esta parte de la planta, en este huésped particular, en una de las más sensibles porque también consigue infectarlas sin la presencia de *p18* y *p13* (Tatineni *et al.*, 2011).

Además, CTV solo infecta una pequeña proporción de células asociadas al floema, pero existen diferencias entre huéspedes sensibles como *C. macrophylla* y parcialmente resistentes como naranja amargo. Así pues, se ha observado que en huéspedes sensibles existen bastantes focos de infección con un número de células infectadas que varía entre 3 y 12, mientras que en naranja amargo el número de focos de infección es mucho menor y sólo constan de una única célula infectada. Estos resultados sugieren que el título viral tan reducido detectado en naranja amargo se debe al pequeño número de células infectadas en comparación con huéspedes más sensibles, y que el movimiento de CTV en este huésped estaría limitado debido a interacciones poco eficientes entre sus proteínas de movimiento y los componentes celulares del naranja amargo (Folimonova *et al.*, 2008).

Asimismo, se ha demostrado que la expresión de *p23* en plantas transgénicas de naranja amargo induce síntomas característicos de CTV como el aclaramiento de las nerviaduras, la deformación de hojas o la defoliación (Fagoaga *et al.*, 2005). Cuando estas plantas son infectadas por CTV se observa un aumento del título viral que resulta superior que en plantas no transgénicas, y los focos de infección observados incluyen más de una célula. Esto sugiere que el silenciamiento por RNA podría limitar la infección por el virus, o que *p23*, además de actuar como supresora del silenciamiento, puede tener un papel importante en el movimiento célula a célula (Fagoaga *et al.*, 2011). De hecho, esta proteína se localiza tanto en el nucléolo como en los plasmodesmos de las células (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). En otras especies de plantas se ha observado que la expresión ectópica de un supresor de silenciamiento es capaz de inducir síntomas debido a la modificación

de los niveles de mRNA (Soitamo *et al.*, 2011) y a la alteración de las rutas de regulación de pequeños RNAs (Pacheco *et al.*, 2012). Estos cambios en los patrones de acumulación de pequeños RNAs, incluyendo miRNAs, también se han descrito en cítricos infectados con CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011).

4.4. Análisis de las interacciones virus-planta

El estudio de las interacciones entre las proteínas virales y las de la planta resulta crucial para entender cómo funcionan las proteínas virales dentro de las células infectadas para permitir la invasión del huésped, y así poder caracterizarlas mejor. Para ello abordar este tipo de estudios existen distintas técnicas.

El sistema de doble híbrido de levadura (del inglés *Yeast Two-Hybrid System*, Y2H) permite determinar si dos proteínas en estudio interactúan *in vivo*. Se basa en el hecho de que la mayoría de factores de transcripción son modulares, por lo que tienen un dominio de unión a DNA (BD) y otro de activación de la transcripción (AD), de forma que para que este tipo de factores sean funcionales, ambos dominios deben de estar relativamente cerca. Así, para comprobar si dos proteínas expresadas en levadura interactúan, una de ellas se ha de fusionar al BD y la otra al AD, y si esta interacción ocurre *in vivo*, se expresará un gen reportero cuya secuencia es reconocida por el BD correspondiente (Fields y Song, 1989). La ventaja de este sistema es que el estudio es *in vivo*, su desventaja que no es en planta y que sí las proteínas testadas tienen plegamientos incorrectos o modificaciones post-traduccionales que sólo se pueden adquirir en plantas, no serán funcionales en este sistema.

La técnica de *phage display* (PD) consiste en generar bacteriófagos recombinantes (M13, T4, etc.) que expresan sus proteínas de cubierta fusionadas a péptidos o proteínas que se quiere saber si interactúan con la proteína estudiada (Smith y Petrenko, 1997). Aunque se trata de una técnica más compleja que el doble híbrido, a diferencia de este, permite estudiar más proteínas en un mismo ensayo.

La co-inmunoprecipitación *pull-down* es una de las técnicas más empleadas para purificar complejos proteicos. Consiste en una

purificación por afinidad en la que la proteína de estudio se fusiona a un pequeño péptido con gran afinidad por las moléculas adheridas a la columna de purificación, de modo que la proteína en estudio es retenida junto con la proteína con la que interacciona. Esta técnica se suele combinar con la espectroscopía de masas para identificar los complejos purificados, lo que suele denominarse AP-MS (del inglés *affinity purification – mass spectroscopy*) (Dunham *et al.*, 2012).

La espectroscopía de masas (MS) es una técnica muy potente que permite estudiar interacciones macromoleculares *in vitro*. En esta técnica se producen iones que pueden ser detectados gracias a su *ratio* de masa:carga, permitiendo así la identificación de secuencias polipeptídicas (Aebersold y Mann, 2003; Di Tullio *et al.*, 2005). Para analizar los espectros de masas e identificar las proteínas por su secuencia se han desarrollado diversos algoritmos, alguno de los cuales encuentran las correlaciones entre los espectros teóricos y los experimentales, mientras que otros infieren las secuencias peptídicas a partir de la interpretación teórica del espectro de masas (Yates *et al.*, 1995; Taylor y Johnson, 1997; Pevzner *et al.*, 2000; Geer *et al.*, 2004).

Por último, otra de las técnicas más comunes para visualizar las interacciones entre proteínas *in vivo* es la complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Ésta se basa en la complementación estructural de los fragmentos Ct y Nt no fluorescentes de una proteína fluorescente (por ejemplo: GFP, YFP, etc.) (Ghosh *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002). Estos fragmentos se fusionan a las proteínas de estudio, de modo que si existe interacción entre ambas, los fragmentos quedan lo suficientemente cerca para reconstruir la proteína fluorescente y la señal emitida se puede visualizar mediante un microscopio de fluorescencia. El empleo de esta técnica ha permitido la detección de agregados proteicos, plegamiento y topología de proteínas, y cambios conformacionales (Shyu y Hu, 2008).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el mayor de los virus de ssRNA de plantas y el más complejo. Su rango de huéspedes restringido de forma natural a la infección del floema de algunas especies de cítricos, dificulta el estudio de su biología molecular sin conocerse aún los determinantes de patogenicidad y los mecanismos implicados en la inducción de los síndromes más característicos. El desarrollo de un sistema genético basado en la agroinfección sistémica de plantas de *Nicotiana benthamiana* con clones del aislado T36, provee una herramienta única para abordar este tipo de estudios. La respuesta diferencial que los aislados T36 y T318A de CTV muestran en este huésped, debe implicar la existencia de interacciones diferenciales entre algunas proteínas de estos aislados virales y las de *N. benthamiana*. A lo largo de este trabajo nos hemos basado en este modelo de interacción diferencial para estudiar los factores implicados en ellas. Dada la complejidad del virus, nos hemos centrado en caracterizar dos de sus proteínas supresoras del silenciamiento génico y evaluar la capacidad de evolución del virus en este huésped herbáceo. Los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral han sido:

1. Determinar la localización subcelular de las proteínas p20 y p25 (CP) de distintos aislados de CTV en *N. benthamiana* y cítricos, así como los posibles motivos implicados en la localización de la CP.
2. Estudiar la capacidad patogénica de las proteínas p20 y p25 de distintos aislados de CTV en *N. benthamiana* y la capacidad de supresión del silenciamiento a larga distancia de las proteínas p25.
3. Analizar la interacción diferencial de las p25 de los aislados T36 y T318A y su huésped, e identificar posibles proteínas interactoras de *N. benthamiana* mediante una aproximación proteómica.

4. Estudiar la evolución y posible adaptación de linajes de CTV al huésped no-natural *N. benthamiana*, y caracterizar biológica y genéticamente las poblaciones virales evolucionadas.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado anteriormente, el comportamiento de CTV en el huésped herbáceo *N. benthamiana* difiere según los aislados, de forma que sólo algunos de ellos son capaces de replicarse en protoplastos de esta especie. Así, aislados severos como T36 y T318A se replican de forma eficaz (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Ambrós *et al.*, 2013), mientras que otros más suaves como T385 o T30 no pueden hacerlo (Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ambrós *et al.*, 2014). Por otra parte, clones agroinfecciosos del aislado T318A equivalentes a los generados para T36, aunque se replican en hojas agroinfiltradas observándose la máxima acumulación viral a dos semanas post-inoculación, sólo producen infecciones locales que decaen sin inducir una infección sistémica. Además, la proteína de la cápsida (CP) p25-T318A nunca fue detectable en las hojas agroinfiltradas a distintos tiempos post-inoculación (ELISA) (Ruiz-Ruiz, 2009), mientras que la CP de T36 era detectable a partir de 6-8 dpi. Ello sugiere la existencia de alguna/s interacción/es diferencial/es entre proteínas de T36/T318A y proteínas del huésped *N. benthamiana*, responsable/s de que T318A no pueda moverse bien célula-célula y/o a larga distancia en este huésped o establecer la/s interacción/es necesarias para ello.

Dicha respuesta diferencial en *N. benthamiana* puede permitir estudiar los posibles factores implicados en la interacción de estos genotipos de CTV con su huésped, siendo ésta una aproximación anterior al estudio de las interacciones CTV-cítricos, un sistema mucho más difícil de abordar. Además, el hecho de que muchos de los síntomas inducidos por CTV en *N. benthamiana* sean similares a los observados en infecciones naturales del virus en cítricos, sugiere que muchas de las interacciones proteína-proteína y/o las rutas implicadas en la patogénesis de CTV serían comunes en ambos patosistemas lo que avala nuestro abordaje experimental.

Así pues, siguiendo esta aproximación para el estudio de dichas interacciones, una de las estrategias adecuadas es fusionar una o más proteínas del virus a la proteína fluorescente verde (GFP) y determinar su localización subcelular mediante microscopía confocal. Conocer la localización de las proteínas puede ayudar a determinar cuál es su función molecular, celular y/o bioquímica.

El transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma es un proceso bidireccional que se lleva a cabo exclusivamente a través de los poros nucleares (Allen *et al.*, 2000; Fahrenkrog *et al.*, 2002), unas estructuras proteicas en forma de cilindro que permiten la difusión pasiva de moléculas con un tamaño (en general) de hasta 50-60 kDa o menor de 10 nm de diámetro (Eulalio *et al.*, 2004). Sin embargo, para transportar proteínas de mayor tamaño se requiere un transporte activo en el que participan unas moléculas mediadoras llamadas importinas y exportinas (Lange *et al.*, 2007), proteínas pertenecientes a la familia de las carioferinas (Kap). Esta familia está compuesta por proteínas ácidas solubles con un peso molecular de 95-145 kDa que contienen diversas repeticiones HEAT (una estructura hélice-bucle-hélice), un dominio Nt de unión a Ran-GTP y, además, son capaces de interactuar con las nucleoporinas del poro nuclear (Mosammaparast y Pemberton, 2004). La energía necesaria para el transporte de estas moléculas la proporcionan las proteínas Ran, un grupo de GTPasas monoméricas de 24 kDa de la familia Ras que unen GTP en una región altamente conservada de la proteína llamado dominio G (Quimby y Dasso, 2003). La distribución asimétrica de Ran-GTP en el núcleo y de Ran-GDP en el citoplasma hace que exista una direccionalidad en el transporte (Kalab *et al.*, 2008) mantenida por las proteínas RanGAP y RanGEF, encargadas de promover la unión de GDP a Ran en el citoplasma y la de GTP en el núcleo, respectivamente (Fig. 1) (Mosammaparast y Pemberton, 2004).

El transporte nucleocitoplasmático activo de proteínas Cargo está regido por motivos de secuencia específicos como las señales de localización nuclear (NLS) y las de exportación nuclear (NES). Las NLS se caracterizan por contener grupos de aminoácidos básicos de tipo lisina o arginina, pueden ser mono- o bipartitas y son reconocidas por receptores del tipo importina (Hodel *et al.*, 2001). La secuencia K-K/R-X-K/R (X corresponde a cualquier aminoácido), basada en la primera NLS descrita en el antígeno T del SV40, se ha propuesto como consenso de las señales NLS monopartitas (Chelsky *et al.*, 1989; Kosugi *et al.*, 2009), mientras que la secuencia KR-X₍₁₀₋₁₂₎-KKKK, basada en la de la nucleoplasmina, se considera la consenso para las NLS bipartitas (Dingwall *et al.*, 1988; Kosugi *et al.*, 2009) (Tabla 1).

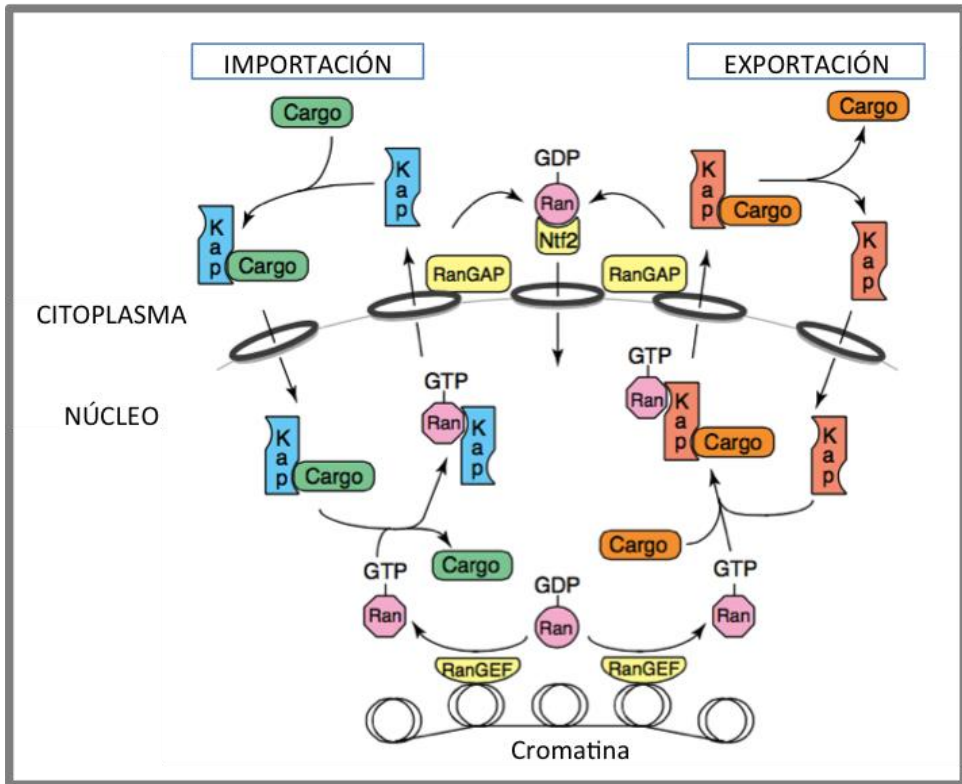


Fig. 1. Esquema del sistema de importación y exportación nucleocitoplasmático. Durante la importación, las carioferinas (Kap) se unen a la proteína a traslocar (Cargo), atraviesan el poro nuclear, la Kap se une a Ran-GTP liberando la proteína Cargo en el núcleo y el complejo Kap-Ran-GTP vuelve al citoplasma, donde el GTP se hidroliza a GDP y el complejo se separa. Durante la exportación, las Kap se unen a Cargo y a Ran-GTP en el núcleo, salen al citoplasma y el complejo se disocia con la hidrólisis del GTP. Esta hidrólisis se ve favorecida por la proteína RanGAP. El factor Ntf2 se encarga de devolver a Ran-GDP al núcleo, mientras que RanGEF (que se encuentra unida a la cromatina) intercambia el GDP por GTP. Tomado de Mosammaparast y Pemberton, 2004.

Además de éstas, en la naturaleza existen muchas otras variantes de NLS que también pueden ser reconocidas por las importinas (Tabla 1).

Como se ha indicado, las importinas translocan las proteínas Cargo al núcleo y se han descrito dos tipos, α y β , cada una de las cuales con varias isoformas. La importina α posee un dominio llamado IBB en su extremo Nt para la unión a la importina β 1 (Hu et

al., 1999; Hübner *et al.*, 1999) y sus isoformas se han relacionado con distintas funciones en la célula y la unión a proteínas concretas (Nadler *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1997). Esta importina reconoce las NLS presentes en las proteínas y se une a ellas, formando un complejo proteína-importina α , complejo que se une a la importina $\beta 1$, que es la encargada de unirse al poro nuclear y posibilitar la translocación (Fig. 1) (Peters, 2006). Las importinas β , en ausencia de las α , también son capaces de reconocer NLS y formar homodímeros para transportar proteínas (Tiganis *et al.*, 1997; Truant y Cullen, 1999; Lam *et al.*, 1999) gracias a otros dominios denominados BIB presentes en ellas. Para posibilitar la última etapa de entrada al núcleo, la proteína Ran-GTPasa se une a la importina $\beta 1$ y proporciona la energía necesaria para llevar a cabo el proceso (Kosugi *et al.*, 2009). Este mecanismo de importación nuclear ayuda a los virus a importar las partículas virales en las etapas iniciales de la infección y a transportar las proteínas virales recién sintetizadas al citoplasma (Bremner *et al.*, 2001).

No todas las proteínas que presentan una NLS en su secuencia se localizan en el núcleo, ya que algunas de ellas pueden encontrarse en el citoplasma si su NLS está bloqueada o si no es accesible debido a su conformación. También existen proteínas que, a pesar de no poseer una NLS, pueden ser co-transportadas al núcleo con alguna otra proteína nuclear (Roberts *et al.*, 1987; Freitas y Cunha, 2009; Ding *et al.*, 2010). Además, aunque las señales NLS clásicas están bien definidas, existen muchas NLS cuya secuencia no se parece a las señales canónicas, y otras señales no funcionales cuya secuencia es idéntica a una NLS consenso (Siomi y Dreyfuss, 1995; Lee *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009). Un ejemplo de ello es la PY-NLS, un dominio presente en el extremo C-t de algunas proteínas que es reconocido por la importina $\beta 2$ y cuya secuencia es R/K/H-X₍₂₋₅₎-P-Y (la X equivale a cualquier aminoácido).

Son muchos los virus de plantas que en alguna de las fases de su ciclo replicativo requieren la presencia de alguna de sus proteínas en el núcleo para su funcionamiento óptimo. Un ejemplo de ello es la proteína supresora del silenciamiento génico 2b del virus del mosaico del pepino (CMV), que es además un determinante de patogenicidad viral cuya característica destacable es la presencia de 2 NLSs en su secuencia (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de señales NLS incluyendo las secuencias consenso del T-Ag SV40 y la nucleoplasmina, así como ejemplos de virus animales y plantas, indicando la importina implicada en su reconocimiento.

Tipo de NLS	Proteína	Secuencia aminoacídica	Importina
Monopartita	SV40 T-Ag	PKKKRKV	α
	ORF3 GRV	RPRRRAGRSGMDPR	α
	TrAP EACMCV	PRRRR	α
	VPg PVA	KRQRQK / KKGKTKGKTH	α
	2b CMV	KKQRRR / RRER	α
	Antígeno Hepatitis D	EGAPPAKRAR	α
	p53 murina	PPQPKKKPLDGE	α
Bipartita	Nucleoplasmina	KRPAATKKAGQAKKKKLD	α
	AC2 MYMV	KKRAIRRSR	α
	Proteína N PYDV	QKRANEEAPPAAQKR	α
	Replicasa TMV	RRLYDTAVEEFNARDRRPK	α
	Receptor glucocorticoides	YRKCLQAGMNLEARKTKKKI KGIQQATA	α
	RCC1	MSPKRIAKRRSPPADAIPKS KKVKVSHR	α
Rica en arginina	HTLV-1 Rex	MPKTRRRPRRSQRKRPT	β
	HIV-1 Rev	RQARRNRRRRWR	β
Atípica	Mata2	MNKIPIKDLLNPQ / VRILESWFAKNI	α
	Antígeno Hepatitis B	SKCLGWLWG	α
	hnRNP A1 humana	NQSSNFGPMKGGNFGGRS SGPYGGGGQ- YFAKPRNQGGY	β

Estas señales son imprescindibles para mantener su función, ya que sin ellas pierde la localización nuclear y la capacidad patogénica en la mayoría de huéspedes (Wang *et al.*, 2004). Otra proteína que posee 2 NLSs en su secuencia es la VPg del virus A de la patata (PVA) (Tabla 1), sin las cuales su virulencia se reduce drásticamente (Rajamäki y Valkonen, 2009). Por otra parte, la replicasa del virus del mosaico del tabaco (TMV) contiene una NLS bipartita (Tabla 1), cuya delección impide la replicación del virus (Figueira *et al.*, 2002). Diversos virus como los begomovirus y virus de RNA como el *Turnip crinkle* (Virus del arrugamiento del nabo,

TCV) requieren un transporte regulado de sus CPs al núcleo para completar su ciclo infeccioso, bien por facilitar la entrada del genoma viral al núcleo, la inducción de síntomas, su interacción indispensable con factores del huésped que afectan a su replicación o acumulación, a su movimiento o a la interacción con factores implicados en las rutas de defensa del huésped (Kunik *et al.*, 1998; Yaakov *et al.*, 2011; Sharma e Ikegami, 2009; Kang *et al.*, 2015).

Las NoLS (señales de localización nucleolar), al igual que las NLS, son motivos cortos de aminoácidos básicos, pueden ser mono- o bipartitas y son reconocidas por importinas (Hiscox, 2007). En el caso de CTV, se ha descrito una/s NoLS en la proteína p23 que mediaría su localización en el nucléolo de células de *N. benthamiana* y cítricos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). La localización de ciertas proteínas víricas en este orgánulo parece esencial en muchos virus para posibilitar la infección sistémica (Kim *et al.*, 2007).

Por otra parte, las NES clásicas consisten en un motivo de 10-15 residuos ricos en leucina (*leucine-rich* NES) y aminoácidos hidrofóbicos que regulan la exportación de proteínas al unirse a receptores del tipo exportina. Las exportinas son proteínas pertenecientes a la familia de las importinas β , contienen repeticiones armadillo (secuencia de unos 40 residuos que forman 2 hélices α generando una horquilla) y, además de proteínas, también pueden exportar RNAs y complejos ribonucleoproteicos (Boulo *et al.*, 2007). Para ello, la exportina-1 (CRM1) reconoce este tipo de secuencias consenso y se une a la proteína que la posee (Fornierod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997) además de unirse a la proteína Ran, que proporciona la energía necesaria para translocar la molécula del núcleo al citoplasma (Fig. 1). Este tipo de secuencia está ampliamente distribuida, sobretudo en proteínas que contienen hélices α , por lo que no todas actuarán como NES y, además, si hay prolinas presentes entre los aminoácidos hidrofóbicos también pueden impedir su función (Dong *et al.*, 2009).

En virus de plantas se han descrito distintas NES, todas ellas del tipo *leucine-rich*. Un ejemplo de ello es la presente en la proteína V2 del virus A del rizado de las hojas del tomate de Java (ToLCJV-A), donde en su extremo Nt se encuentra la secuencia ²⁰LAVKYLQLV²⁹ (Tabla 2) que transloca la proteína V2 al citoplasma (Sharma *et al.*, 2011). También en la proteína p6 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) existe una NES en el extremo Nt con

la secuencia ¹¹EKILMLELDL²⁰ (Haas *et al.*, 2005), que es muy semejante a la secuencia ¹⁸⁵EKDTLLIDL¹⁹³ encontrada en la proteína BR1 del virus del rizado de las hojas del chayote (SqLCV) (Ward y Lazarowitz, 1999) (Tabla 2).

Aunque la NES rica en leucinas es la más conocida y común, también se han descrito otro tipo de señales de exportación menos comunes como las NES ricas en prolinas o las ricas en serina y aminoácidos ácidos (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de NES descritos con ejemplos de proteínas que las contienen, incluidas algunas de virus de plantas.

Tipo de NES	Proteína	Secuencia aminoacídica
Rica en leucinas	NS1 del virus de la gripe	FDRLETLILL
	cAMP-dependiente PKI	LALKLAGLDI
	V2 del ToLCJV-A	LAVKYLQLV
	p6 del CaMV	EKILMLELDL
	BR1 del SqLCV	EKDTLLIDL
Rica en prolinas	HDAg-L de la hepatitis D	ILFPADPPFSPQS
Rica en serina y aminoácidos ácidos	hnRNP K humana	GFSADETWDSAITWSPSEWQMAY

CTV es el único virus que posee tres proteínas supresoras del silenciamiento génico que difieren en su función supresora: mientras p23 sólo suprime a nivel intracelular, p25 lo hace a nivel intercelular y p20 actúa a ambos niveles (Lu *et al.*, 2004). Hasta el momento, sólo se ha descrito con detalle la localización subcelular de p23, que se acumula en el núcleo, nucléolo y cuerpos de Cajal y en plasmodesmos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Se ha ensayado un número importante de mutantes de delección o sustitución de p23 por alanina, que han permitido delimitar diversas regiones de la proteína con posibles señales NLS y/o NoLS, aunque ninguna de ellas sigue las secuencias canónicas descritas hasta el momento. También se han definido los dominios de la proteína implicados en otras funciones como unión a RNA y capacidad supresora (López *et al.*, 2000; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Sin embargo, todos estos trabajos sólo se han realizado con la p23 del aislado de referencia CTV-T36.

Estudios previos realizados con p20, utilizando la técnica del doble híbrido, revelaron que esta proteína tiene mucha afinidad por sí misma y que es capaz de formar agregados *in vivo*, sugiriendo su participación en la formación de los cuerpos de inclusión citosólicos asociados a las infecciones por CTV en cítricos (Gowda *et al.*, 2000). Estos resultados se confirmaron al infectar protoplastos de *N. benthamiana* con un clon de CTV que expresaba la proteína de fusión p20-GFP, donde se observaron agregados amorfos citoplasmáticos similares a los cuerpos de inclusión (Fig. 2) (Gowda *et al.*, 2000).

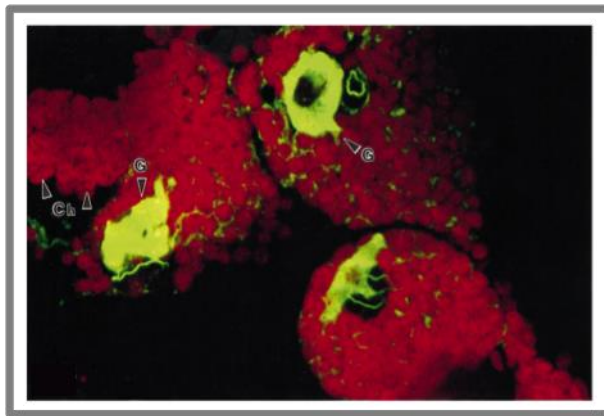


Fig. 2. Imagen de microscopía confocal donde se observan los agregados de p20-GFP en el citoplasma de varios protoplastos. G: GFP; Ch: cloroplastos. Tomada de Gowda *et al.*, 2000.

Por todo ello, el estudio que aquí se aborda sobre la localización subcelular de la p20 y p25 de diversos aislados de CTV en su huésped natural y herbáceo, así como el análisis de su secuencia aminoacídica, puede: i) permitir dilucidar diferencias existentes en su localización subcelular según el aislado y/o la planta-huésped, y ii) determinar la existencia de motivos que regulen su localización y, en caso de ser así, estudiar su función a través de la generación y ensayo de mutantes puntuales y/o de delección para confirmar la presencia de estas señales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislados de CTV y huéspedes cítricos

En los experimentos realizados se utilizaron tres aislados de CTV bien caracterizados biológicamente y con propiedades patogénicas y orígenes diferentes: el aislado T36 de Florida (proporcionado por el Dr. W.O. Dawson, Universidad de Florida-CREC, Lake Alfred, USA) y los aislados de origen español T318A y T385, pertenecientes a la colección de aislados del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dichos aislados se mantienen en plantas de naranjo dulce (*C. sinensis* (L.) Osb.) injertadas sobre patrones de citrange Carrizo (*C. sinensis* × *P. trifoliata* (L.) Raf.) en un recinto de malla antipulgón. En cambio, el aislado T36 fue inoculado en plantas de semilla de lima Mexicana y *C. macrophylla* Webster, que se mantuvieron en un invernadero con control de temperatura (18/26 °C noche/día).

T385 es un aislado suave, poco agresivo y solo induce clorosis nervial muy tenue en hojas de lima Mexicana, mientras que T36 y T318A son aislados virulentos que causan síntomas de moderados a intensos en lima Mexicana, decaimiento de naranjo dulce propagado sobre naranjo amargo, SY (T36), y SP en pomelo y naranjo dulce (T318A) (Ballester-Olmos *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1993; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006).

Para los estudios de localización subcelular en cítricos se utilizaron plantas juveniles (4-8 meses) de *C. macrophylla*, naranjo dulce, naranjo amargo y lima mexicana. Todas las plantas de cítricos se cultivaron en macetas con una mezcla artificial (50% turba y 50% arena) y un sistema de fertilización previamente optimizado (Arregui *et al.*, 1982).

2.2 Fusión de los genes *p20* y *p25* de CTV al gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*) y clonación en un plásmido binario de expresión en planta

Los genes *p20* y *p25* (549 y 672 pb, respectivamente) de los aislados T36, T318A y T385 de CTV se amplificaron por PCR con cebadores específicos que incluían los sitios de restricción *PagI* o *NcoI* en el extremo 5' (sentido mensajero) y *NheI* en el extremo 3' (antisentido) (Tabla 3). Los dos primeros se amplificaron utilizando la

iProof (Bio-Rad) DNA polimerasa de alta fidelidad de copia y los clones de cDNA de longitud completa del genotipo T36 (Satyanarayana *et al.*, 2001) y T318A (Ruiz-Ruiz, 2009) como molde. Las reacciones de amplificación contenían una mezcla de tampón iProof HF 1X, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 0.4 μM de cada uno de los cebadores y 1U de la DNA polimerasa iProof y las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 30 s a 98°C, 35 ciclos de 10 s a 98°C, 20 s a 60°C y 30 s/kb a 72°C, seguidos de un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. En el caso de T385, se utilizó como molde preparaciones ricas en dsRNA, obtenidas mediante cromatografía en columna de celulosa no iónica tipo CF-11 (Moreno *et al.*, 1990) para realizar una reacción de retrotranscripción (RT) a partir de 1-2 μg de los extractos. Éstos se desnaturalizaron con hidróxido de metilmercurio 0.1 M a temperatura ambiente durante 10 min, se incubaron en hielo con β-mercaptoetanol 1.4 M y se añadió la mezcla de reacción (Tris-acetato 50 mM pH 8.4, 75 mM acetato de potasio, 8 mM acetato de magnesio, 5 mM DTT, 1 mM dNTPs y 1 μM del cebador), 40U de RNaseOUT y 15U de transcriptasa inversa ThermoScript (Invitrogen). Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo de 75 min a 60°C para sintetizar el cDNA y otro de 15 min a 85°C para inactivar la enzima, seguidas de un tratamiento con 2U de RNasa H (Invitrogen) a 37°C durante 20 min para eliminar el RNA complementario al cDNA. Las condiciones de amplificación utilizadas son las mismas que las detalladas previamente.

Los productos amplificados se purificaron con el kit “GeneClean Turbo for PCR” (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante, se digirieron con las enzimas correspondientes y se clonaron en un plásmido tipo pBluescript II SK+ (pBS) modificado (cedido amablemente por el Dr. Vicente Pallás, IBMCP-UPV-CSIC, Valencia), previamente digerido con las enzimas *NcoI* y *NheI*, utilizando un protocolo estándar con la T4 DNA Ligasa (New EnglandBioLabs) (Sambrook *et al.*, 1989). De este modo, los genes se clonaron entre el promotor 35S duplicado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) seguido del gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*) y el terminador del inhibidor de proteasa de la patata (PoPit) (Fig. 3) para obtener así por traducción las proteínas p20 y p25 fusionadas en pauta a la proteína GFP.

Los cassettes 35S:p20-GFP:PoPit y 35S:p25-GFP:PoPit resultantes se liberaron digiriendo con *Hind*III, que flanquea dicho cassette, y se subclonaron en el vector binario pMOG800 (Knoester *et al.*, 1998) previamente digerido con la misma enzima. Los constructos obtenidos se transformaron por electroporación en células competentes de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* (amablemente cedida por la Dr. Hamilton de la Cornell Research Foundation) portadoras del plásmido pCH32 que contiene copias extra de los genes de virulencia *virG* y *virE*.

Tabla 3. Secuencia y posiciones de los cebadores empleados para amplificar los genes *p20* y *p25* de los aislados T36, T318A y T385 para su clonación en el plásmido pBS modificado.

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
p20D	TGACGATCATGA ¹ GAGCTTACTTTAGTGTT AA	17765-17787 ^a
p20-T36R	TGACGAGCTAGC ² CACGCAAGATGGAGA GACTAAAT	18288-18310 ^a
p20-T318R	TGACGAGCTAGC ² CACGCATGAAGGAGA AACTAAAT	18240-18264 ^b
p20-T385R	TGACGAGCTAGC ² CACGCAAGACGGAGA AACTAAAT	18248-18270 ^c
p25-T36D	TGACGACCATGG ³ ACGACGAAACAAAGAA ATTGAAG	16155-16181 ^a
p25-T36R	TGACGAGCTAGC ² ACGTGTGTTGAATTTTC CCAAGCTGC	16799-16823 ^a
p25-T318D	TGACGACCATGG ³ ACGACGAGACAAAGAA ATTGAAGAAC	16110-16139 ^b
p25-T318R	TGACGAGCTAGC ² ACGTGTGTTAAATTTTC CCAAGCTGC	16754-16778 ^b
p25-T385D	TGACGACCATGG ³ ACGACGAAACAAAGAA ATTGAAG	16116-16142 ^c
p25-T385R	TGACGAGCTAGC ² ACGTGTGTTAAATTTTC CCAAGCTGC	16760-16784 ^c

D indica sentido mensajero o directo y R antisentido o reverso

Se indican los sitios de corte para *PagI* (1), *NheI* (2) y *NcoI* (3) que aparecen con caracteres subrayados

^{a,b,c} Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T36, T318A o T385 depositadas en GenBank (U16304, DQ151548 o Y18420, respectivamente)

Todas las construcciones generadas se comprobaron mediante secuenciación en ambos sentidos (ABI Prism 3100).

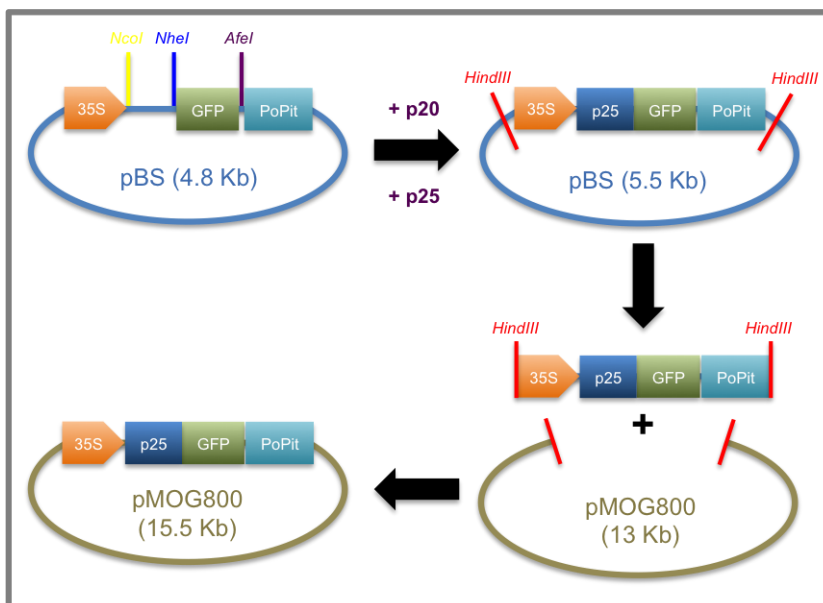


Fig. 3. Esquema de las etapas de clonación para obtener las construcciones genéticas de las proteínas p20 y p25 de CTV fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP).

2.3 Transformación de células competentes mediante electroporación

Las células competentes de las cepas *A. tumefaciens* C58 y *E. coli* JM109 se transformaron con los plásmidos correspondientes utilizando 10-30 ng de cada plásmido y 50 μ l de células competentes descongeladas en hielo. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación estéril y fría, la cual se sometió a una descarga eléctrica de 2.5 KV, con una resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 μ F, utilizando un electroporador Gene PulserXcell (Bio-Rad). Las células se resuspendieron inmediatamente en 750 μ l de medio LB (Luria-Bertani), se incubaron en agitación durante 1h a 28 (*A. tumefaciens*) o 37°C (*E. coli*) y, finalmente, se sembraron en placas Petri de medio LB que contenía 100 mg/l de rifampicina y 75 mg/l de

kanamicina en el primer caso o 100 mg/l de kanamicina en el segundo.

2.4 Sustitución del gen de *gfp* por el de *rfp* (proteína fluorescente roja)

Para expresar la proteína p25 de los aislados T36 y T318A de CTV fusionada a la proteína fluorescente roja (RFP), el gen de *gfp* de las construcciones anteriores se liberó digiriendo los plásmidos pBS correspondientes con las enzimas *NheI* y *AfeI*, y se sustituyó por el gen de *rfp*. Para ello, el gen de *rfp* (711 pb) se amplificó con cebadores específicos que contenían secuencias de corte para las enzimas mencionadas (Tabla 4) utilizando el plásmido pCB302-Nuc-mRFP como molde (Genovés *et al.*, 2009) y las mismas condiciones descritas.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar el gen *rfp*.

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
RFP-D	CACAGCTAGC ¹ ATGGTGAGCAAGGGCGAG	-
RFP-R	CACAAGCGCT ² TTACTTGTACAGCTCGTCC	-

D indica sentido directo y R reverso

Se indican los sitios de corte para *NheI* (1) y *AfeI* (2) que aparecen con caracteres subrayados

A continuación, los cassettes 35S:p25-RFP:PoPit obtenidos se digirieron con *HindIII* y se subclonaron en el vector binario pMOG800. Finalmente, los plásmidos resultantes se transformaron por electroporación en células competentes de la cepa C58 de *A. tumefaciens*.

2.5 Expresión de la proteína p25-GFP *in vivo* en un contexto viral heterólogo

Para expresar la proteína p25-GFP (1.25 kb) de los aislados T36 y T318A *in vivo* como un sgRNA del virus X de la patata (PVX), los cassettes de los clones pBS correspondientes se amplificaron

con cebadores específicos que incluían sitios de restricción para las enzimas *EagI* y *SaI* (Tabla 5) en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Las condiciones de amplificación y purificación fueron las mismas que las descritas con anterioridad, salvo que el cassette del aislado T36 se amplificó mediante PCR solapante al solapar dos fragmentos más pequeños para introducir una mutación silenciosa que eliminase el sitio de corte *EagI* presente en el gen p25 de este aislado. Ambos fragmentos, obtenidos con los cebadores p25-T36D + p25-T36R2 (producto 5' de 450 pb) y p25-T36D2 + GFP-R (producto 3' de 850 pb) se solaparon mediante una reacción que contenía tampón Taq 1X (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 1 mM dNTPs, 50 y 100 ng de cada producto, respectivamente, y 5U de la Taq DNA polimerasa (Roche). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 1 min a 92°C, 6 ciclos de 20 s a 92°C, 1 min a 60°C y 90 s a 72°C, seguidos de un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C sin cebadores. El fragmento final completo se obtuvo mediante una reacción de PCR en las mismas condiciones descritas para la DNA polimerasa iProof (Bio-Rad) usando como molde 1 µl de la reacción anterior y los cebadores externos p25-T36D + GFP-R. La purificación se realizó a partir de la banda obtenida en un gel de agarosa al 0.8% con el kit "Invisorb Fragment Clean Up" (Strattec Biomedical) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los fragmentos purificados se digirieron y se clonaron en el vector de PVX, pPVX202 (Fig. 4) (Sablowski *et al.*, 1995) utilizando la T4 DNA Ligasa (New EnglandBioLabs). Los constructos obtenidos se purificaron e inocularon mecánicamente con carborundum en 5 bioensayos independientes con lotes de 4-5 plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad, y aplicando 30 µl de inóculo (60 ng/µl pPVX202, 50 mM K₂HPO₄ y agua libre de RNAsas).

La localización subcelular de p25 en *N. benthamiana* se determinó a las 2-3 semanas post-inoculación en las hojas que presentaban síntomas, previamente infiltradas con un cultivo de *A. tumefaciens* que expresaba un marcador nucleolar de fibrilarina (pROK2-Fib-mRFP; Kim *et al.*, 2007) y que se visualizaron a D1-2 post-infiltración con el microscopio confocal (Leica TCS SL).

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación del cassette p25-GFP de los aislados T36 y T318A para su clonación en el vector viral pPVX202 (Sablowski *et al.*, 1995).

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
p25-T36D	ACAACGGCCG ¹ ATGGACGACGAAACAAAGAA ATTGAAG	16155-16181 ^a
p25-T36R2	CCAGCCGGAATCCCTGCGTCTAGCG	16642-16666 ^a
p25-T36D2	AGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGG	16608-16633 ^a
p25-T318D	ATGACGGCCG ¹ ATGGACGACGAGACAAAGA AATTGAAG	16110-16136 ^b
GFP-R	GGTGGTGTCTGAC ² TCAGTTATCTAGATCCGG TGGATCCCGGGCCCGCGGTACCGTTGACTG	-

D indica sentido directo y R reverso

Se indican los sitios de corte para *EagI* (1) y *SaII* (2) que aparecen con caracteres subrayados

^a Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T36 (a) o T318A (b) depositada en la base de datos (GenBank n° de acceso U16304)

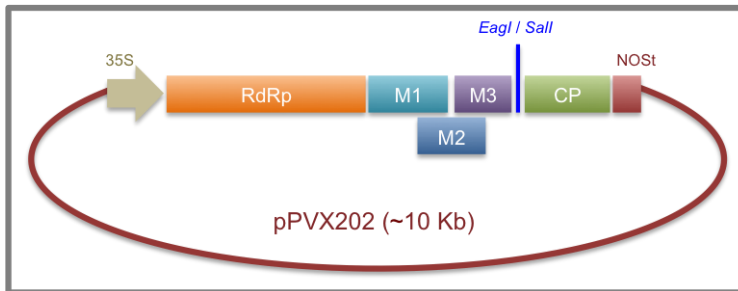


Fig. 4. Esquema del vector viral de expresión en planta pPVX202 del virus X de la patata (PVX) que contiene el genoma completo de PVX con los sitios de corte para clonar genes foráneos y expresarlos en planta como un sgRNA del virus. 35S: promotor 35S del CaMV; RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA; M1: proteína de movimiento 1; M2: proteína de movimiento 2; M3: proteína de movimiento 3; CP: proteína de cubierta; NOS: terminador NOS.

2.5 Intercambio de regiones de p25 y obtención de proteínas híbridas

Para obtener proteínas híbridas y estudiar así los posibles motivos responsables de su localización subcelular, la p25 de los

aislados T36 y T318A se clonó en el vector comercial pUC19/*Sma*I (Fermentas) y se digirió utilizando los sitios de corte únicos *Cl*AI y *A*vaI presentes en ambas proteínas, y los sitios de corte *N*coI o *N*heI de los extremos. Se realizaron los intercambios de las 3 regiones (R1, R2 y R3) mediante una digestión combinada de una o dos de las enzimas sobre los plásmidos originales tipo pUC19 según el esquema de la Fig. 5. Los cassettes híbridos resultantes se liberaron con *N*coI y *N*heI y se subclonaron en el plásmido pBS portador de GFP, y los cassettes de expresión de estos plásmidos se liberaron con *H*indIII y se subclonaron en el vector pMOG800 digerido con la misma enzima. Todas las quimeras generadas se comprobaron mediante secuenciación en ambos sentidos.

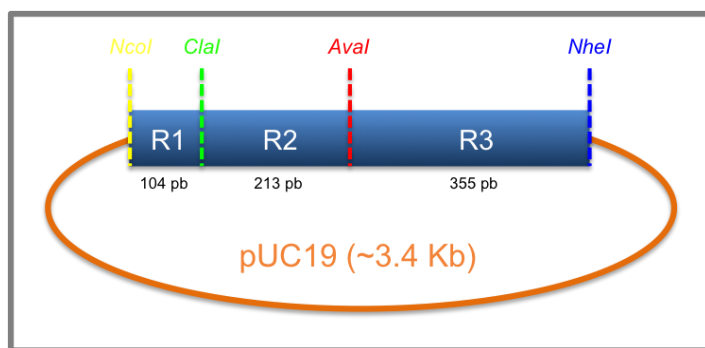


Fig. 5. Esquema del gen *p25* clonado en el vector pUC19/*Sma*I (Fermentas) donde se representan los sitios de corte único y las tres regiones resultantes (R1, R2 y R3) para realizar los intercambios entre los aislados T36 y T318A.

2.6 Generación de proteínas p25-GFP mutantes puntuales y de delección y obtención de construcciones genéticas para su expresión en planta

Los mutantes puntuales y de delección de *p25* se generaron mediante PCR inversa utilizando los cebadores fosforilados en el extremo 5' indicados en la Tabla 6 y los clones de pBS que contienen el gen salvaje (wt) de *p25*-GFP como molde siguiendo el protocolo de amplificación descrito, salvo que las extensiones se realizaron a 72°C durante 6 min. Los productos obtenidos (~5.5Kb) se purificaron a partir de la banda cortada de un gel de agarosa al 0.8% y, a continuación, se auto-ligaron con la T4 DNA Ligasa (New

EnglandBioLabs) (Sambrook *et al.*, 1989). Finalmente, se procedió con la subclonación del cassette al vector binario pMOG800. Todas las construcciones mutantes generadas se comprobaron mediante secuenciación en ambas direcciones.

Los dobles mutantes se sintetizaron siguiendo la misma metodología pero empleando como molde de reacción para las PCR, los pBS previamente generados con alguna de las mutaciones simples.

Tabla 6. Listado de los mutantes de p25-GFP generados en este estudio. Se indica la mutación/es introducida/s, la región de la proteína donde se localiza/n y los cebadores empleados.

MUTANTES DE LA p25 DEL AISLADO T36			
MUTACIÓN	REGIÓN	TIPO	CEBADORES 5' - 3'
V31L	R1	S	D:TCAGTTCCTTAAACTTACACATCGATCCGACTTT G R:AAGAAGACTCGGCAGCAACAACATCGTCGCCTT C
Δ31	R1	DL	D:AACTTACACATCGATCCGACTTTGATAACGAT R:CATGGTACCGATCCTGGAAGTATTTGAAAGAAA A
Δ29	R1	DL	D:TCCGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGATAA R:CATGGTACCGATCCTGGAAGTATTTGAAAGAAA A
K→N NLS-R1	R1	S	D:AACGAAACAAATGAAGGCGACGATGTTGTTGCT GC R:GTTATTGTTGTTCAAATTGTTTGTTCGTCGTCC A
K→A NLS-R1	R1	S	D:AACAAAAACAAGGAAACAAAAGAAGGCGACGAT GT R:CGCCAATGCCGCTGTTTCGTCCATGGTACC GATC
ΔNLS-R1	R1	DL	D:GAAACAAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGC CGA R:TGTTTCGTCCATGGTACCGATCCTGGAAGT AT
Δ6-9 NLS	R1	DL	D:AACAAAAACAAGGAAACAAAAGAAGGCGACG R:TGTTTCGTCCATGGTACCGATCCTGGAAGT AT
Δ10-13 NLS	R1	DL	D:GAAACAAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGC CGA

Capítulo I

			R:CTTCAATTTCTTTGTTTCGTCGTCATGGTA D:GTTGCTGCCGAGTCTTCTTTTCAGTTCGGTAA R:CTTGTTTTGTTCTTCAATTTCTTTGTTTCG
Δ14-21	R1	DL	
K→N NLS-R1 V31L	R1	DM	Cebadores K→N NLS-R1 sobre molde del mutante V31L
Δ14-17	R1	DL	D:GTTGCTGCCGAGTCTTCTTTTCAGTTCGGTAA R:TTCTTTTGTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
Δ18-21	R1	DL	D:GGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTCTTCTT R:CTTGTTTTGTTCTTCAATTTCTTTGTTTCG
Δ29 P72S	R1, R2	DM	Cebadores P72S sobre molde del mutante Δ29
L→A NES	R1, R2	S	D:CCGACTGCGATAACGATGAACGATGTGCGTCA R:ATCGATGTGTGCGTTTACGGAAGTCAAAGAAG
Δ31 ΔNLS-R3	R1, R3	DM	Cebadores ΔNLS-R3 sobre molde del mutante Δ31
Δ64-74	R2	DL	D:GATAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTGTATC GT R:AGTAAGGAATAAGTCTCTGTTCAAAGCAGCGTT C
P72S	R2	S	D:GATAAGGACTTTCACATAGCTATGATGTTGTATC GT R:TTTATCAGATAAGTTAGGATGCTTCCCTTTCAA GTAAG
K→N NLS-R2	R2	S	D:AACCTACCTGATAATGATAACGACTTTCACATAG CTATG R:AGGATGGTTCCCATTCAAAGTAAGGAATAAGTC TCTGTT
L62A L64A	R2	S	D:GCTACTGCGAAAGGGAAGCATCCTAACTTAC R:GAATAAGTCTCTGTTCAAAGCAGCG
I194V	R3	S	D:CGTACAAGCTAAAGAACAATTATTGAAGAAGCG AG R:TACACAGCACATTCTAAATCAGTCAAACCAGCC CC
ΔNLS-R3	R3	DL	D:GGGGCTGATGATGTCGTAGTTACTAATGTCAGG CA R:CAATAATTGTTCTTTAGCTTGTATGTACACAGCA C
MUTANTES DE LA p25 DEL AISLADO T318A			
MUTACIÓN	REGIÓN	TIPO	CEBADORES 5' - 3'
L31V	R1	S	D:TCGGTTCCGTAACCTTACACATCGATCCGACTC TG R: AAGAAGACTCCGCTGCAACAACATCGTCGCC
Δ31	R1	DL	D:AACTTACACATCGATCCGACTCTGATAGCGAT

			R:CATGGTACCGATCCTGGAAGTATTTGAAAGAAA A
Δ29	R1	DL	D:TCCTTAAACTTACACATCGATCCGACTCTGATA G R:CATGGTACCGATCCTGGAAGTATTTGAAAGAAA A
K→N NLS-R1	R1	S	D:AACGAAACGAATGAAGGCGACGATGTTGTTGCA GC R:GTTATTGTTGTTCAAATTGTTTGTCTCGTCGTCC A
K→A NLS-R1	R1	S	D:AACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGA TGT R:CGCCAATGCCGCTGTCTCGTCGTCCATGGTAC CGATC
ΔNLS-R1	R1	DL	D:GAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCAGC GGA R:TGTCTCGTCGTCCATGGTACCGATCCTGGAAGT AT
Δ6-9 NLS- R1	R1	DL	D:AACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACG R:TGTCTCGTCGTCCATGGTACCGATCCTGGAAGT AT
Δ10-13 NLS-R1	R1	DL	D:GAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCAGC GGA R:CTTCAATTTCTTTGTCTCGTCGTCCATGGTA
Δ14-21	R1	DL	D:GTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCCTTAA R:CTTGTTTTTGTTCTTCAATTTCTTTGTCTCG
K→N NLS-R1 L31V	R1	DM	Cebadores K→N NLS-R1 sobre molde del mutante L31V
Δ14-17	R1	DL	D:GGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTT R:CTTGTTTTTGTTCTTCAATTTCTTTGTCTCG
Δ18-21	R1	DL	D:GTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCCTTAA R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
Δ18-19	R1	DL	D:GATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTC R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
Δ20-21	R1	DL	D:GTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCCTTAA R:GTCGCCTTCTTTCGTTTCCTTGTTTT
D19A	R1	S	D:GGCGCCGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTT R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
D20A	R1	S	D:GGCGACGCTGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTT R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
D19A D20A	R1	S	D:GGCGCCGCTGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTT R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT
D19E D20E	R1	S	D:GGCGAAGAAGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTT R:TTCTTTTCGTTTCCTTGTTTTGTTCTTCAAT

Capítulo I

$\Delta 29$ S72P	R1, R2	DM	Cebadores S72P sobre molde del mutante $\Delta 29$
L \rightarrow A NES	R1, R2	S	D:CCGACTGCGATAGCGATGAACGATGTGCGTCA R:ATCGATGTGTGCGTTTTGCGGAACCGAAAGAAG ACTCC
$\Delta 31$ Δ NLS-R3	R1, R3	DM	Cebadores Δ NLR-R3 sobre molde del mutante $\Delta 31$
$\Delta 64-74$	R2	DL	D:GATAAGGACTTTACATAGCTATGATGTTGTATC GT R:AGTAAGGAACAAATCTCTGTTCAAAGCGGCGTT C
S72P	R2	S	D:GATAAGGACTTTACATAGCTATGATGTTGTATC GT R:TTTATCAGGTAAATTAGGATATTTCCCTTTCAA GTAAG
K \rightarrow N NLS-R2	R2	S	D:AATTTGTCTGATAATGATAACGACTTTACATAG CTATG R:AGGATAATTCCCATTCAAAGTAAGGAACAAATC TCTGTT
L62A L64A	R2	S	D:CGCTACTGCGAAAGGGAAATATCCTAATTTGT R:AACAAATCTCTGTTCAAAGCGGC
V194I	R3	S	D:CATACAAGCTAAAGAACAATTGTTGAAGAAGCG AGGG R:TACACAGCACATTCCAAGTCAGTCAAGCCAGCT CCG
Δ NLS-R3	R3	DL	D:GGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACTAATGTCAGG CA R:CAACAATTGTTCTTTAGCTTGTACGTACACAGCA C
MUTANTES DE LA p25 DEL AISLADO T385			
MUTACIÓN	REGIÓN	TIPO	CEBADORES 5' - 3'
$\Delta 31$	R1	DL	D:AACTTACACATCGATCCGACTCTGATAACGAT R:CATGGTACCGATCCTGGAAGTATTTGAAAGAAA A
V31L	R1	S	D:TCGGTTCCTTAAACTTACACATCGATCCGACTC TG R:AAGAAGACTCAGCAGCAACAACATCGTCGCCTT C

D: directo; R: reverso; DL: deleción; S: sustitución; DM: doble mutante; V: valina; L: leucina; I: isoleucina; K: lisina; A: alanina; N: asparagina; D: aspártico; E: glutámico; P: prolina; S: serina; Δ : deleción; NLS: señal de localización nuclear (nuclear localization signal); NES: señal de exportación nuclear (nuclear exportation signal)

2.7 Obtención de un clon infeccioso de longitud completa de T36 con la mutación puntual V31L en p25

El clon completo del aislado T36 con la mutación puntual V31L en p25 se obtuvo amplificando por PCR solapante la región genómica comprendida entre las posiciones 11.8 y 17.2 Kb del clon infeccioso original de T36 (Satyanarayana *et al.*, 2001), presente en el plásmido binario pCAMBIA-T36-GFP-88.3 (El-Mohtar y Dawson, 2014), para poder obtener dos fragmentos solapantes e introducir la mutación deseada. El plásmido pCAMBIA-T36-GFP-88.3 proviene del plásmido original pCAMBIA-T36-GFP (Ambrós *et al.*, 2011) salvo que la ORF de GFP está posicionada entre la ORF de p23 y el extremo 3'-UTR bajo la dirección del elemento controlador (CE) de la CP de CTV (El-Mohtar *et al.*, 2014). Para obtener el mutante se realizaron dos PCRs simples con los cebadores PM-412D + PM-413R (producto 5' de 4.4 Kb) y PM-338D + PM-414R (producto 3' de 1 Kb) (Tabla 7) usando como molde el plásmido de T36 y una mezcla de reacción característica de la DNA polimerasa iProof (ver apartado 2.2) y las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 30 s a 98°C, 35 ciclos de 10 s a 98°C, 20 s a 65°C y 30 s/kb a 72°C, seguidos de un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

Los dos fragmentos amplificados se purificaron de gel y se solaparon mediante reacciones que contenían tampón Taq LA GC I 1X, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, varias cantidades de cada producto y 5U de la DNA polimerasa Taq LA (TakaraBio Inc.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 3 min a 98°C, 8 ciclos de 15 s a 98°C, 1 min a 60°C y 6 min a 68°C, seguidos de un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. El fragmento final completo de 5.4 Kb se amplificó utilizando como molde 1 µl de la reacción anterior, los cebadores externos PM-412D + PM-414R y un protocolo similar al de la iProof. Éste se purificó de gel y digirió con las enzimas *PmeI* y *PstI*.

Tabla 7. Cebadores empleados para la amplificación de la región 11.8-17.2 Kb del aislado T36 de CTV.

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
PM-412D	CGTTTGACTCT <u>GTTTAAAC</u> ¹ GGGGTTTAAT GGACTGCG	11861-11897
PM-413R	TGTGTAAGTTTAAGGAACTGAAAGAAGAC TCGGCAGCAAC	16218-16257
PM-338D	TCAGTTCCTTAAACTTACACATCGATCCG ACTTTG	16237-16271
PM-414R	TGAAAACCAAATACTGCAG ² CCGCATCG AGAATCGTC	17191-17227

D indica sentido directo y R reverso

Se indican los sitios de restricción para *PmeI* (1) y *PstI* (2), que aparecen con caracteres subrayados, y la mutación puntual en negrita.

Por otra parte, el plásmido con el clon completo del aislado T36 de CTV (pCAMBIA-T36-GFP, 88.3) se digirió con las enzimas de restricción *PmeI* y *PstI*, que cortan una única vez en las posiciones genómicas 11.8 y 17.2 Kb, respectivamente. Una vez digerido, se purificó la banda obtenida de un gel de agarosa al 0.8%, se ligó vector e inserto con la T4 DNA Ligasa (New England BioLabs) y se transformó la mezcla en células competentes de *E. coli* JM109 mediante choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Los clones obtenidos se comprobaron mediante secuenciación de la mutación introducida y de la región flanqueante, y un análisis de los patrones de restricción con las enzimas *EcoRV*, *KpnI*, *PmeI* y *PstI*. Los clones positivos se transformaron en la cepa COR308 de *A. tumefaciens* (Hamilton *et al.*, 1997) mediante electroporación.

2.8 Agroinoculación de plantas de *N. benthamiana*

Dos colonias de *A. tumefaciens* portadoras de cada una de las construcciones de p20-GFP, p25-GFP y el marcador nuclear (pCB302-Nuc-mRFP) o nucleolar (pROK2-Fib-mRFP) se crecieron en tubos de vidrio con 5 ml de medio LB suplementado con rifampicina (100 mg/l) y kanamicina (75 mg/l) y se incubaron a 28°C en agitación durante 16-18 h. Los cultivos se resuspendieron en medio de infiltración (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ y 150 µM

acetosiringona en agua estéril) hasta una densidad óptica (DO_{600}) de 1 (salvo indicación contraria), se incubaron en agitación suave a temperatura ambiente durante 1-2h y se co-infiltraron utilizando volúmenes equivalentes, constructo problema: marcador subcelular, en hojas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad o en hojas tiernas de cítricos de 4-8 meses de edad de varias especies (*C. macrophylla*, lima mexicana, naranjo amargo y naranjo dulce). Se realizaron al menos 2-3 ensayos independientes con 2-3 plantas por construcción.

Las colonias positivas de *A. tumefaciens* portando el clon completo de T36 conteniendo la mutación puntual V31L en p25, se crecieron en tubos de vidrio con 5 ml de medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) y tetraciclina (5 mg/l) y se incubaron a 28°C en agitación durante 18-24 h. Estos precultivos se pasaron a matraces con 25 o 50 ml de medio de inducción (10 mM MES, 1.125 mM de acetosiringona y 10 mg/l de tetraciclina en medio LB) y se incubaron en las mismas condiciones hasta una densidad óptica (DO_{600}) de 0.6-0.8. A continuación, los nuevos cultivos se resuspendieron en medio de infiltración hasta una densidad óptica (DO_{600}) de 1. Finalmente, se incubaron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2-3h y se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* de 2 semanas, realizando al menos 3 ensayos independientes con grupos de 10-15 plantas.

2.9 Crecimiento y mantenimiento de plantas de *N. benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* se crecieron en macetas pequeñas (10x10 cm) con un sustrato adecuado (50% turba y 50% vermiculita) y se regaron 3 veces por semana, dos con agua y una con solución nutritiva Welgro Standard Plus (Comercial Química Massó, SA) a una concentración de 1 g/l. Las plantas se mantuvieron en una cámara climática en condiciones de temperatura (22-24°C) y humedad relativa (50-60%) controladas y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

2.10 Visualización de las construcciones con GFP y RFP mediante microscopía confocal

Las construcciones marcadas fluorescentemente de p20 y p25 y de los marcadores subcelulares utilizados, se observaron a 2 y 3 dpi (días post-inoculación) en hojas de *N. benthamiana* y cítricos mediante un microscopio confocal (Leica TCS SL). Las imágenes fueron tomadas con el software LCS Lite. Para ello, secciones pequeñas de hoja infiltrada se montaron en fresco sobre un portaobjetos, se añadieron 2 µl de agua y se cubrieron con el cubreobjetos.

3. RESULTADOS

3.1. Localización subcelular de p20 en *Nicotiana benthamiana* y *Citrus macrophylla*.

Se expresó transitoriamente la p20 fusionada a la GFP de tres aislados con características patogénicas diferentes: T385, un aislado suave prácticamente asintomático, T318A, un aislado agresivo inductor del síndrome de SP, y T36, un aislado severo inductor del síndrome de SY.

La expresión transitoria visualizada mediante microscopía confocal a 2 y 3 dpi en *N. benthamiana* y *C. macrophylla*, mostró una localización citosólica, nuclear y perinuclear, aunque no nucleolar, para todas las proteínas ensayadas, observándose la formación de agregados amorfos de distintos tamaños en el interior del núcleo (Fig. 6).

Para confirmar estos resultados, las construcciones p20-GFP se co-infiltraron con el marcador nuclear pCB302-Nuc-mRFP fusionado a la proteína fluorescente roja (RFP). Se constató la localización citosólica, perinuclear y nuclear de p20, tanto en *N. benthamiana* (Fig. 7) como en *C. macrophylla* (Fig. 8) cuya acumulación alrededor de la membrana del núcleo forma agregados densos de formas muy variables (Fig. 7, paneles superiores de A, B y C) y en el núcleo forma acumulaciones punteadas tipo “nuclear speckles”. Sin embargo, no se pudo confirmar su posible acumulación en el nucléolo.

Con este objetivo se realizaron co-infiltraciones utilizando un marcador nucleolar como la fibrilarina fusionada a RFP (pROK2-Fib-mRFP). La fibrilarina es una proteína estructural componente principal del nucléolo, cuerpos de Cajal y otras vesículas asociadas (Ochs *et al.*, 1985; Cioce y Lamond, 2005). En este caso, se observó que la p20 no se acumula en el nucléolo ni aparentemente en los cuerpos de Cajal (aunque existen dudas en algunas de las localizaciones), pero sí en otro tipo de agregados o vesículas amorfas (Fig. 9), que podrían ser vesículas intermediarias en la transición de alguno de los tipos de vesículas nucleares asociadas o complejos con ribonucleoproteínas (RNPs).

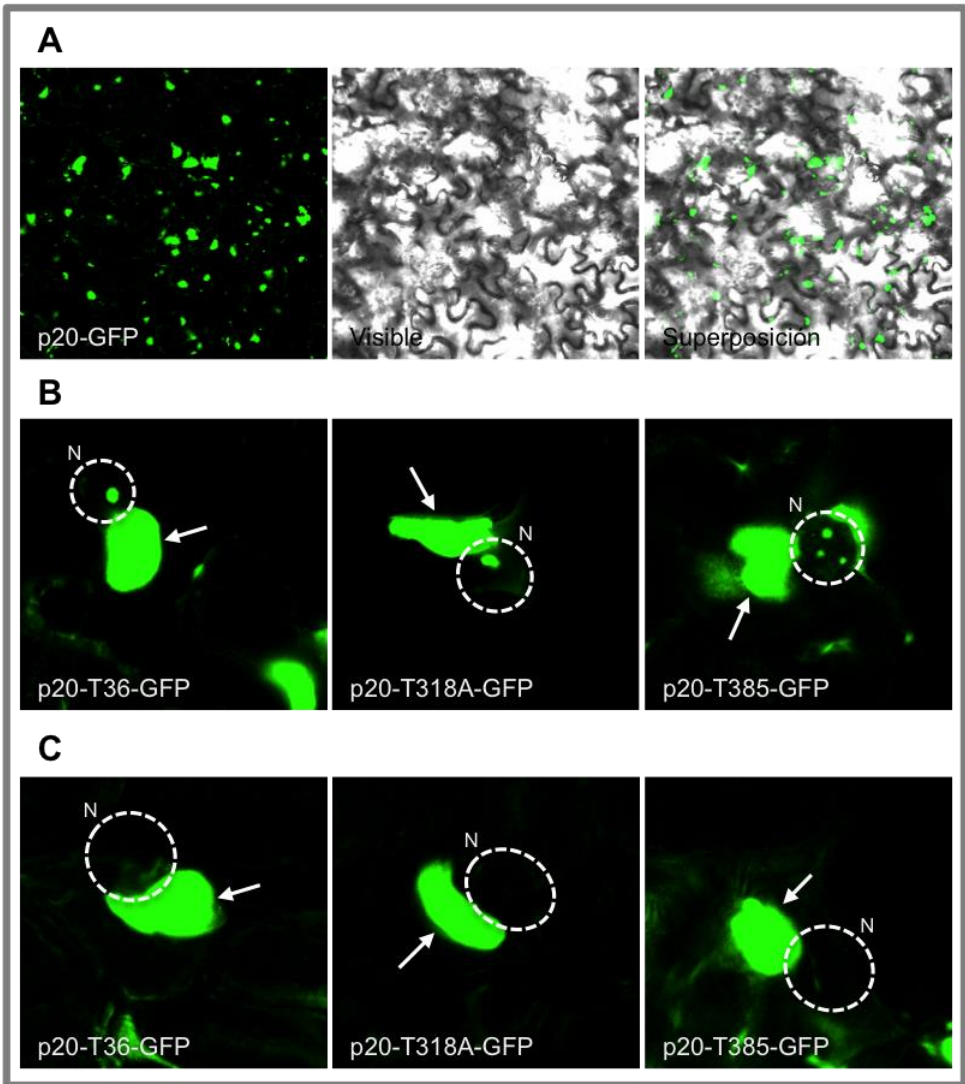


Fig. 6. A) Localización subcelular de p20-GFP en hojas de *N. benthamiana* en campo amplio y espectro visible ($DO_{600} = 0.5$). B y C) Detalle de acumulación perinuclear de p20-GFP de T36, T318A y T385 en *N. benthamiana* (B) y cítricos (*C. macrophylla*) (C). Las flechas señalan los agregados perinucleares de p20 y los círculos punteados los núcleos (N).

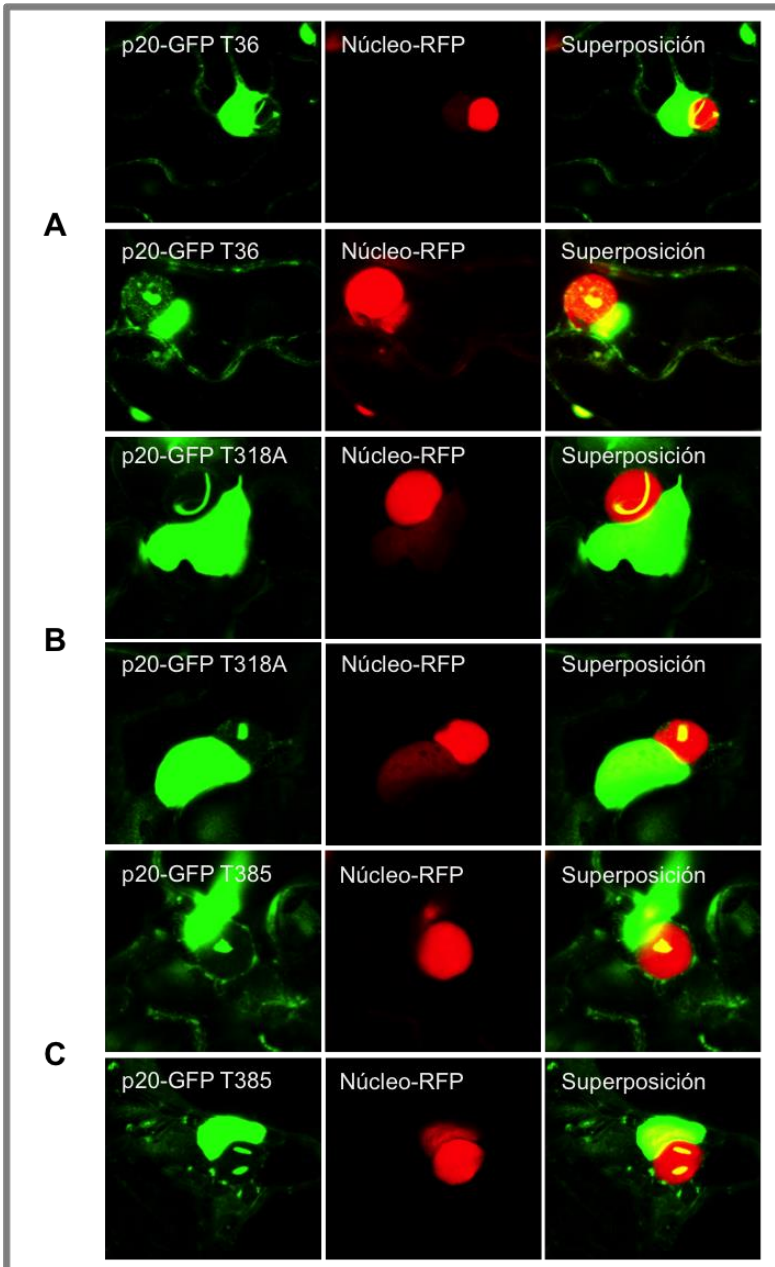


Fig. 7. Co-expresión de las construcciones p20-GFP y un marcador nuclear fusionado a RFP en hojas de *N. benthamiana* (2 dpi, $DO_{600} = 0.5$). En las imágenes superpuestas se observa la acumulación nuclear y citosólica de la p20 de T36 (A), T318A (B) y T385 (C).

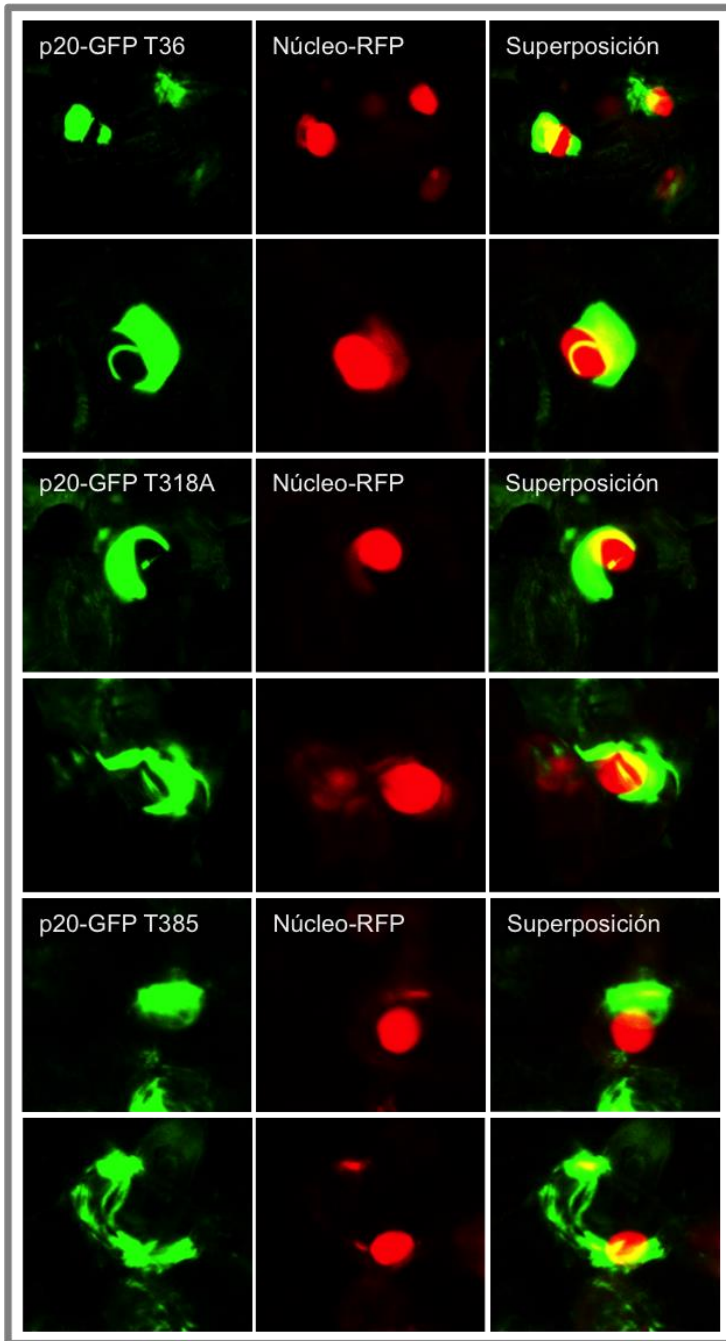


Fig. 8. Co-expresión de los constructos p20-GFP y un marcador nuclear fusionado a RFP en hojas de *C. macrophylla* co-infiltrados a una $DO_{600} = 0.5$.

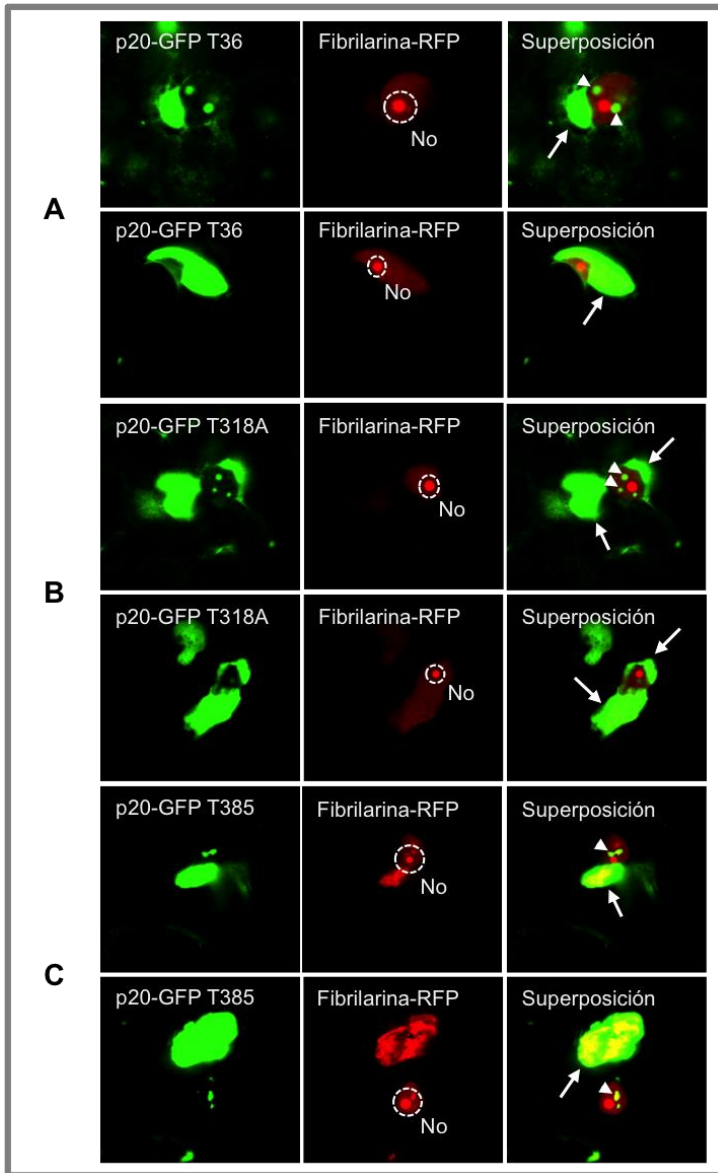


Fig. 9. Co-expresión transitoria de p20-GFP y el marcador nucleolar de fibrilarina fusionado a RFP en hojas de *N. benthamiana* una $DO_{600} = 0.5$. Se observa la acumulación nucleolar, perinuclear y nuclear en estructuras o agregados amorfos de distinto tamaño, de la p20 de los aislados analizados p20-T36 (A, 2 dpi), p20-T318A (B, 2 dpi) y p20-T385 (C, 2 dpi panel superior y 3 dpi el inferior). No: nucléolo. Las flechas indican los agregados perinucleares, las puntas de flecha los cuerpos o agregados nucleares amorfos.

3.2. Localización subcelular de p25 en *Nicotiana benthamiana* y cítricos.

Para analizar la localización subcelular de la proteína p25 de los aislados T385, T318A y T36 de CTV se procedió como en el apartado anterior.

La expresión de la proteína de fusión p25-GFP de los 3 aislados se detectó en hojas de *N. benthamiana* y cítricos mediante microscopía confocal a los 2 y 3 dpi. La p25 de los aislados T36 y T385 mostró la misma localización, siendo ésta citosólica y nuclear, pero no nucleolar (Fig. 11, paneles A y C, respectivamente y Fig. 12A). Sin embargo, la p25-GFP de T318A reveló una localización citosólica y perinuclear, pero no nuclear (Fig. 11, panel B y Fig. 12B). Esta disparidad de localización entre aislados también se comprobó al intercambiar el gen *gfp* de estas construcciones por el de la *rfp* (Fig. 12), con el fin de evitar resultados de localización erróneos por la interferencia del fluoróforo utilizado (se puede observar la localización citosólica y nuclear del control GFP en la Fig. 11D). La localización subcelular de p25-*rfp* también se confirmó en el huésped natural (Fig. 12).

Por otra parte, para confirmar la localización subcelular de p25 se co-infiltró el marcador nuclear pCB302-Nuc-mRFP fusionado a RFP con las construcciones p25-GFP obteniendo así resultados más evidentes (Fig. 13).

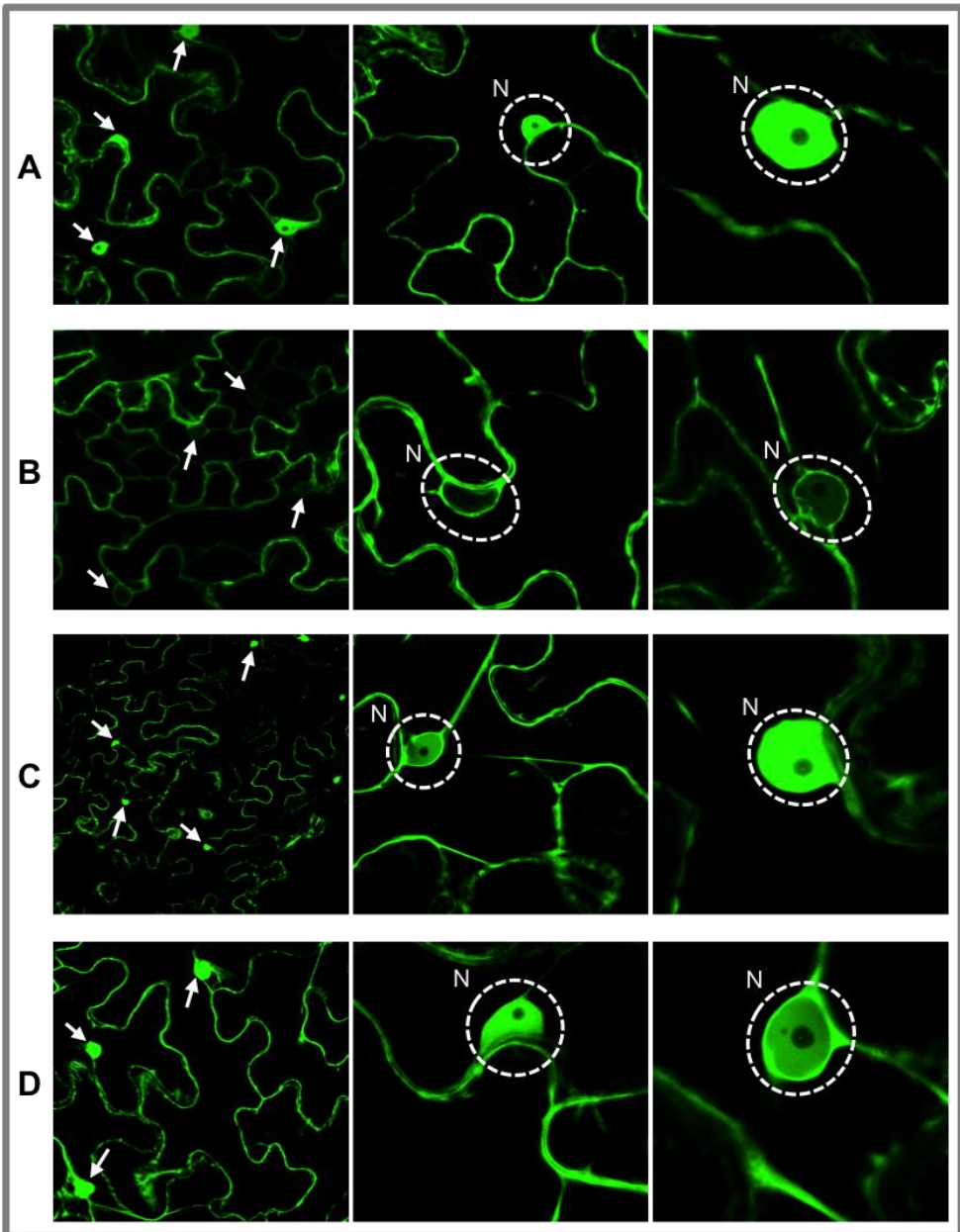


Fig. 11. Imágenes de microscopio confocal (a 2 dpi) de hojas de *N. benthamiana* ($DO_{600} = 0.5$) que expresan transitoriamente la p25-GFP de los aislados T36 (A), T318A (B) y T385 (C). La expresión del vector control de GFP se observa en el panel D. Las flechas y los círculos punteados señalan los núcleos (N).

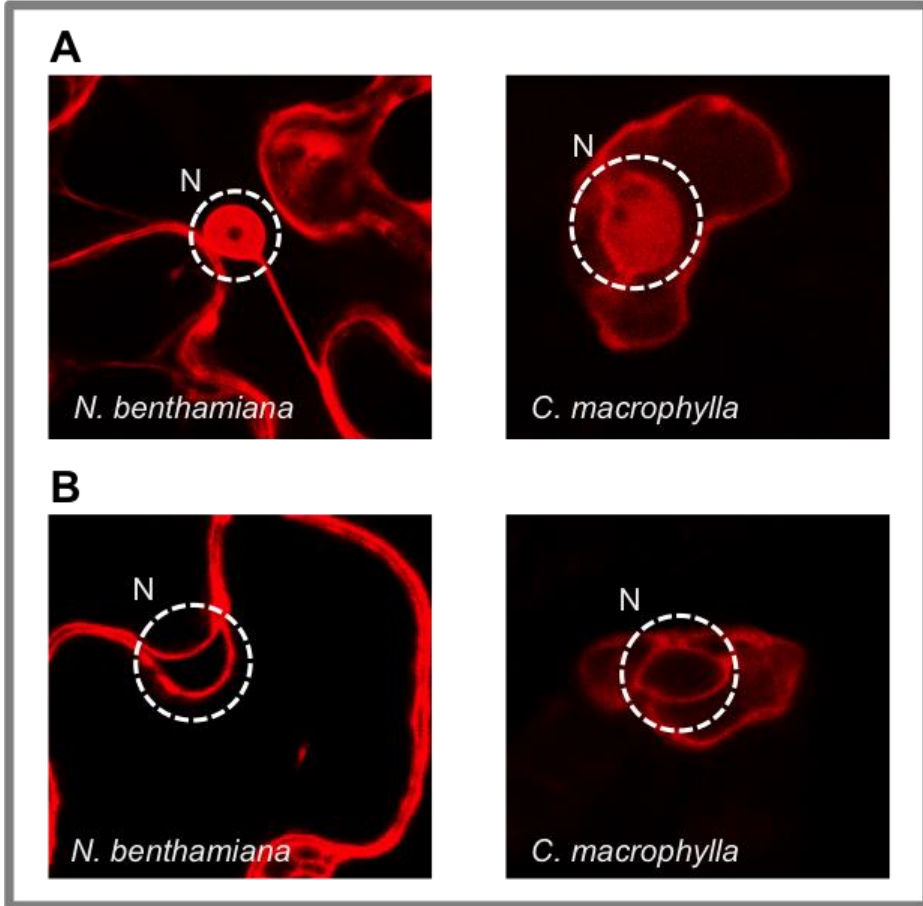


Fig. 12. Expresión transitoria de p25-RFP (3 dpi) de los aislados T36 (A) y T318A (B) en hojas de *N. benthamiana* y *C. macrophylla* ($DO_{600} = 0.5$). (N) núcleos.

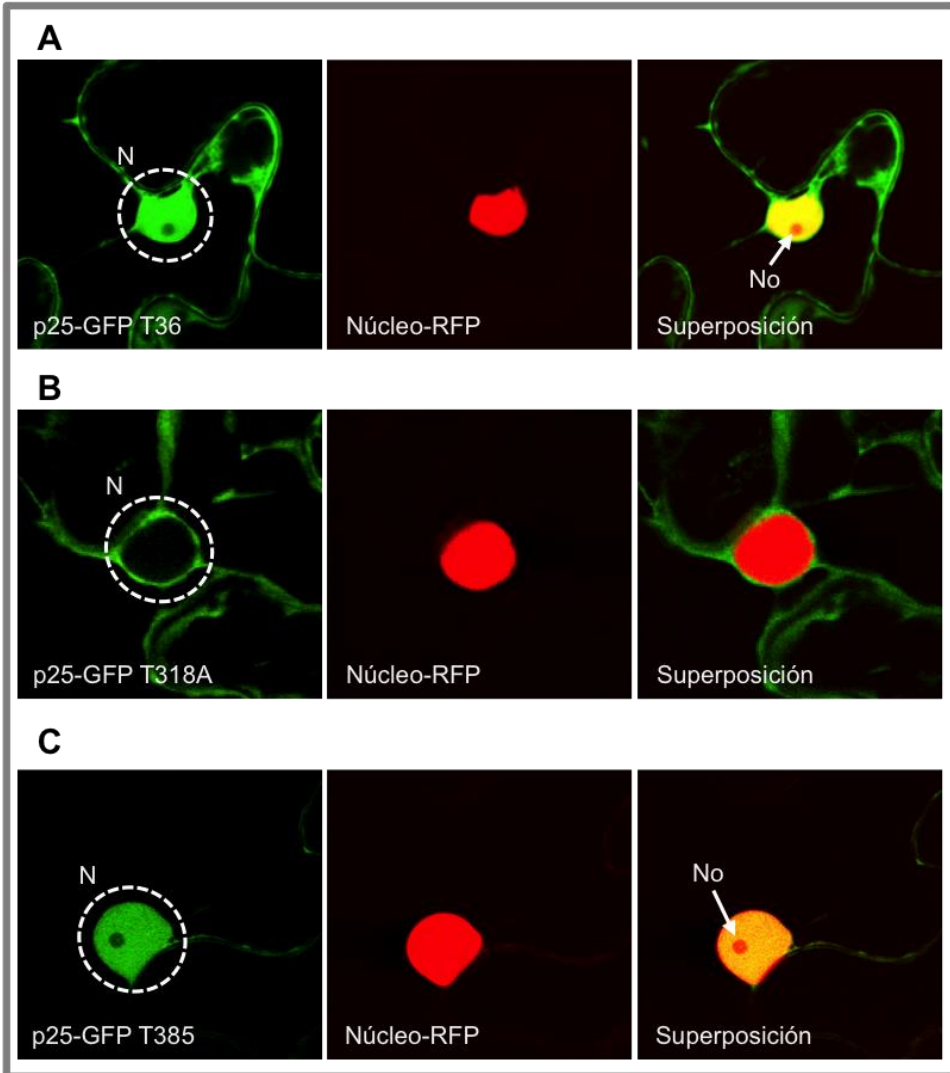


Fig. 13. Co-expresión de las construcciones p25-GFP junto a un marcador nuclear fusionado a RFP ($DO_{600} = 0.5$) en hojas de *N. benthamiana* (2 dpi). En las imágenes superpuestas se observa la acumulación citosólica y nuclear de p25 de T36 (A) y T385 (C), y no nuclear de T318A (B). Los núcleos (N) están marcados con círculos punteados, y los nucléolos (No) con flechas.

3.2.1. La localización nuclear diferencial entre las p25 también se mantiene en el huésped natural, los cítricos

Como se ha indicado, la localización subcelular de las p25 de diferentes aislados de CTV se confirmó también en diversas variedades de cítricos sensibles a CTV, como *C. macrophylla* (Fig. 14A), lima Mexicana (Fig. 14B) y naranjo dulce (Fig. 15A), o parcialmente resistentes como naranjo amargo (Fig. 15B). Los resultados mostraron la misma localización detectada en el huésped experimental y confirmaron que la localización diferencial de p25-T318A (Fig. 11 y 12) se mantenía en el huésped natural y no dependía de utilizar el huésped herbáceo experimental.

Al no existir diferencias de localización de p25 entre los distintos huéspedes cítricos, en ensayos posteriores de este trabajo llevados a cabo con otros marcadores o construcciones en cítricos, se utilizaron únicamente plantas de *C. macrophylla*.

Con el fin de confirmar que en el interior del núcleo celular, p25 no se localizaba en el nucléolo, se co-infiltraron las construcciones anteriores con fibrilarina, un marcador específico de nucléolo fusionado a RFP (pROK2-Fib-mRFP). Los resultados confirmaron que ninguna p25-GFP se localiza en el nucléolo ni en los cuerpos de Cajal (Fig. 16).

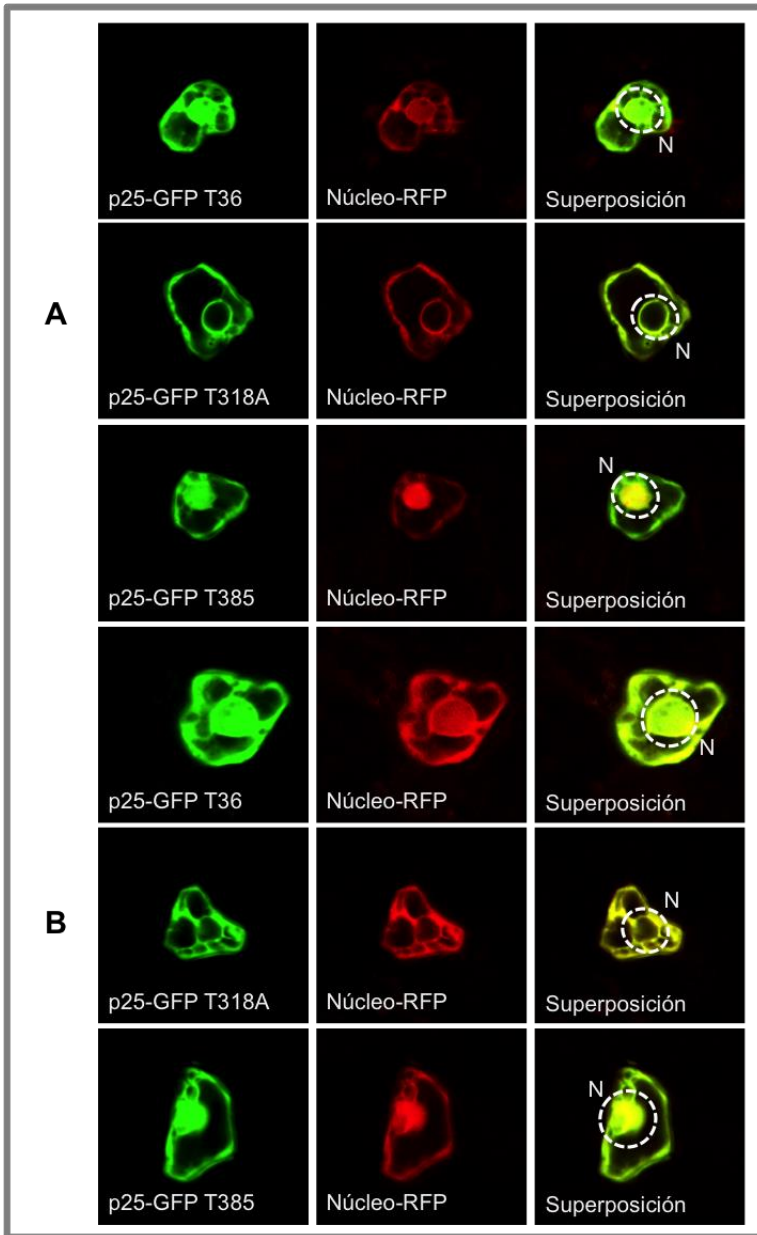


Fig. 14. Imágenes de microscopio confocal (3 dpi) mostrando la expresión transitoria de p25-GFP de los aislados T36 (panel superior), T318A (panel intermedio) y T385 (panel inferior) en hojas de distintos huéspedes cítricos: *C. macrophylla* (A) y *L. Mexicana* (B) a una $DO_{600} = 0.5$. (N), núcleos.

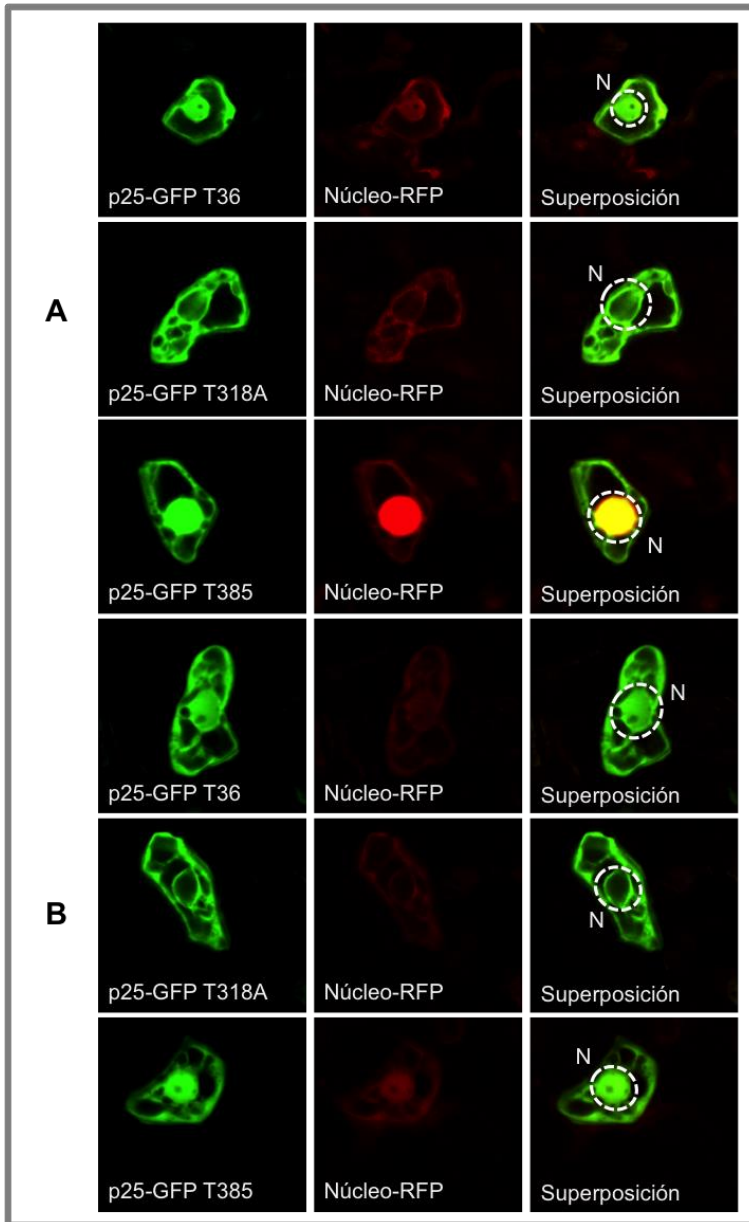


Fig. 15. Imágenes de microscopio confocal mostrando la expresión transitoria de p25-GFP de los aislados T36 (panel superior), T318A (panel intermedio) y T385 (panel inferior) en hojas de distintos huéspedes cítricos: N. dulce (A) y N. amargo (B) a 3 dpi y $DO_{600} = 0.5$. Los núcleos (N) están señalados mediante círculos punteados.

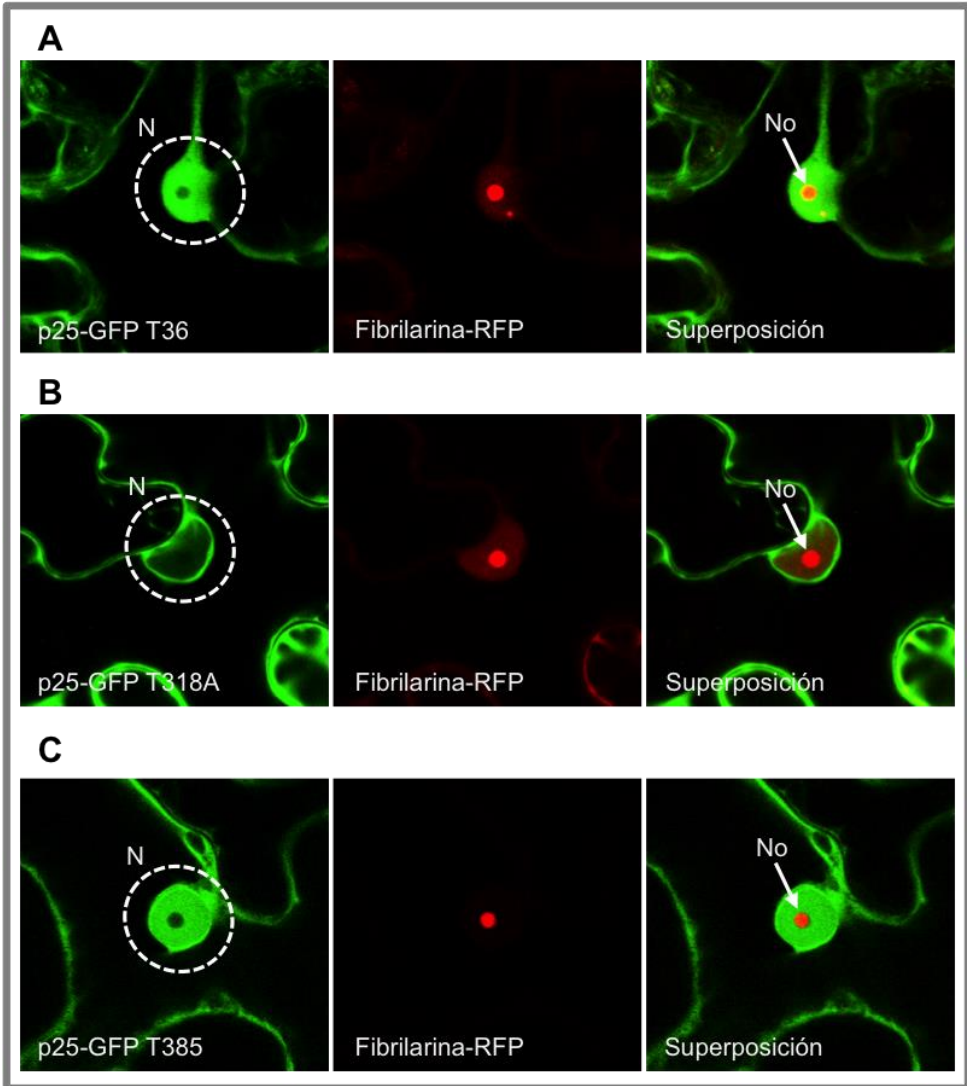


Fig. 16. Co-expresión de los constructos p25-GFP con fibrilarina-RFP en hojas de *N. benthamiana* ($DO_{600} = 0.5$, 2 dpi). Resto igual que en Fig. 13.

3.2.2. Expresión estable y localización subcelular de p25-GFP en un contexto de infección viral.

Para comprobar que la localización de p25 no era artefactual debido a la expresión transitoria de la misma, ésta se expresó de forma estable en un contexto de infección viral heterólogo utilizando el virus X de la patata (PVX). El vector pPVX202 (Sablowski *et al.*, 1995) permite la expresión de esta proteína de fusión a GFP como un sgRNA del virus durante su ciclo replicativo en planta (Fig. 17). Las construcciones obtenidas se inocularon mecánicamente en lotes de plantas de *N. benthamiana*, llevando a cabo al menos 2 bioensayos independientes.

La expresión estable *in vivo* de las p25-GFP durante la infección de PVX confirmó los resultados obtenidos con la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* y cítricos. La p25-T36 también se detectó en el citosol y núcleo celular mientras que la p25-T318A se localizó en el citosol y el perinúcleo (Fig. 18) como se había observado anteriormente.

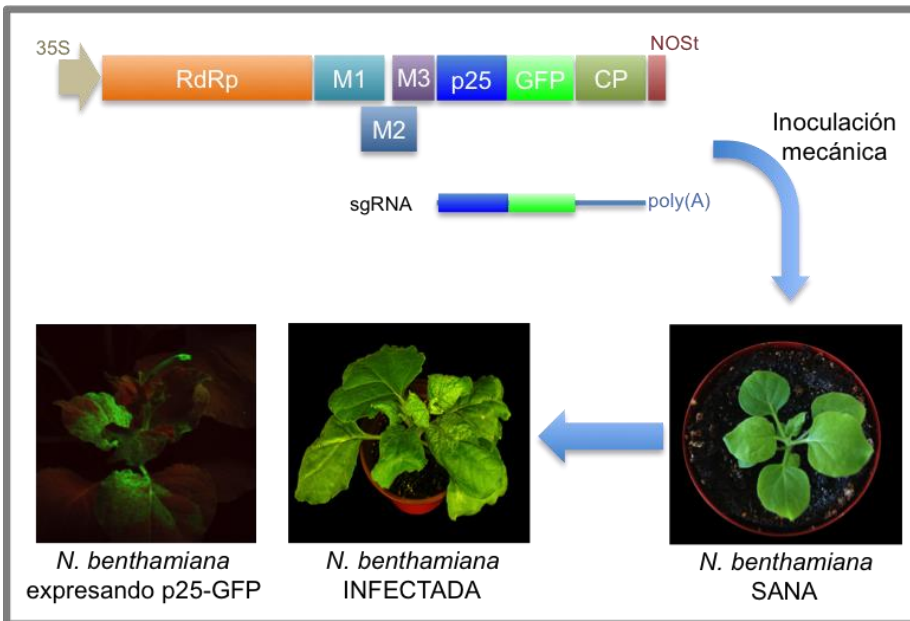


Fig. 17. Diseño experimental para la expresión estable de p25-GFP de T36 y T318A *in planta* como un sgRNA de PVX mediante el vector viral pPVX202.

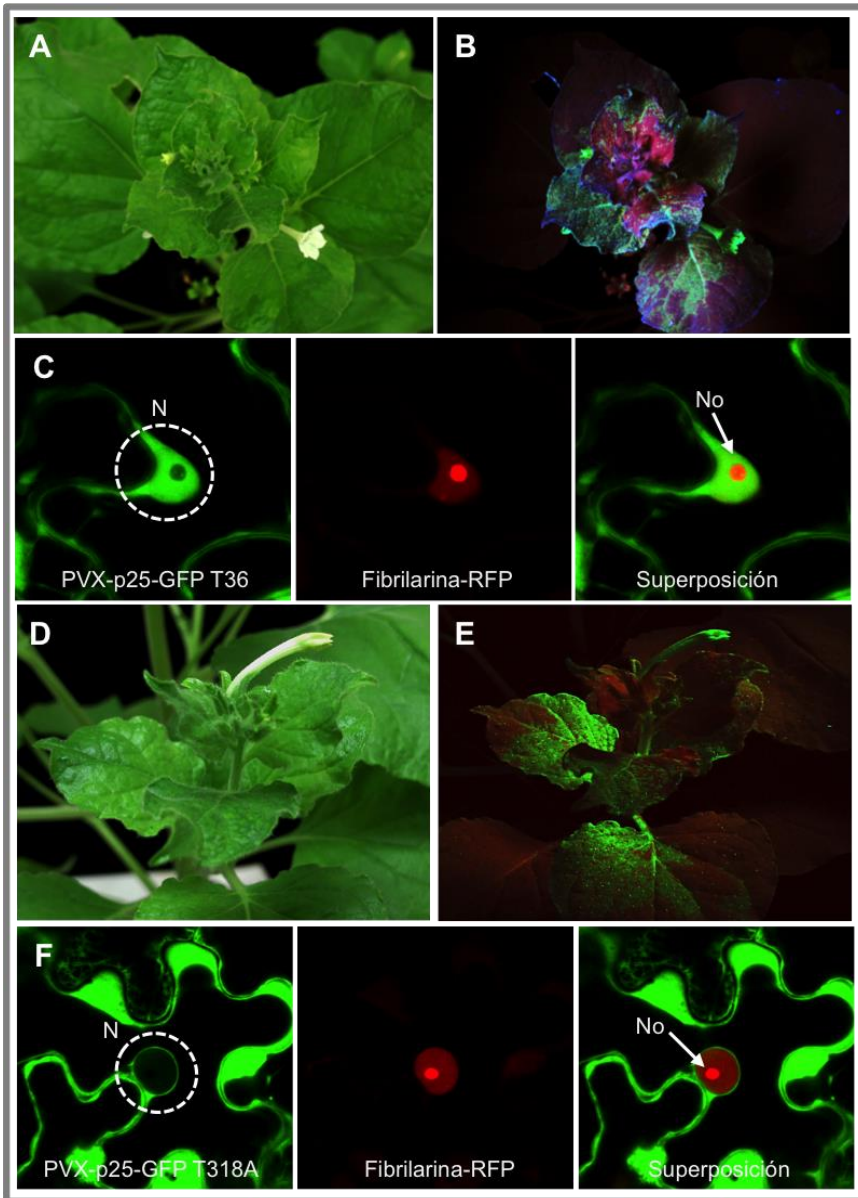


Fig. 18. Plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente con los vectores PVX-p25-GFP de los aislados T36 (A, luz visible, y B, luz UV) y T318A (D, luz visible, y E, luz UV) a los 21 dpi. (C) Expresión estable de p25-GFP-T36 y -T318A (F) en hojas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente (28 dpi) por PVX-p25-GFP e infiltradas 2 días antes con el marcador de fibrilarina-RFP ($DO_{600} = 0.5$). Resto como Fig 13.

3.3. Estudio de los determinantes implicados en la localización subcelular de p25.

3.3.1. Obtención y ensayo de construcciones híbridas entre las p25 de distintos aislados de CTV

De acuerdo con los resultados anteriores y con el fin de localizar los motivos implicados en la localización de p25, se diseñaron y generaron proteínas híbridas entre los aislados T36 y T318A, que difieren en su localización subcelular y tienen características fenotípicas diferentes. Aprovechando dos sitios de corte únicos presentes en la ORF de ambas p25, *Clal* y *Aval* (Fig. 19), se realizaron intercambios entre 3 regiones internas del gen para obtener 6 proteínas quimera p25-T36/T318A (Tabla 8). Los vectores binarios obtenidos se co-infiltraron con el marcador nuclear pCB302-Nuc-mRFP en hojas de *N. benthamiana* y *C. macrophylla*.

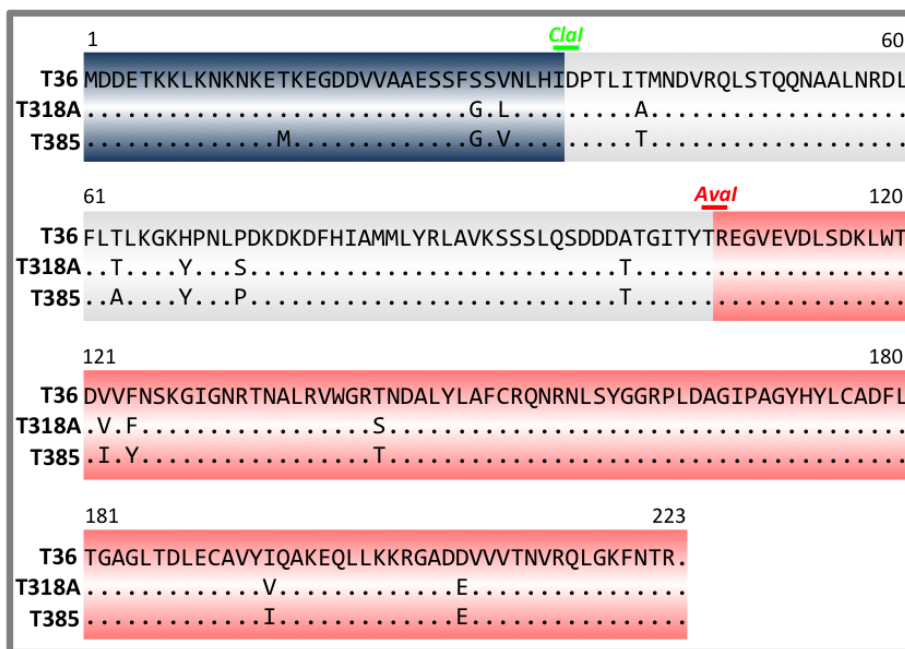


Fig. 19. Alineamiento proteico de las p25 de los 3 aislados estudiados en este trabajo. Se indican los sitios de corte únicos para las enzimas de restricción *Clal* y *Aval*. Las regiones 1, 2 y 3 se representan con color azul oscuro (R1), gris (R2) y rojo (R3), respectivamente.

La expresión de las proteínas híbridas en la región 1 (R1), que comprende los aminoácidos 1 a 35, reveló que dicho intercambio entre los dos aislados provocaba un cambio drástico en la localización subcelular de la proteína. Así, la p25-T318A con la R1 de T36 (híbrido T36R1T318A) presentaba ahora una localización principalmente nuclear y citosólica, mientras que la p25-T36 con la R1 de T318A (híbrido T318R1T36) dejaba de estar localizada en el núcleo y sólo aparecía localizada en el citosol y la membrana perinuclear (Fig. 20). Este cambio en las pautas de distribución celular de las quimeras que afectan a la R1 sugería la existencia de uno o varios motivos implicados en la localización de p25 en la región N-t que comprende los primeros 35 aminoácidos. Además, la presencia de las regiones 2 y 3 de T36 no son suficientes para determinar una localización nuclear.

Por el contrario, las quimeras T36/T3168A de la R2 (aminoácidos 36 a 106) no mostraron cambios de localización respecto a las proteínas salvajes correspondientes. Así, el híbrido T36R2T318A (p25-T318A con la R2 de T36) presentó una localización predominantemente citosólica, mientras que la del híbrido T318R2T36 (p25-T36 con la R2 de T318A) fue principalmente nuclear (Fig. 21) como la de su wt. Estos resultados parecían indicar que esta región R2 no estaba implicada en la localización diferencial de la p25.

La expresión de los híbridos en la R3 (posiciones 107 a 223) reveló ligeros cambios en la localización de las p25. El híbrido T36R3T318A (p25-T318A con la R3 de T36) mostró una localización citosólica y perinuclear (aunque sin salida completa del núcleo), mientras que el híbrido T318R3T36 (p25-T36 con la R3 de T318A) se mantuvo en el citosol y el núcleo aunque su acumulación en este último orgánulo fue menor (Fig. 22). Los resultados sugieren una implicación más leve de esta región en la localización diferencial de p25.

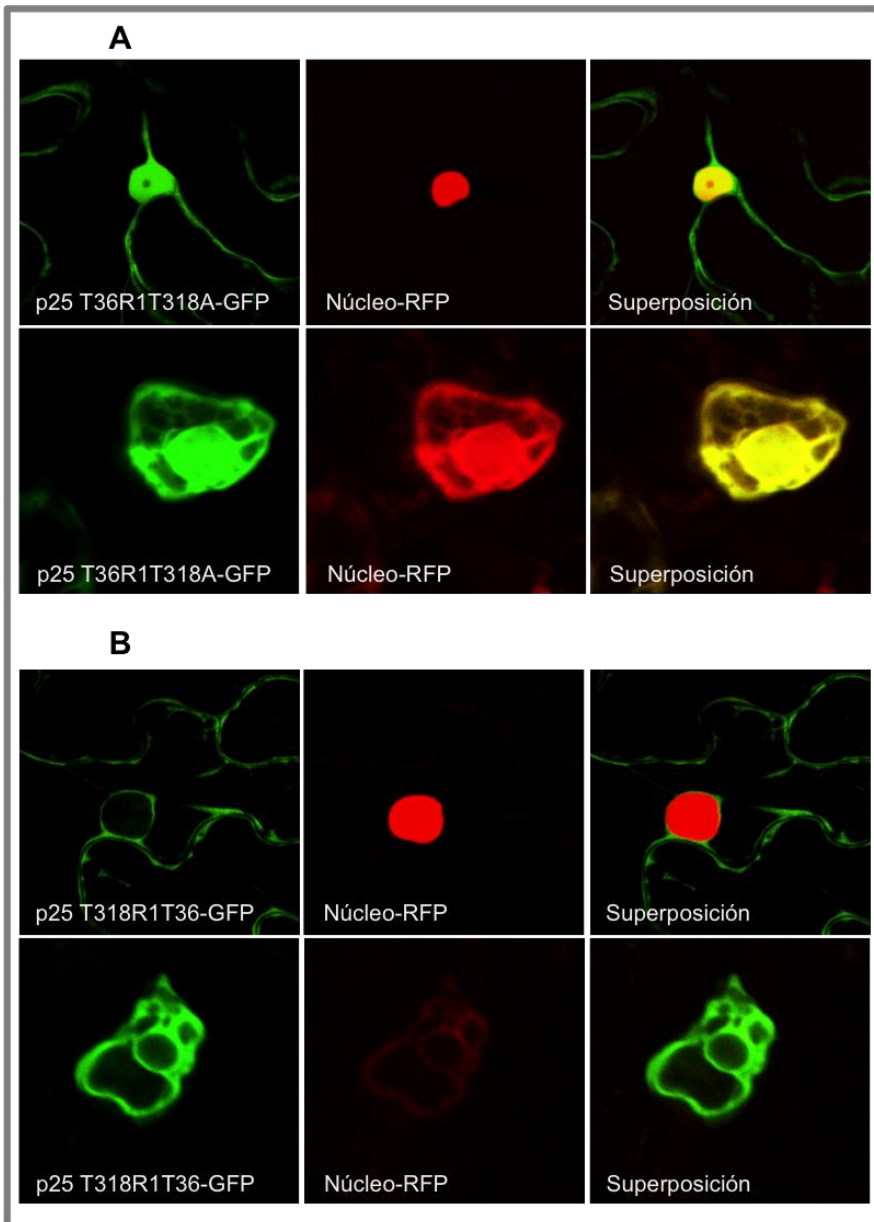










Fig. 20. Localización subcelular de los híbridos T36R1T318A (A) y T318R1T36 (B) en *N. benthamiana* (panel superior) y *C. macrophylla* (panel inferior), tomadas a 2 dpi, donde se observa el cambio de localización entre la p25 de T36 y la de T318A. Construcciones y marcador nuclear con RFP co-infiltrados a una $DO_{600} = 0.5$.

Tabla 8. Esquema de las 6 proteínas p25 híbridas entre los aislados T36 y T318A, las proteínas salvajes, y su localización principal.

NOMBRE	DISEÑO	DESCRIPCIÓN	LOCALIZACIÓN
p25 T36 <i>wt</i>		p25 salvaje del aislado T36	N + C
p25 T318A <i>wt</i>		p25 salvaje del aislado T318A	C
p25 T36R1T318A		p25-T318A con la R1 de T36	N + C
p25 T318R1T36		p25-T36 con la R1 de T318A	C
p25 T36R2T318A		p25-T318A con la R2 de T36	C
p25 T318R2T36		p25-T36 con la R2 de T318A	N + C
p25 T36R3T318A		p25-T318A con la R3 de T36	N + C *
p25 T318R3T36		p25-T36 con la R3 de T318A	N + C *

La localización subcelular predominante aparece marcada en **negrita**.

wt: tipo salvaje; R1, R2, R3: regiones 1, 2 y 3; N: nuclear; C: citoplasmática.

* localización intermedia, es decir, la proteína no entra o sale del núcleo completamente.

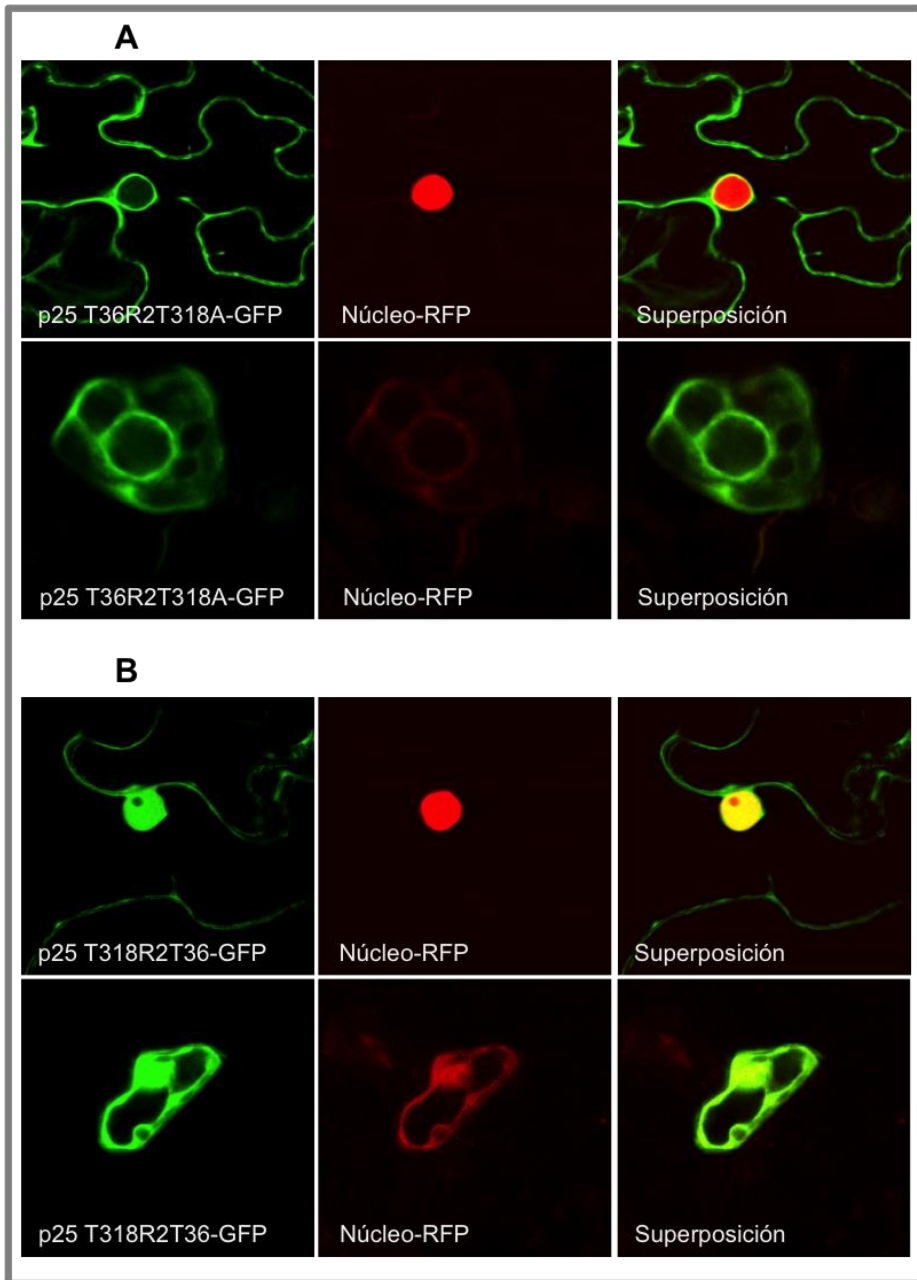


Fig. 21. Localización de los híbridos T36R2T318A (A) y T318R2T36 (B) en *N. benthamiana* (panel superior) y *C. macrophylla* (panel inferior) a 2 dpi. Co-infiltración con marcador nuclear-RFP a $DO_{600} = 0.5$

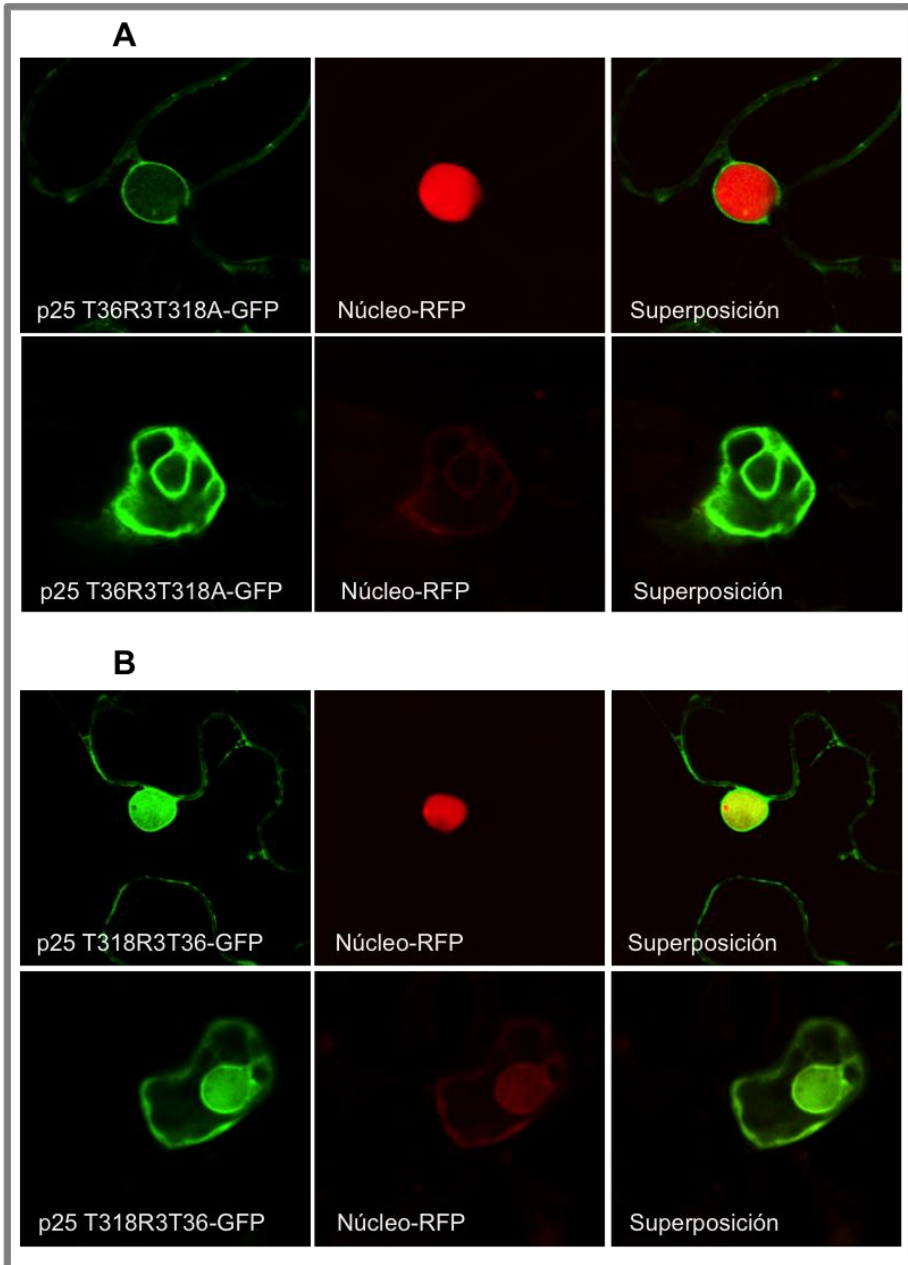


Fig. 22. Localización de los híbridos p25 T36R3T318A (A) y T318R3T36 (B) en *N. benthamiana* (panel superior) y *C. macrophylla* (panel inferior). Co-infiltración con marcador nuclear-RFP a $DO_{600} = 0.5$ (2 dpi).

3.3.2. Obtención y ensayo de construcciones que expresan proteínas p25 mutantes en la R1 de distintos aislados de CTV

Una vez demostrada la posible implicación de la R1, principalmente, y en menor medida de la R3 en la localización subcelular de p25, se comparó la secuencia aminoacídica de ésta en los genotipos T36, T318A y T385.

El alineamiento (en el que se incluyeron otros aislados de CTV secuenciados) mostró un total de 12 polimorfismos de secuencia distribuidos a lo largo de toda la molécula, 5 de ellos (en color violeta en la Fig. 23 y sombreados en verde en el alineamiento) son aminoácidos compartidos por los aislados que presentaron una localización nuclear de la proteína (T36 y T385) y que no están presentes en la de T318A, de localización extranuclear (Fig. 23). Además, se detectó la existencia de 2 motivos de secuencia ricos en aminoácidos básicos de tipo arginina (R) y/o lisina (K) en los extremos N y C-terminal (Fig. 23, sombreados en amarillo) conservados en las p25 de los 3 genotipos. Este tipo de regiones se han descrito en la bibliografía como posibles motivos NLS que regulan la localización nuclear y/o nucleolar de muchas proteínas (Lange *et al.*, 2007; Kosugi *et al.*, 2009; Freitas y Cunha, 2009). A estas regiones les denominaremos NLS-R1 (en la región N-t) y NLS-R3 (en la C-t) putativas.

Con el objetivo de determinar si estos aminoácidos y/o motivos están implicados en regular la localización subcelular de p25, se sintetizaron un conjunto de mutantes de delección y puntuales, así como dobles mutantes (Tabla 2), que afectaban a las 3 regiones de la proteína en los genotipos estudiados.

El análisis previo de las proteínas híbridas realizado en el apartado anterior sugería la existencia de una posible señal de localización nuclear (NLS) en la R1 responsable de la entrada de p25 al núcleo, aunque el único motivo rico en lisinas presente en esta región, que abarca desde los aminoácidos 6 a 14, también está conservado en la p25 de T318A (Fig. 23, en amarillo).

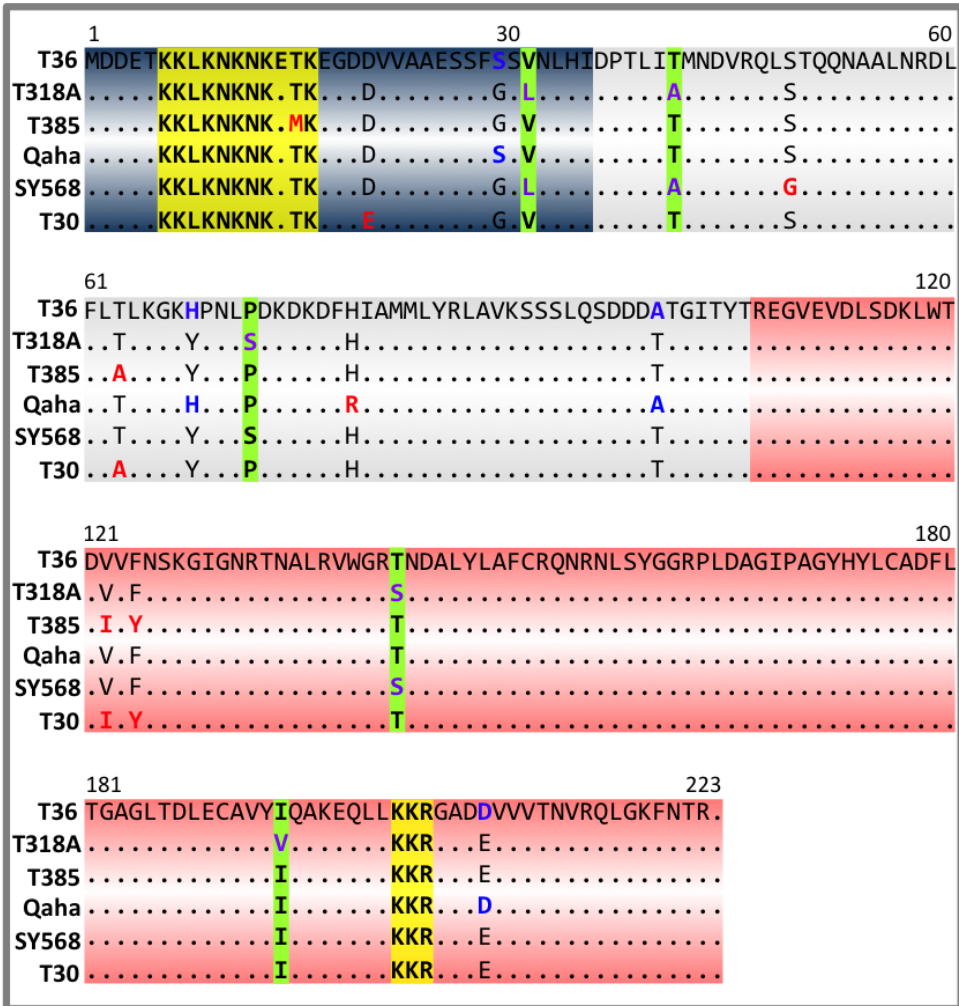


Fig. 23. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la p25 de los aislados T36, T318A, T385, Qaha, SY568 y T30 donde se delimitan la R1, R2 y R3 en colores azul, gris y rojo, respectivamente. Los aminoácidos de color azul indican polimorfismos presentes únicamente en los genotipos T36 y Qaha, mientras que los rojos son únicos en uno o dos aislados. Sombreadas en color verde se indican las posiciones aminoacídicas compartidas por aislados de localización nuclear (T36 y T385) que difieren con respecto al aislado T318A, de localización extranuclear. Por otra parte, dos secuencias ricas en aminoácidos básicos como K (lisina) y R (arginina) aparecen sombreadas en amarillo.

Ello sugiere que en esta región N-t podría existir otro motivo, o parte de él, implicado en regular la exportación de p25-T318A y de

Por otra parte, con objeto de distorsionar mínimamente el tamaño o conformación de la proteína en esta región se ensayaron mutantes de delección total (Δ NLS-R1) o parcial del motivo tipo NLS (Fig. 24) dividiendo éste a su vez en dos subregiones y sintetizando mutantes de delección de los aminoácidos 6 al 9 (mutantes Δ NLS-R1a) y 10 al 13 (mutantes Δ NLS-R1b) (Fig en ANEXO 1). Adicionalmente, también se estudió un conjunto de mutantes de sustitución en los que las lisinas (K) se cambiaron por aminoácidos neutros no polares como alaninas (A) (mutantes K-A NLS-R1) o polares como asparaginas (N) (mutantes K-N NLS-R1) en las posiciones 6, 7, 9, 11, 13 y 16 de p25-T36 y T318A (Fig en ANEXO 1 y Tabla 2) para comprobar su posible implicación en un motivo de estas características. La elección de este tipo de mutaciones se basó en no modificar el tamaño de esta pequeña región con deleciones, en cambiar el cómputo de cargas del motivo (utilizando los aminoácidos neutros) o evitar una posible distorsión de la conformación de la proteína en esta región (elección de asparaginas).

Tanto la delección de la posible NLS completa (Fig. 26) como las deleciones menores Δ NLS-R1a y R1b no afectaron sustancialmente la localización subcelular observada con respecto a las p25 salvajes.

Por último, el ensayo de los mutantes de sustitución de las lisinas de este motivo por los aminoácidos de carga neutra tampoco mostró cambios en la localización nuclear de p25-T36 y extranuclear de T318A, descartando este motivo como posible NLS, al menos actuando por sí solo.

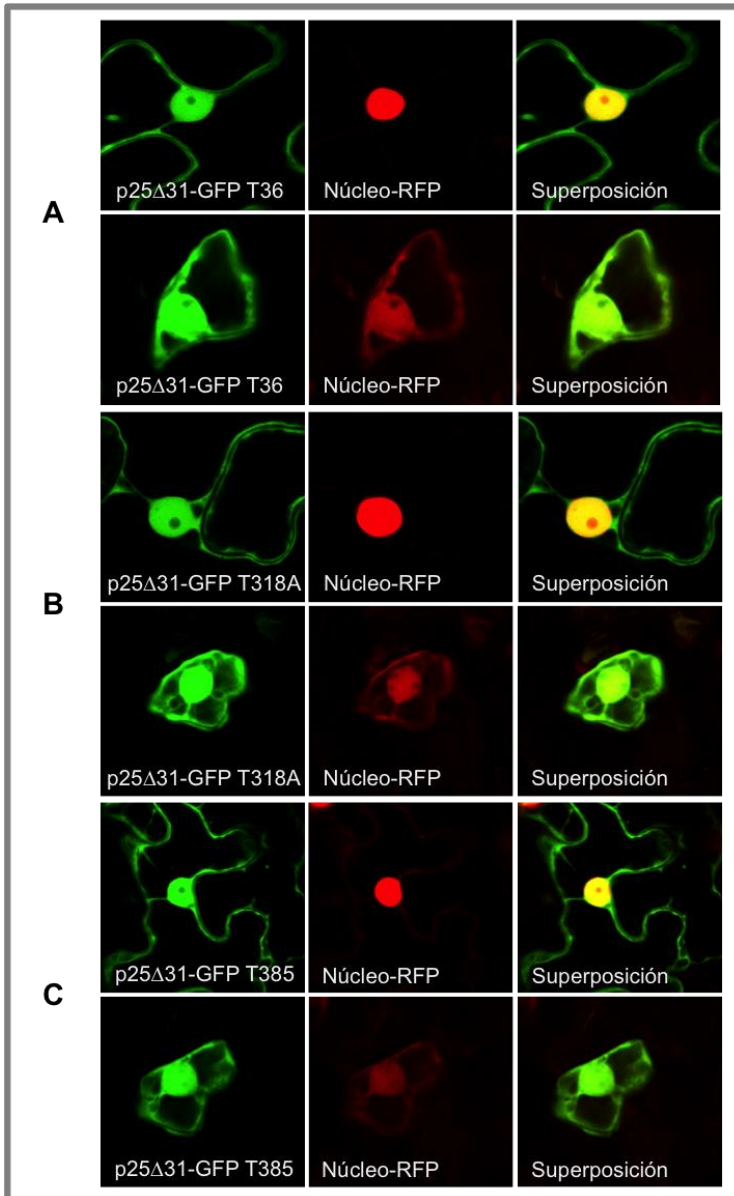


Fig. 25. Localización subcelular de los mutantes de deleción $\Delta 31$ de la p25 de los aislados T36 (A), T318A (B) y T385 (C) en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* (paneles superiores) y *C. macrophylla* (paneles inferiores), imágenes de microscopio confocal a 2 dpi. En las imágenes superpuestas se observa la localización nuclear de todos los mutantes. Construcciones y marcador nuclear co-infiltrados a $DO_{600} = 0.5$.

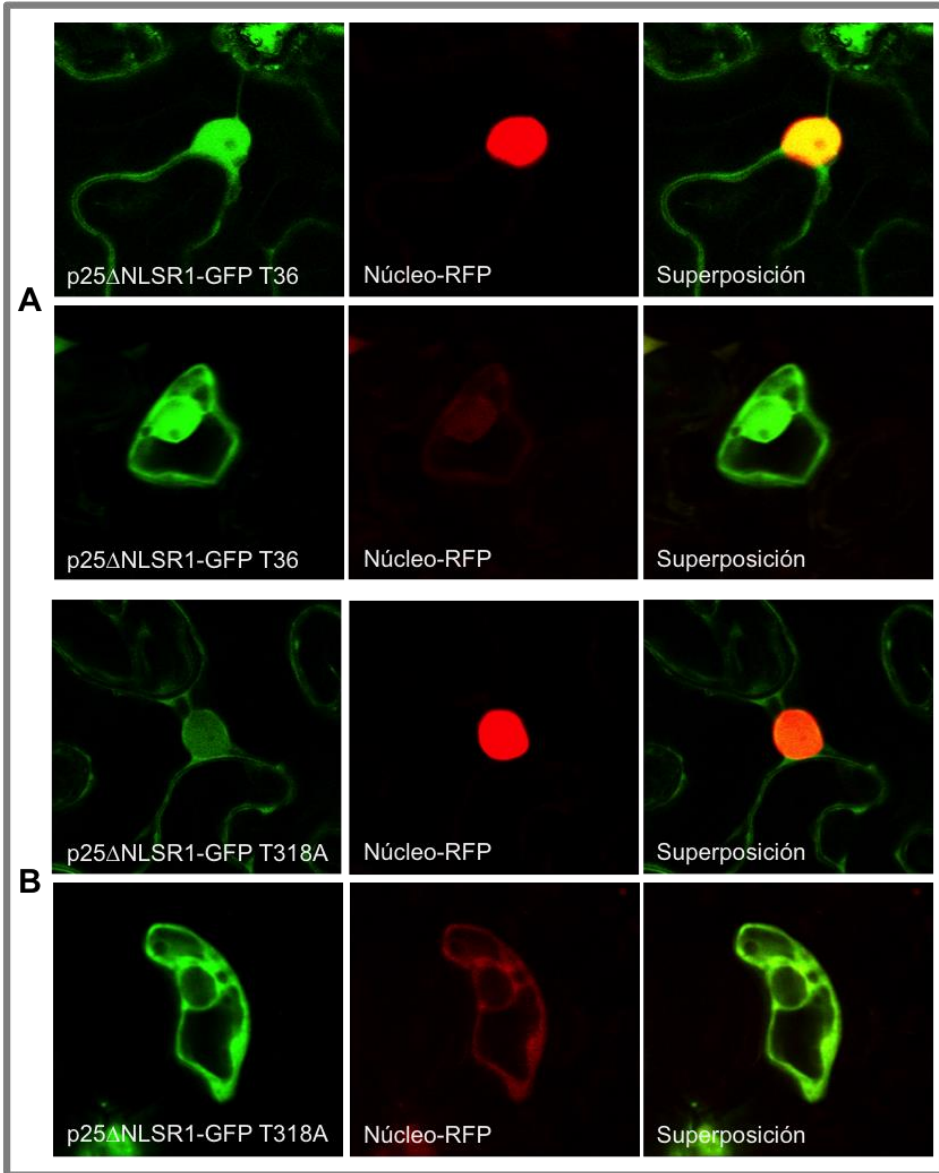


Fig. 26. Localización subcelular de los mutantes Δ NLS-R1 de p25-T36 (A) y p25-T318A (B). No hay diferencias de localización respecto a las proteínas salvajes. Resto igual que Fig. 25.

3.3.2.2. Mutantes de delección de la región N-t posterior al motivo rico en lisinas

Debido a que las delecciones realizadas en los mutantes $\Delta 29$ y 31 eran extensas y se desconoce cómo ello podría afectar a la conformación de la proteína o a una posible difusión pasiva de ésta a través del núcleo, se sintetizaron otros mutantes de delección en esta región como control de tamaño. La delección introducida en estos mutantes afectaba la región posterior al putativo motivo NLS-R1 estudiado en el apartado anterior, eliminándose los aminoácidos 14 al 21 (mutantes $\Delta 14-21$). Dicha delección reveló un cambio de localización sólo en la p25-T318A, que ahora se acumulaba principalmente en el núcleo (como la proteína salvaje de T36 y su mutante equivalente) (Fig. 27). Este resultado sugiere la presencia de uno o varios aminoácidos clave para la localización de p25 en esta pequeña región o el hecho de que una delección de esta región podría influir en la conformación de la proteína regulando de algún modo la localización observada.

Con objeto de ahondar en la implicación de esta zona, se diseñaron nuevos mutantes que contenían delecciones más pequeñas: del aminoácido 14 al 17 (mutantes $\Delta 14-17$) o del 18 al 21 (mutantes $\Delta 18-21$).

Los mutantes p25- $\Delta 14-17$ no modificaron su localización respecto a la proteína salvaje (no mostrado), al contrario de lo que ocurrió con los mutantes $\Delta 18-21$, donde p25-T318A pasó a localizarse principalmente en el núcleo de las células (Fig. 28).

Una vez delimitada la región aminoacídica entre las posiciones 18 a 21 como parte implicada en regular la localización de p25-T318A, se llevaron a cabo delecciones más pequeñas, sintetizando los mutantes $\Delta 18-19$ y $\Delta 20-21$, para determinar cuáles eran los aminoácidos clave. Mientras la primera delección no provocó ningún cambio de localización (Fig. 29 superior), la segunda permitía que la proteína se localizara en el núcleo (Fig. 29 inferior), sugiriendo la posibilidad de que estas 2 posiciones, o sólo una de ellas, fueran relevantes en regular dicha localización.

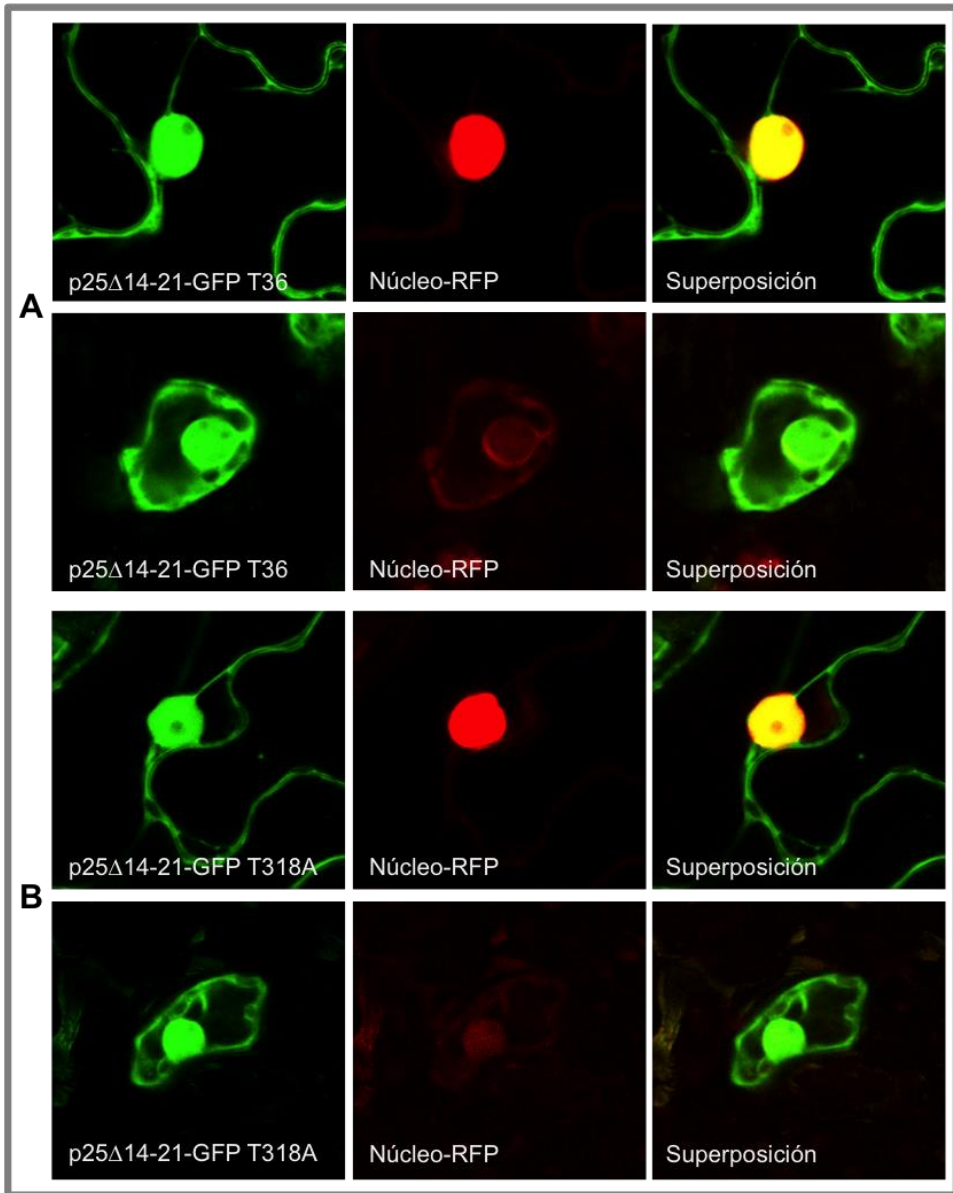


Fig. 27. Localización subcelular de los mutantes de delección Δ 14-21 de p25-T36 (A) y p25-T318A (B) observándose un cambio de localización del segundo de ellos (extranuclear a nuclear). Co-infiltración con marcador nuclear a $DO_{600} = 0.5$ (2 dpi). Resto igual que anteriores.

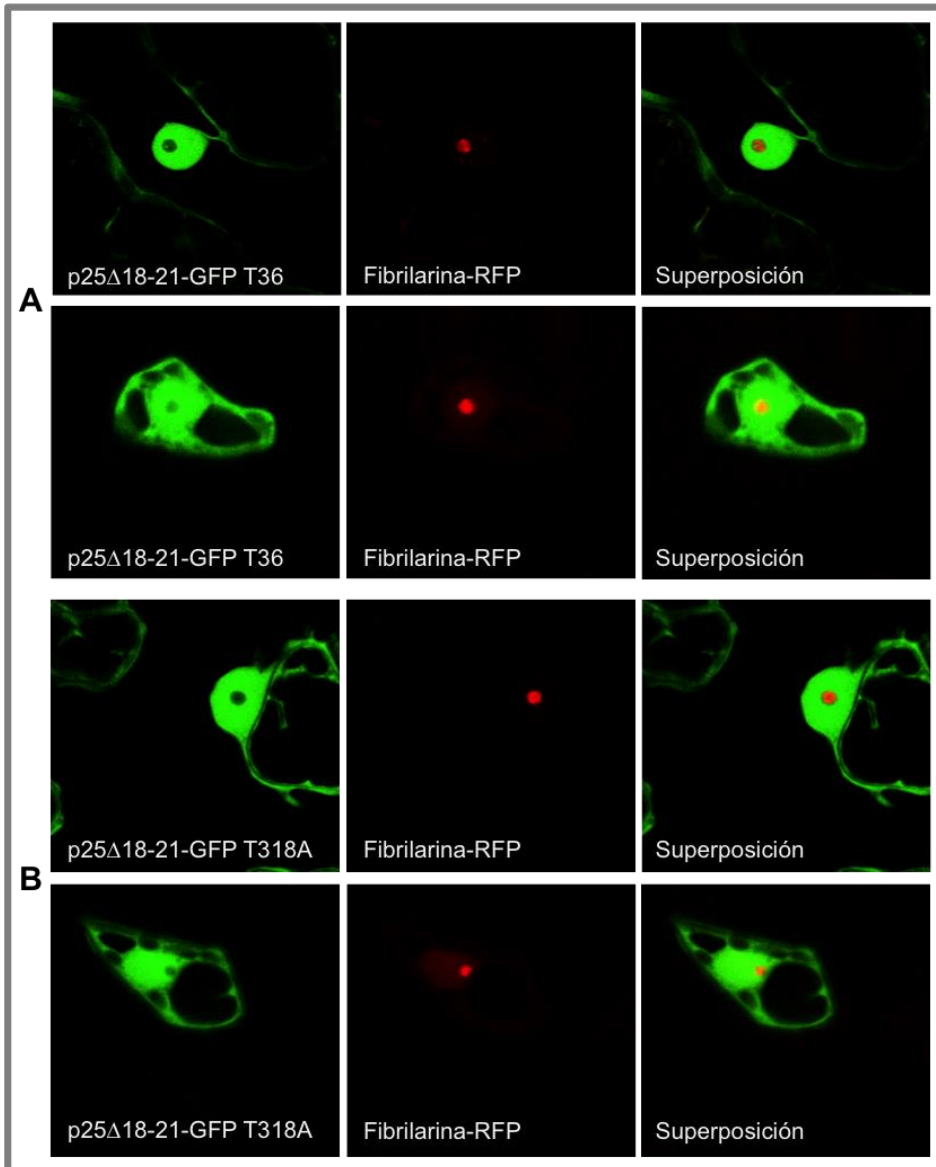


Fig. 28. Localización subcelular de los mutantes Δ 18-21 de p25-T36 (A) y p25-T318A (B) en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* (paneles superiores) y *C. macrophylla* (paneles inferiores). Se observan cambios sustanciales en la localización de p25-T318A. Co-infiltración con marcador de fibrilarina a $DO_{600} = 0.5$ (2dpi).

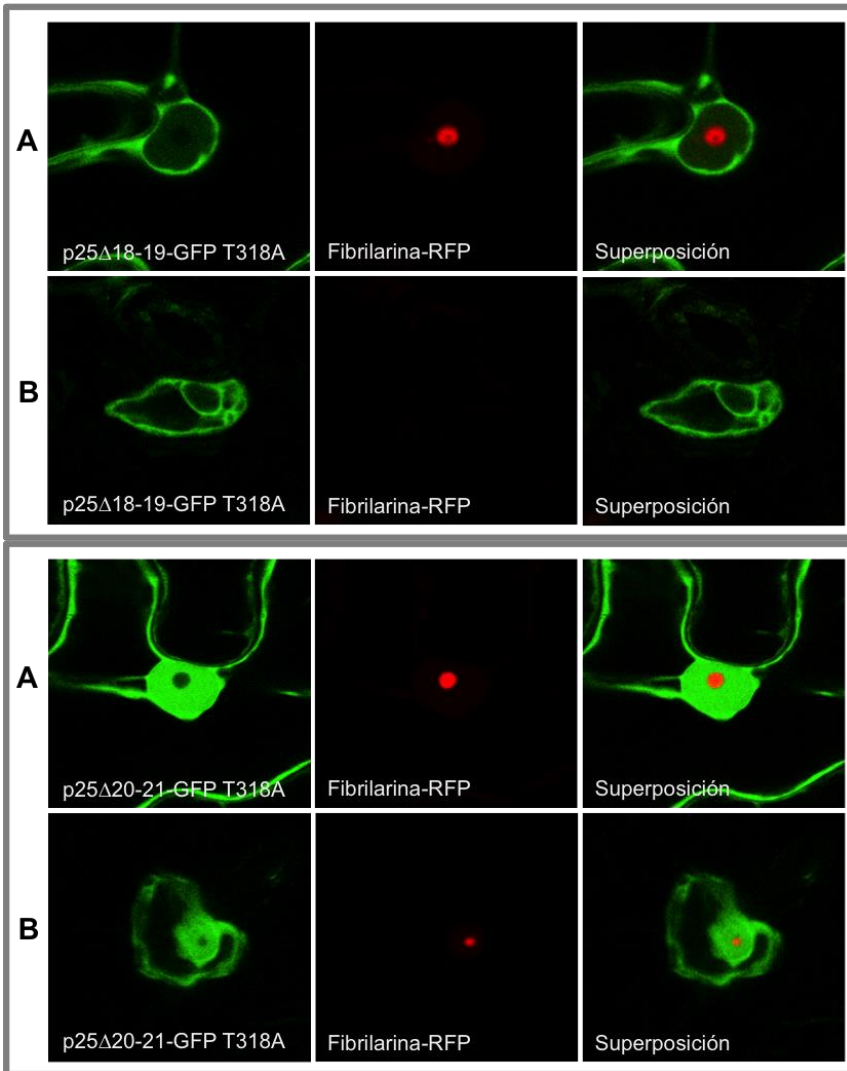


Fig. 29. Igual que la Fig. 28 pero ensayando los mutantes Δ 18-19 y Δ 20-21 de p25-T318A. Se observa el mismo cambio de localización para el mutante Δ 20-21 p25-T318A que el observado para el Δ 18-21.

Teniendo en cuenta la existencia de dos aspárticos (D), aminoácidos con carga positiva, en las posiciones 19 y 20 de la proteína, quisimos comprobar si el cambio de uno de ellos, o de ambos, a aminoácidos de carga neutra (alaninas, A) o a otros aminoácidos distintos de carga positiva (glutámicos, E) podía alterar

la conformación y/o distribución de cargas en dicha región y ser la causa del cambio de localización observado. Con este propósito, ensayamos los mutantes simples D19A y D20A y el doble mutante D19-20A de p25-T318A.

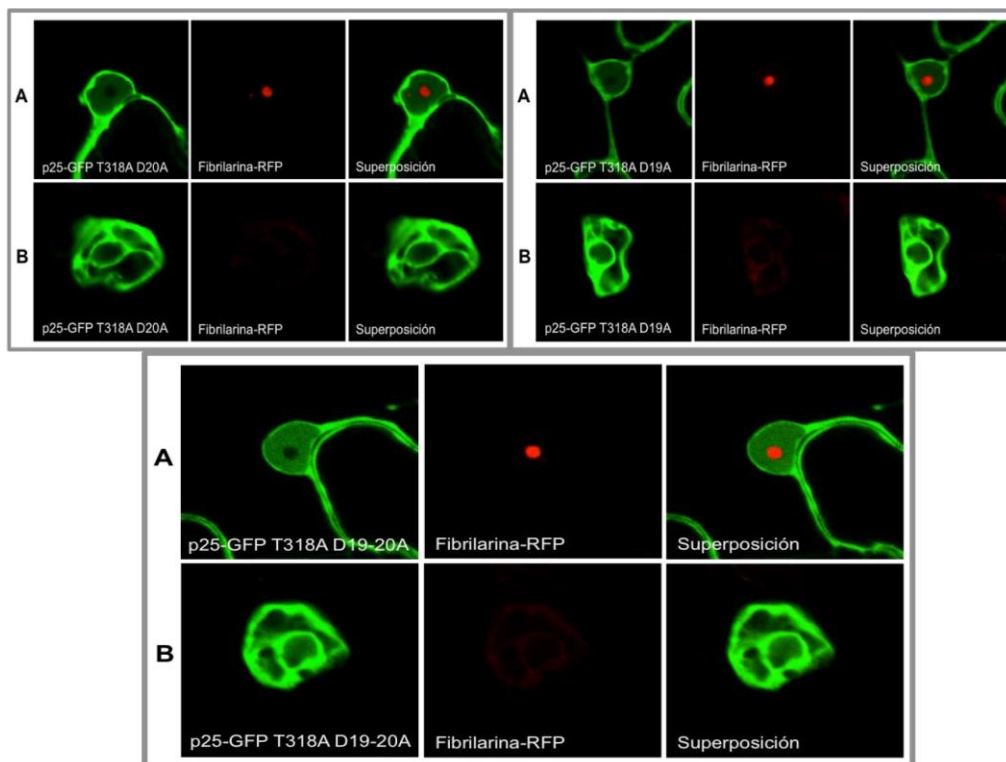


Fig. 30. Localización subcelular de los mutantes D19A y D20A (panel superior) y del doble mutante D19-20A (panel inferior) de p25-T318A. En las imágenes de microscopio confocal (2 dpi) se aprecia una localización nuclear parcial para el segundo en ambos huéspedes. Co-infiltración con marcador nucleolarfibrilarina a $DO_{600} = 0.5$ y resto igual que anteriores.

Como se observa en la Fig. 30, si bien los primeros no alteraron la localización de la proteína, el doble mutante presentó una localización intermedia, ya que se apreciaba cierta acumulación nuclear sobre todo en *N. benthamiana*. Por otra parte, no se encontraron diferencias importantes en la localización de p25-T318A respecto a la proteína salvaje en el doble mutante de sustitución D19-20E (datos no mostrados).

3.3.3. La Leu31 es clave en la exportación nuclear: confirmación de la existencia de una señal NES que regula la localización extranuclear de p25-T318A

Con objeto de analizar uno de los polimorfismos de la R1 de p25 que afecta al aminoácido de la posición 31 (Fig. 31), una valina en los aislados que presentan localización nuclear de la proteína (T36 y T385) y una leucina en T318A (de localización extranuclear), se estudió el efecto que inducían mutantes puntuales en esta posición (mutantes V31L y L31V) en la localización subcelular de p25.

De forma sorprendente, el análisis reveló que el cambio de la leucina 31 a valina en p25-T318A provocaba un cambio drástico en la localización de ésta, la cual pasaba a localizarse ahora en el núcleo (Fig. 32, panel B). Y de forma inversa, el cambio complementario V31L en p25-T36 y T385 eliminó su localización nuclear (Fig. 32, paneles A y C).

Estos resultados demuestran que la leucina de la posición 31 es clave y está directamente implicada en la localización extranuclear de la p25 de T318A, ya que pese a las diferencias de secuencia (Fig. 31) entre ésta y la p25 de T36 (9 nt en total) o con la de T385 (10 nt), el único cambio de este aminoácido es suficiente para cambiar su localización, pese a que pueda existir una putativa señal NLS en la R1 (u otra región).

El análisis detallado de la región alrededor de la posición 31 muestra un motivo rico en leucinas (L) y aminoácidos hidrofóbicos, que podría ser una NES, con una función clave de la leucina de la posición 31, cuya mutación a valina anularía o minimizaría la acción de este motivo regulador.

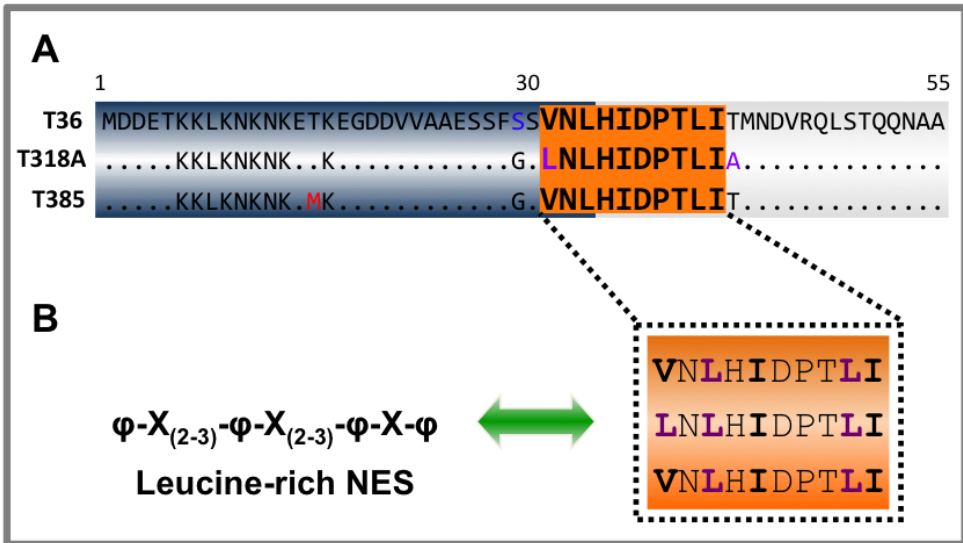


Fig. 31. Detalle de los primeros 55 aminoácidos de la secuencia de p25 de los 3 genotipos estudiados. El motivo rico en L y aminoácidos hidrofóbicos alrededor de la posición 31 (A) está remarcado en color naranja, y la descripción de la posible señal canónica de este tipo de NES.

El análisis de la secuencia aminoacídica de p25-T36 y p25-318A mediante el servidor de predicción de NES, NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) (la Cour *et al.*, 2004), detectó que en los primeros 50 aminoácidos sólo la L33 de p25-T318A tenía un valor de NES score (0.272) potencial para formar parte de una señal de este tipo (y un HMM de 0.272), aunque su valor quedaba debajo del umbral del programa para confirmar dicha región como una NES (Fig. 33 derecha y tabla anexa). Sin embargo, para la L31 no mostró valor de NES score pese a presentar un valor de HMM similar al anterior (0.270).

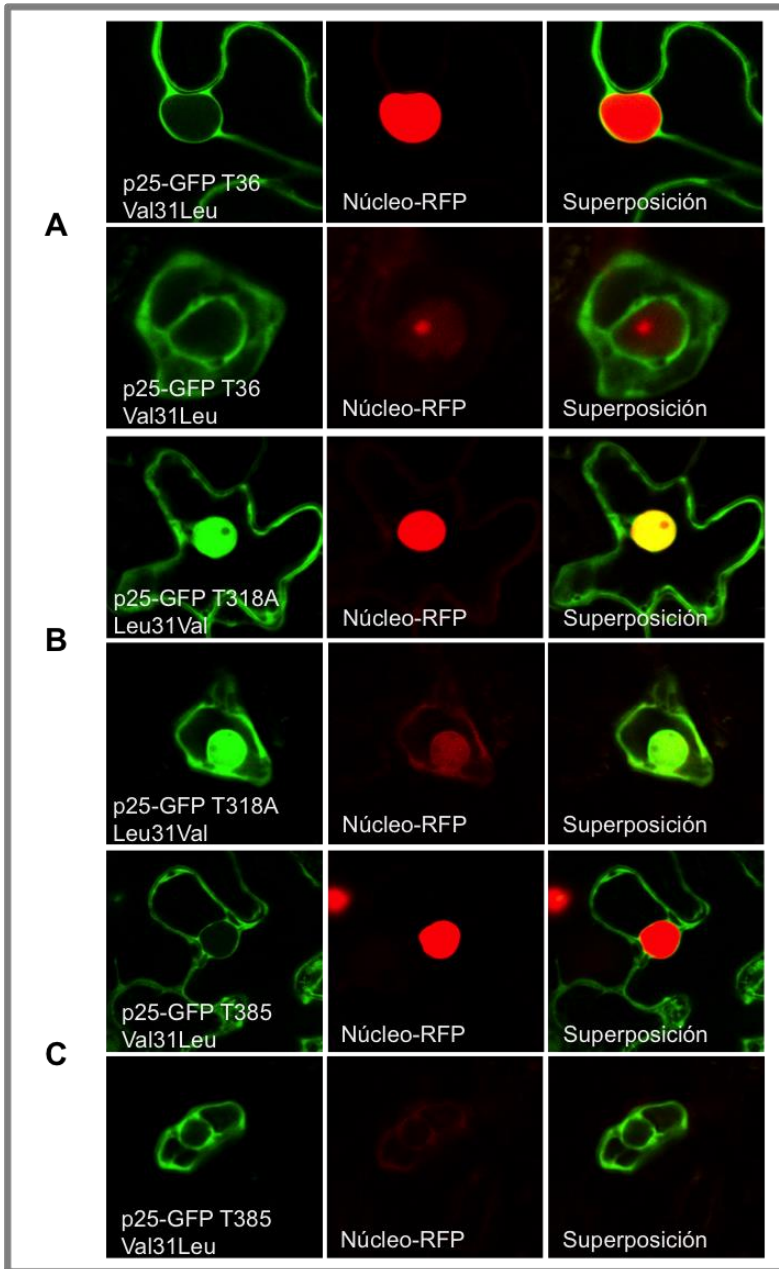


Fig. 32. Localización extranuclear y perinuclear de los mutantes puntuales V31L de p25-T36 (A) y T385 (C), y nuclear del mutante L31V de p25-T318A (B). Imágenes de microscopio confocal (2 dpi, $DO_{600} = 0.5$, marcador nuclear). Resto igual que anteriores.

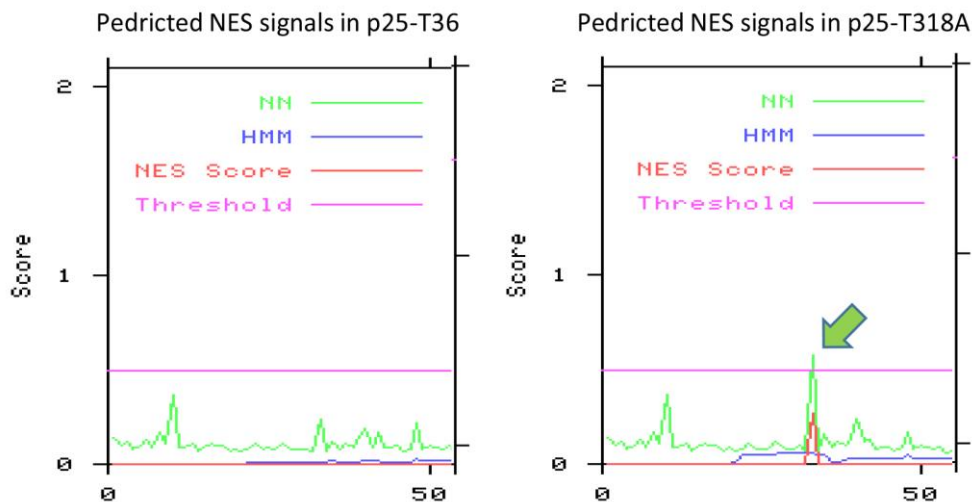


Fig. 33. Predicción de señales potenciales de tipo NES analizadas con el programa NetNES 1.1 (la Cour *et al.*, 2004) en los primeros 50 aminoácidos de la p25 de los aislados T36 (diagrama de la izquierda) y T318A (diagrama de la derecha). El umbral por encima del cual el programa predice una posición aminoacídica como perteneciente a una putativa NES se representa con una línea horizontal de color violeta, observándose que sólo detecta la posición L33 de p25-T318A como potencial (señalada con una flecha verde). Sin embargo, el valor NES que confirma dicha posición, representado con un pico de color rojo en la L33, no supera el umbral.

En otras proteínas también se han descrito señales NES funcionales *in vivo* que no se han podido predecir con programas *in silico* de este tipo.

Sin embargo, al revisar la bibliografía (Dong *et al.*, 2009) pudimos comprobar que la L31 de p25-T318A formaría parte de una NES rica en leucinas del tipo φ -X₍₂₋₃₎- φ -X₍₂₋₃₎- φ -X- φ (donde φ es Leu, Val, Ile, Phe o Met, X es cualquier aminoácido y los números entre paréntesis el número de repeticiones), únicamente presente en este aislado, y que su acción explicaría el cambio de localización de la proteína con respecto a los otros aislados.

También se sintetizaron dobles mutantes combinando la mutación K-N NLS-R1 con la V31L en p25-T36 o con la L31V en p25-T318A. En ambos casos la localización fue básicamente la misma que la observada para los mutantes simples de la posición 31

(datos no mostrados), resultados que confirman la insuficiencia de la posible NLS-R1 para actuar por sí sola.

Adicionalmente, para determinar la participación de las leucinas de este motivo NES en la localización de las p25, se generaron y ensayaron mutantes de sustitución de estas L en las posiciones 33 y 39 de p25-T36, y 31, 33 y 39 de p25-T318A, por alaninas (A), aminoácidos de carga neutra (mutantes L-A NES). Estas mutaciones no afectaron la localización nuclear de p25-T36, (Fig. 34, panel A) pero produjeron un cambio drástico en la de p25-T318A, que pasó a ser nuclear (Fig. 34, panel B), confirmando la implicación directa de este motivo, y de sus leucinas, en la exportación núcleo-citosol de la proteína.

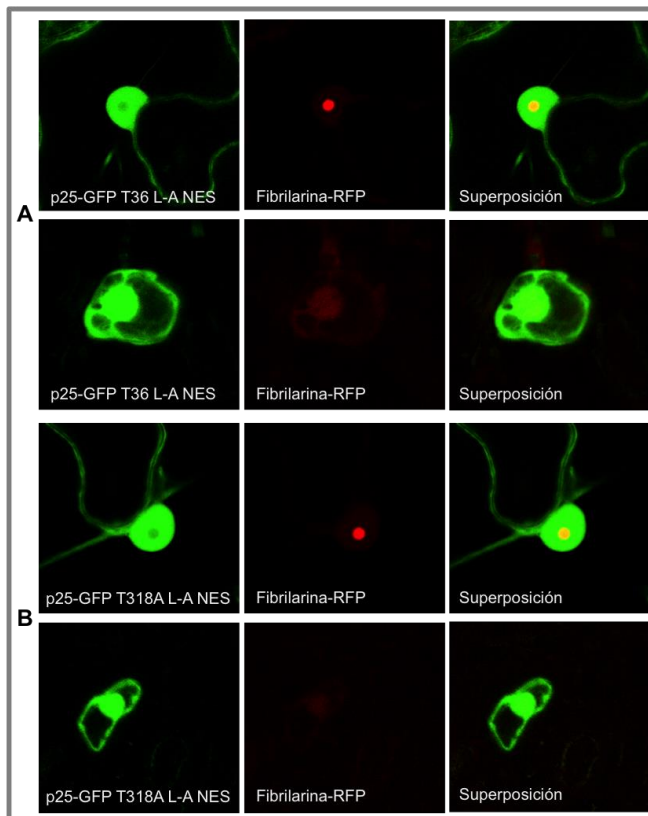


Fig. 34. Localización nuclear de los mutantes L-A NES de p25-T36 (A) y p25-T318A (B) en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* (panel superior) y *C. macrophylla* (panel inferior). Marcador nucleolar de fibrilarina. Resto como Fig. 32.

3.3.4. Estudio de la participación de la R2, o de algún motivo de ésta, en regular la localización subcelular de p25

En la R2 de p25 existe también un motivo rico en lisinas (K) entre las posiciones 65 y 76 (Fig. 35). Con el fin de analizar éste con detalle por si fuese una posible NLS o incluso NES, se sintetizaron mutantes de delección de los aminoácidos 64 a 74 (mutantes $\Delta 64-74$), y mutantes de sustitución de las lisinas de las posiciones 65, 67, 74 y 76 a asparagina (N) (mutantes K-N NLS-R2) sobre la p25 de los aislados T36 y T318A.

La delección provocó un cambio de localización de p25-T318A a nuclear (Fig. 36, panel B), como la observada para p25-T36 (Fig. 36, panel A), únicamente en el huésped herbáceo, mientras que en el natural se mantuvo extranuclear.

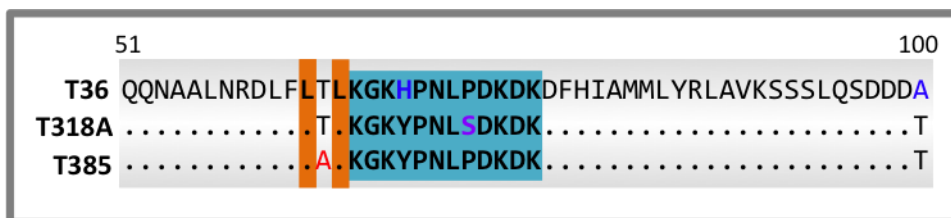


Fig. 35. Detalle de la secuencia aminoacídica de p25 entre las posiciones 51 y 100 de los 3 aislados estudiados. En ella se puede observar el motivo rico en K de color azul y las leucinas de las posiciones 62 y 64.

Estos resultados se confirmaron con el ensayo de los mutantes puntuales de sustitución K-N NLS-R2, cuya localización fue de nuevo nuclear para T36 (Fig. 37, panel A) y T318A (Fig. 37, panel B) en el huésped herbáceo, y confirmó la implicación de este motivo, de algún modo, en la localización de p25.

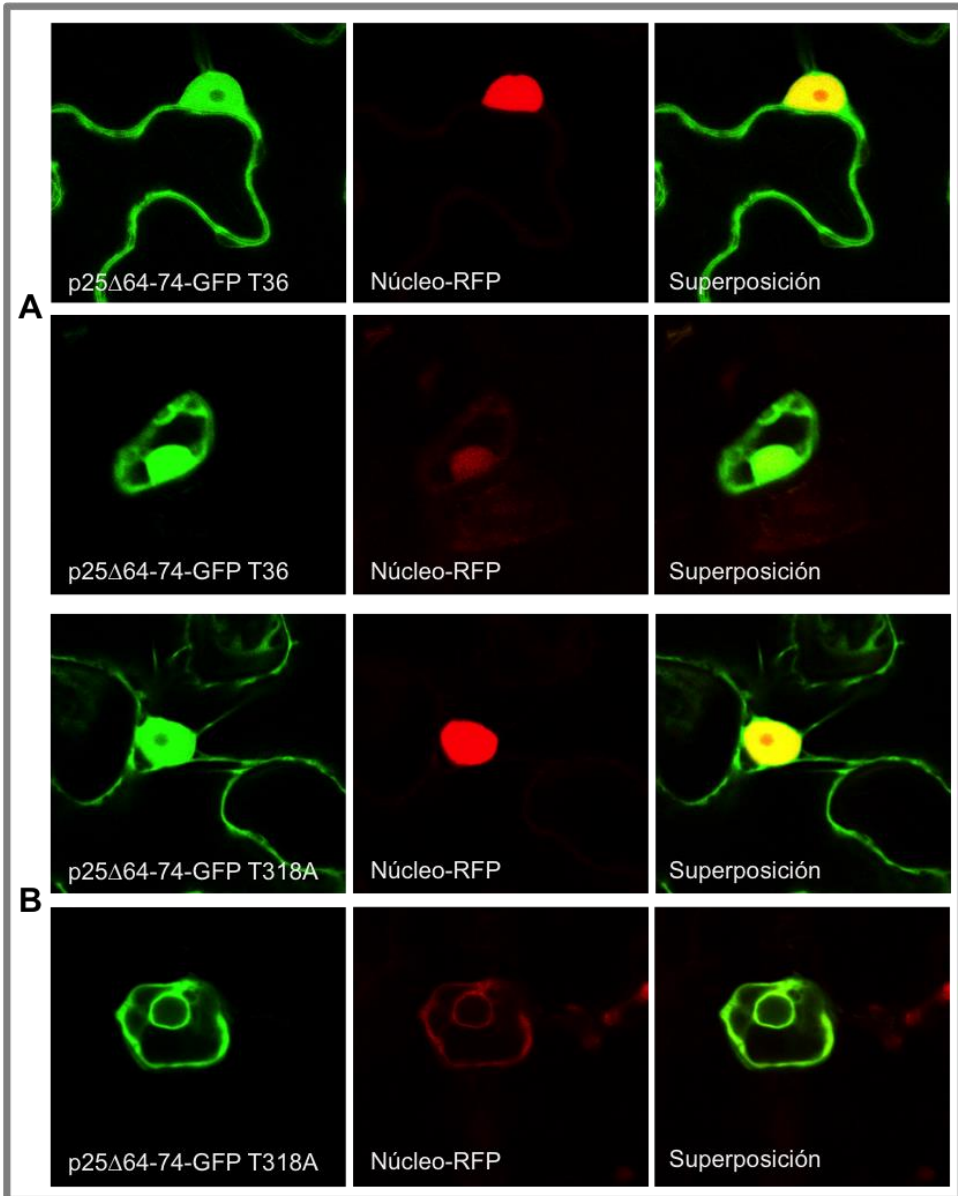


Fig. 36. Localización subcelular del mutante de deleción $\Delta 64-74$ en p25-T36 (A) y p25-T318A (B). Se observa un cambio de localización de la p25 de T318A solo en el huésped herbáceo. Co-infiltración con marcador nuclear a $DO_{600} = 0.5$. Resto como Fig. 32.

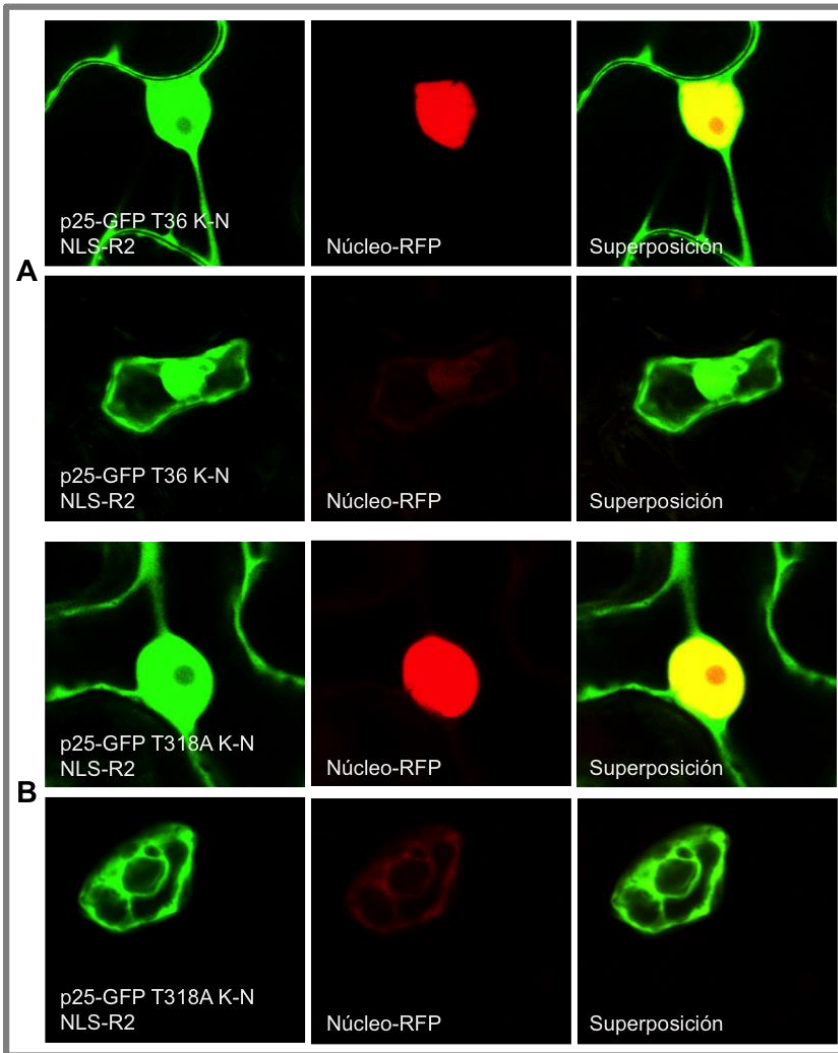


Fig. 37. Imágenes de microscopio confocal (2 dpi) de la localización nuclear de los mutantes K-N NLS-R2 de p25-T36 (A) y p25-T318A (B). Co-infiltración con marcador nuclear RFP a $DO_{600} = 0.5$. Resto igual que anteriores.

Sorprendentemente, el análisis de la secuencia aminoacídica de p25 con el servidor de predicción NetNES 1.1 detectó como leucinas potenciales de formar parte de una señal NES, las de las posiciones 62 y 64 en ambos aislados (Fig. 38). Los valores de NES score predichos por el programa superaban el valor umbral del

mismo, al contrario de lo observado en la NES de la R1. Con el fin de confirmar la posible implicación de este motivo como una segunda NES, se diseñaron mutantes puntuales de ambas posiciones sobre p25-T318A y p25-T36 sustituyendo las L62 y L64 por alaninas (mutantes L62-64A).

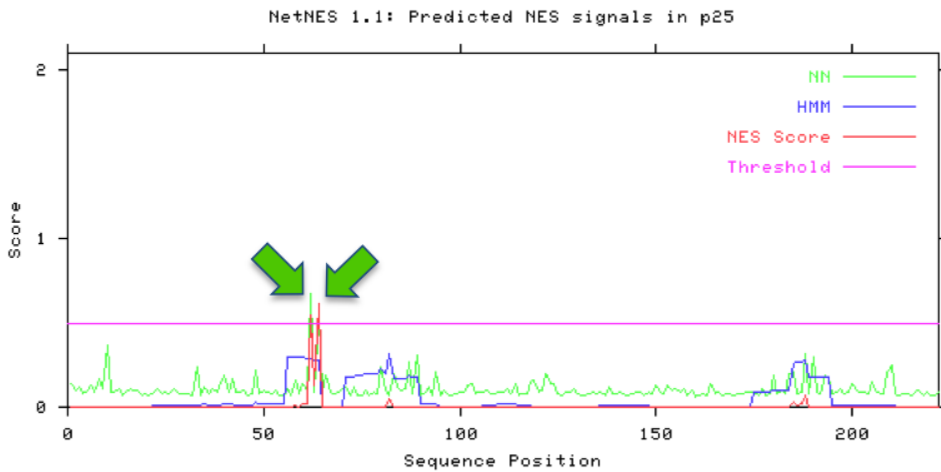


Fig. 38. Predicción de señales potenciales de tipo NES analizadas con el programa NetNES 1.1 (la Cour *et al.*, 2004) en la p25 de los aislados T36 y T318A. Se observa la detección de las posiciones L62 y L64 como posibles aminoácidos presentes en una NES (señaladas con una flecha verde).

En contra de lo esperado, los mutantes generados no mostraron diferencias parciales de localización respecto a las p25 salvajes, descartando dichas leucinas como parte de una NES (Fig. 39).

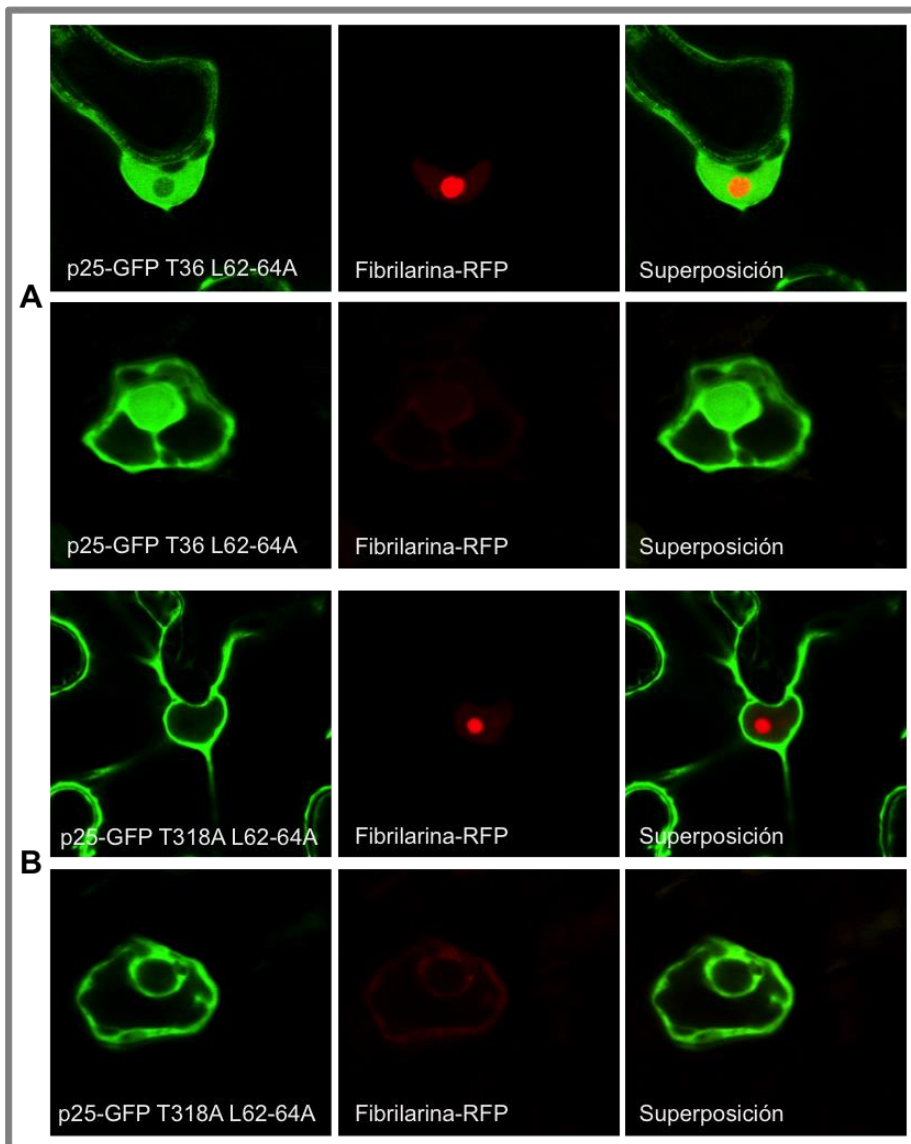


Fig. 39. Localización subcelular del mutante L62-64A de p25-T36 (A) y p25-T318A (B) sin apreciar cambios en la localización de las proteínas. Co-infiltración con marcador nucleolar de fibrilarina a $DO_{600} = 0.5$. Resto como anteriores.

Por otra parte, como en la R2 de p25 existe un polimorfismo en la posición aminoacídica 72, donde aislados severos como T318A tienen una serina (S), y otros aislados como T36 y T385

presentan una prolina (P), se ensayaron mutantes de sustitución intercambiando dicho aminoácido (P72S en p25-T36 y S72P en p25-T318A, respectivamente) para analizar su efecto. No se observaron diferencias de localización con respecto a las p25 salvajes, como tampoco al ensayar dobles mutantes combinando dicha mutación con la delección $\Delta 29$ de la R1, que presentaron la misma localización que sus respectivos mutantes simples. Se descartó pues una posible acción única o combinada de esta posición aminoacídica en la localización (datos no mostrados).

Cabe destacar con respecto a este polimorfismo y la región de p25 en la que se encuentra, que distintos programas informáticos (ej. PPSearch de EMBL) reconocen motivos o patrones típicos de modificaciones postraduccionales, como la N-glicosilación y la fosforilación en algunas posiciones de esta región. Así, el aminoácido N70 que forma parte de la secuencia **NLSD** (patrón de ASN-glicosilación) de la p25 de T318A podría sufrir esta modificación en contraste con el N70 de la secuencia **NLPD** presente en la p25 de T36 y T385 que no lo haría. Por otra parte, la P72 de p25-T318A formaría parte de un patrón **SDK** o **SDKD** que podría ser reconocido por la protein-kinasa C o C2 (PKC o CK2) y ser fosforilada en esta posición. Desconocemos si estas posibles modificaciones se producen *in planta* y cómo afectarían la regulación de esta región y de la localización subcelular diferencial de la p25.

3.3.5. Análisis de la R3.

Como se ha descrito anteriormente, existe un pequeño motivo rico en lisinas (Fig. 23, en amarillo) en la R3 de p25 que podría formar parte de una hipotética NLS mono o bipartita. Por ello, se generaron mutantes de delección de los aminoácidos 202-204 (mutantes Δ NLS-R3) y dobles mutantes combinando esta mutación con la $\Delta 31$.

Los mutantes de delección sencilla de la NLS putativa se localizaron como sus correspondientes proteínas salvajes, y los dobles mutantes $\Delta 31$ Δ NLS-R3 mostraron la misma localización que los mutantes $\Delta 31$ simples (datos no mostrados). Estos resultados descartan este motivo de la R3, al igual que ocurrió con el de la R1, como una señal NLS, desconociendo si existe un verdadero motivo

NLS en la proteína o cómo se regula la localización nuclear de la p25-T36.

Por último, se estudió el efecto del polimorfismo en la posición 194 de la R3 de p25, donde se encuentra una isoleucina (I) en aislados como T36 y T385, y una valina (V) en genotipos más virulentos como T318A. El intercambio de la isoleucina por una valina (p25-T36) o el cambio contrario (p25-T318A) tampoco alteró la localización de p25 (Fig. 40).

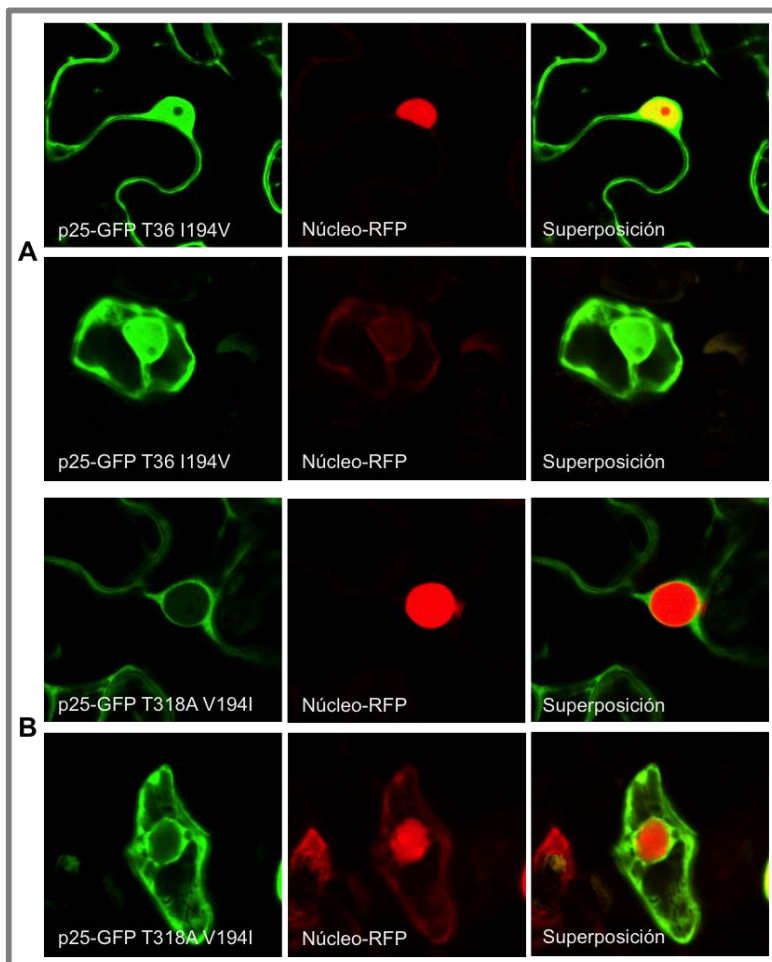


Fig. 40. Localización subcelular del mutante puntual I194V de p25-T36 (A) y V194I de p25-T318A (B) sin apreciarse cambios de localización. Resto igual que anteriores.

3.4. Ensayo y estudio *in vivo* de un clon infeccioso del aislado T36 (CTV-GFP) con la mutación p25-V31L en la NES de la CP.

Para estudiar la implicación del aminoácido Leu31 (presente en la proteína del aislado T318A) o Val31 (presente en la proteína del aislado T36) de la NES durante la infección de CTV *in planta*, se sintetizó un clon de longitud completa T36-GFP en el que se introdujo la mutación V31L en el gen *p25*. Para ello, se amplificó la región genómica comprendida entre las posiciones 11.8 y 17.2 Kb y se clonó vía *PmeI* x *PstI* en el plásmido pCAMBIA-T36GFP-88.3 (El-Mohtar y Dawson, 2014). Éste último expresa la proteína GFP en grandes cantidades al estar su ORF insertada en el extremo 3'-UTR del genoma del virus, lo que permite seguir la infección de CTV en *N. benthamiana* en etapas aún más incipientes de la infección local.

Los clones obtenidos (88-3 e8) se agroinfiltraron en lotes de plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas llevando a cabo al menos 4 bioensayos independientes con sus respectivos controles.

La infección de CTV se detectó en las hojas infiltradas mediante lupa utilizando un filtro especial para GFP. Se observó que el clon completo 88-3 e8 que incluye la mutación V31L en p25 solo producía escasos *foci* de infección local aislados, que abarcaban un pequeño número de células. Éstos sólo se detectaron en 3 hojas infiltradas de 3 plantas del total de plantas infiltradas (> 40). La detección nunca fue posible antes de 9-10 dpi (Fig. 41, panel B). Posteriormente, no se detectaron nuevos *foci* ni en esas ni en otras hojas infiltradas de la misma planta. Los *foci* existentes, aunque aumentaban ligeramente de fluorescencia y tamaño hasta 14 dpi, ya no progresaban posteriormente quedando muy aislados debido a la falta de movimiento viral entre células cercanas (Fig. 41, panel B). A partir de los 14 dpi la fluorescencia decaía, observándose la muerte celular en el área colindante. Desde los 9 a los 14 dpi se observa una débil acumulación entre las células que invade el virus y una menor fluorescencia tanto en el interior de las células como en los núcleos.

Por el contrario, en el clon salvaje de T36 (CTV-GFP-88-3) se detectó infección local ya a 6-7 dpi en todas las hojas infiltradas de todas las plantas bioensayadas, que progresaba rápidamente. A 9 dpi había aumentado el número de *foci* y su tamaño, observándose ya *foci* en los elementos vasculares. En esta etapa se observa con

detalle la amplia conexión de las células en las que se está replicando y acumulando el virus, así como el citosol y los núcleos muy fluorescentes en su interior (Fig. 41, panel A derecha). A 12-14 dpi (Fig. 41, panel A) la infección llegaba a la totalidad de las hojas infiltradas, invadiendo por completo los tejidos vasculares, y a partir de 3 wpi se detectaba la infección sistémica.

Estos resultados sugieren que la localización de p25 *in vivo* en el contexto de la infección natural de CTV podría ser la que hemos observado a lo largo de este trabajo. Esta proteína podría resultar esencial para la infección local y/o sistémica de CTV-T318A y su mayor acumulación en el núcleo determinar alguna interacción esencial.

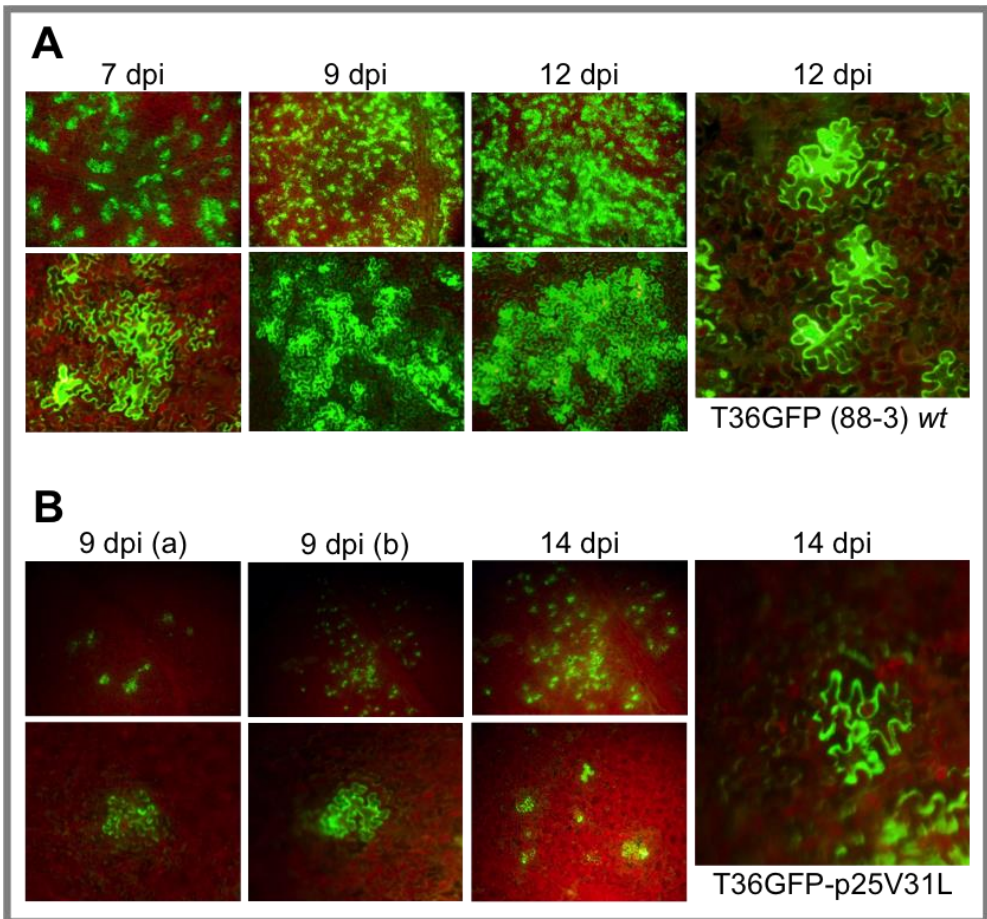


Fig. 41. (Página opuesta). Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones T36-GFP-88-3 *wt* (A) y 88-3 e8 con la mutación V31L en p25 (B), observadas con una lupa GFP a diferentes dpi. Progresión de la infección local, determinada por el aumento en la fluorescencia y tamaño de los *foci* de replicación en campo amplio (parte superior de los paneles) o a mayor aumentos (parte inferior de los paneles) para ver el detalle de las conexiones celulares e intensidad fluorescente del citosol y núcleos. A la derecha de ambos paneles se muestran células infectadas observadas a mayor aumento y resolución. Panel B, a y b indica dos de las plantas que mostraron infección local tras la infiltración con el clon mutante CTV-88-3 e8.

4. DISCUSIÓN

La respuesta diferencial de los aislados T36 y T318A de CTV en el huésped herbáceo *N. benthamiana* sugiere la existencia de interacciones diferenciales entre las proteínas de ambos aislados y las proteínas del huésped. Este tipo de respuesta nos permite abordar el estudio de los factores implicados en la interacción de CTV y su huésped natural, los cítricos, ya que los síntomas inducidos en *N. benthamiana* son similares a los observados en la infecciones naturales en cítricos, sugiriendo que las rutas de patogénesis de CTV podrían ser similares en ambos huéspedes.

En este trabajo analizamos dichas interacciones fusionando dos de las proteínas de CTV descritas como supresoras de silenciamiento génico, p20 y p25 (Lu *et al.*, 2004), al gen de la GFP y determinamos su localización subcelular mediante microscopía confocal y su posible función.

La proteína p20 se detectó tanto en el citosol como en el núcleo y especialmente asociada a regiones perinucleares formando agregados amorfos (Fig. 6 y 9), sin observarse grandes diferencias en la localización subcelular de la p20 entre los aislados T36, T318A y T385 (Fig. 6, 7, 8 y 9) ni tampoco entre el huésped natural *C. macrophylla* (Fig. 8) y el herbáceo *N. benthamiana* (Fig. 7 y 9). En este sentido, no se observan en el citosol los típicos cuerpos amorfos de gran tamaño descritos en un trabajo preliminar sobre la localización subcelular de p20 (Gowda *et al.*, 2000), sí bien las técnicas empleadas son distintas ya que en ese caso se utilizaba un clon infeccioso de CTV a partir del que p20 era expresada como una proteína de fusión a GFP.

En cambio, en las co-infiltraciones transitorias de p20-GFP junto a fibrilarina realizadas en este estudio, la acumulación de ésta última se extendía a zonas perinucleares y a diversos tipos de agregados intranucleares atípicos donde co-localizaba con p20 (Fig. 9). Es interesante destacar que se han descrito otros agregados, cuerpos o vesículas dentro del núcleo, además del nucléolo y cuerpos de Cajal, como intermediarios en la formación de éstos y de otras vesículas durante los procesos de maduración y movimiento de las mismas (Shaw *et al.*, 2014). Se ha sugerido una implicación de éstas vesículas en la maduración y exportación al citosol de las ribonucleoproteínas (RNPs). Los agregados o vesículas detectados en las localizaciones de p20, se observaron incluso a tiempos muy cortos y reduciendo drásticamente las densidades utilizadas en la agroinfiltración. En este sentido, los agregados de p20 acumulados en la zona perinuclear podrían sugerir una asociación a componentes de la membrana nuclear y/o derivadas del retículo endoplasmático. La localización de muchas proteínas virales en estructuras asociadas a membrana está relacionada con los complejos o factorías de replicación viral en el citosol (Salonen *et al.*, 2005; Mackenzie, 2005; Denison, 2008; Laliberté y Zheng, 2014). Adicionalmente, la interacción de algunas proteínas virales con la fibrilarina puede inducir su redistribución y afectar por ejemplo los niveles de transcripción de la RNA polimerasa I, redirigiendo así los recursos celulares en beneficio del virus (Hiscox, 2002). En otros casos, se ha descrito una correlación entre la localización nuclear de una proteína viral en forma de inclusiones nucleares puntuales y la inducción de una respuesta hipersensible (HR) como en el caso de la CP del TCV (Kang *et al.*, 2015). Las estructuras de tipo inclusión puntual o en agregados nucleares observados para la CP del TCV se podrían asemejar también a las que hemos observamos con la p20 de CTV.

La co-localización p20-fibrilarina mostrada podría sugerir la posible interacción de ambas proteínas *in planta*. Este tipo de interacción entre una proteína viral y la fibrilarina se ha descrito para otros virus. Uno de estos casos es la interacción de la proteína que codifica la ORF3 del virus de la roseta del maní (GRV) con la fibrilarina, interacción sin la cual este virus es incapaz de moverse a larga distancia en las plantas infectadas, y es necesaria para la formación de las partículas ribonucleoproteicas virales (Kim *et al.*,

2007). En el caso del virus del rayado del arroz (RSV), la proteína p2 interacciona con la fibrilarina para facilitar el movimiento a larga distancia del virus (Zheng *et al.*, 2015), algo muy similar a lo que sucede con GRV. Aunque no se ha observado una interacción directa entre p20 y el nucléolo, orgánulo celular donde la fibrilarina es más abundante, no se puede descartar la hipótesis de la interacción directa de ambas proteínas o a través de las vesículas amorfas observadas en el núcleo, ya que p20 podría ser capaz de re-localizar parte de la fibrilarina sintetizada por la célula y/o fusionar los posibles agregados o vesículas de p20 con el nucléolo afectando así funciones esenciales del ciclo viral como la transcripción o replicación, o permitir la necesaria interacción con componentes nucleares. Estas hipótesis se podrían confirmar en un futuro mediante la expresión de p20 en plantas de *N. benthamiana* con el gen de la fibrilarina silenciado, mediante ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) o análisis proteómicos que mostrasen a esta proteína como un potencial interactor en el interactoma de la planta huésped.

Además, es importante destacar que muchas proteínas virales interaccionan en alguna etapa del ciclo infeccioso con proteínas nucleares asociadas a la traducción de mRNAs con objeto de redirigir ésta a la síntesis de las proteínas virales (Nelson y Citovsky, 2005; Hyodo y Okuno, 2014; Heinlein, 2015) como los factores de elongación, traducción, helicasas, polimerasas, etc. (Li *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010). Otras actúan contrarrestando las rutas de defensa de la planta en distintas etapas, causando la metilación del DNA o la supresión del silenciamiento PTGS p.e., y esa capacidad va unida a su necesaria localización nuclear y/o nucleolar. Así, se ha descrito ampliamente la localización nuclear de diversas proteínas (VPg, NIa, NIb, ...) del género *Potyvirus* (Hajimorad *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2010; Rajamäki & Valkonen, 2009; Restrepo *et al.*, 1990; del Toro *et al.*, 2014), de la proteína 2b del género *Cucumovirus* (Shi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; González *et al.*, 2010) o del supresor de silenciamiento génico p19 de *Tombusvirus* (Uhrig *et al.*, 2004). Sin embargo, en todas estas proteínas referenciadas con localización nuclear y/o nucleolar se han descrito una o más señales de tipo NLS o NoLS. Aunque la secuencia de p20 presenta algunas regiones ricas en aminoácidos básicos ninguna se asemeja a las secuencias de este tipo descritas, ni

tampoco se ha predicho *in silico* con los programas utilizados. Pese a ello, no se dispone de datos *in planta* utilizando proteínas mutantes y tampoco se puede descartar su entrada al núcleo por otra vía.

Por otra parte, dado que p20 es un supresor del silenciamiento intracelular tampoco es de extrañar su localización nuclear, aunque sí es diferente a la observada para el otro supresor intracelular de CTV descrito, p23, que co-localiza con la fibrilarina, el nucléolo y los cuerpos de Cajal (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2013). En cuanto a proteínas afines de otros closterovirus, la proteína p21 de BYV, la homóloga de p20 de CTV, se localiza en el citoplasma formando cuerpos de inclusión aunque se acumula mayormente en la periferia de las células infectadas (Reed *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha visto que p21 se expresa de forma abundante durante el inicio de la infección del BYV (Peremyslov *et al.*, 1998; Hagiwara *et al.*, 1999), lo que sugiere la necesidad del virus de activar el proceso de supresión del silenciamiento en las primeras etapas de la replicación y antes de iniciar el movimiento célula-célula (Reed *et al.*, 2002), uniéndose y secuestrando los dúplex de siRNA generados por el proceso de silenciamiento (Lakatos *et al.*, 2006). Esto podría estar relacionado con el hecho de que los subgenómicos de p20 y p25 de CTV son los que más se expresan durante las infecciones *in planta* (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004), por lo que su mecanismo de acción podría ser similar al descrito para p21.

El núcleo y el nucléolo son los orgánulos en los que se localizan y ejercen su función la mayoría de las proteínas supresoras de silenciamiento descritas para virus de plantas, induciendo o contrarrestando las rutas de defensa antiviral, la patogénesis (Taliany *et al.*, 2010; Shaw y Brown, 2012), o la capacidad de infección y movimiento sistémico de los virus (Csorba *et al.*, 2009). Así por ejemplo, proteínas supresoras como la VPg de potyvirus requieren de su interacción con la fibrilarina para poder llevar a cabo su función (Rajamäki & Valkonen, 2009). De igual modo, el supresor 2b de CMV interacciona con AGO1 para inhibir el silenciamiento génico (González *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2012) además de actuar como un potente determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* (Brigneti *et al.*, 1998).

Se requerirán más estudios para poder determinar el papel de p20 en el núcleo y conocer sus interacciones con la maquinaria de silenciamiento, así como un análisis profundo de las posibles redes de interacción de esta proteína con el proteoma de la planta huésped. Como paso preliminar, en el siguiente capítulo de esta memoria se estudia la capacidad supresora y patogénica de esta proteína.

En cuanto a los resultados de localización de p25, el supresor de silenciamiento a larga distancia descrito para CTV (Lu et al., 2004), mostrados en este capítulo, hay que destacar que son sorprendentemente muy diferentes a los de p20. Así, la expresión de la proteína p25-GFP de los aislados T36, T318A y T385 de CTV mostró una localización nuclear y citosólica para los aislados T36 y T385 (Fig. 13 y 16) frente a una localización únicamente citosólica en el caso del aislado T318A (Fig. 13 y 16). Es importante resaltar que estos resultados fueron idénticos tanto en *N. benthamiana* como en el huésped natural cítricos (Fig. 14 y 15), no observándose diferencias en la localización entre la expresión transitoria de la proteína y su expresión en un contexto de infección viral heterólogo *in vivo* utilizando PVX (Sablowski et al., 1995) (Fig. 18). Todo ello parece indicar que la localización diferencial observada no es artefactual.

Muchas proteínas de virus de RNA de planta se localizan en el núcleo o tienen una fase de transporte nucleo-citoplasmático durante la infección viral. Su distribución regulada entre ambos compartimentos celulares permite coordinar y regular procesos tan importantes como la multiplicación viral en el citosol y la modificación del metabolismo celular o la inhibición de la defensa del huésped en el núcleo. Dado que p25 es una proteína estructural del virión, ha de localizarse en el citosol durante el proceso de encapsidación, pero otras funciones como su actividad supresora o la posible alteración de algunas actividades celulares para aumentar la síntesis de otras proteínas virales implicaría una fase nuclear. De hecho, también se ha descrito una localización nuclear de las proteínas de cubierta de algunos virus pertenecientes a géneros como *Begomovirus*, *Carmovirus* o *Sobemovirus* (Kunik et al., 1998; Kang et al., 2015; Olsper et al., 2010). En el caso del género *Begomovirus*, se ha visto que la CP del virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) interacciona con la proteína HSP70 y ambas entran en el

núcleo, localización imprescindible para que el virus pueda infectar la planta (Gorovits *et al.*, 2013). En cambio, la CP del virus del arrugamiento del nabo (TCV), perteneciente al género *Carmovirus*, no requiere estar presente en el núcleo para que el virus pueda infectar al huésped, pero su localización nuclear activa la respuesta hipersensible de la planta como mecanismo de defensa (Kang *et al.*, 2015). Por otra parte, la CP del virus del moteado del dátilo (CfMV), miembro del género *Sobemovirus*, también actúa, al igual que p25 de CTV, como proteína supresora del silenciamiento, aunque de forma débil, ya que requiere la proteína P1 para llevar a cabo dicha función de forma eficiente (Olspert *et al.*, 2014). Estos datos apoyan la hipótesis de que las diferentes funciones de p25 se han de regular coordinadamente en diferentes compartimentos celulares, y que ello sería necesario para que el virus sea capaz de infectar su huésped.

La localización diferencial observada entre las p25 de CTV según el aislado sugiere, además, una distribución o transporte nucleo-citoplasmático desigual de estas proteínas que debe estar regulado. Este fenómeno también se ha descrito para la proteína ORF6 de las cepas L (también conocida como virus del mosaico del tomate, ToMV) y U1 del virus del mosaico del tabaco (TMV). Esta proteína, cuyo tamaño es de 4.8 kDa, se localiza en el retículo endoplasmático en la cepa L, mientras que en la cepa U1 presenta una localización nuclear/nucleolar, citoplasmática y mitocondrial (Gushchin *et al.*, 2013). Aunque ambas proteínas poseen señales de localización nuclear/nucleolar formadas por aminoácidos básicos (Musinova *et al.*, 2011), en la proteína L-ORF6 existe un motivo hidrofóbico en C-t que dirige a la proteína fuera del núcleo, o bien impide su entrada, quedando anclada al retículo endoplasmático (Gushchin *et al.*, 2013). Además, esta localización diferencial se ha asociado con distintos niveles de patogenicidad, de manera que la localización nuclear/nucleolar de U1-ORF6 aumenta en mayor grado la patogenicidad del *Tobacco rattle virus* (TRV) cuando se expresa como un sgRNA de éste (Gushchin *et al.*, 2013). Esta semejanza entre la proteína ORF6 y p25 podría ofrecer nuevos datos sobre el funcionamiento y el comportamiento de esta última dentro del contexto de la infección por parte de cada uno de los aislados de CTV.

Las proteínas p25 híbridas sintetizadas entre los aislados T36 y T318A (Fig. 20) mostraron que la región R1 parecía regular la

localización de la proteína y que su único intercambio provoca el cambio de localización subcelular de ésta (Fig. 20). Al analizar la secuencia aminoacídica de esta proteína se detectaron motivos ricos en aminoácidos básicos del tipo lisina (K) y/o arginina (R), regiones descritas en la bibliografía como señales de localización nuclear (NLS) (Lange *et al.*, 2007; Kosugi *et al.*, 2009; Freitas y Cunha, 2009) en la R1 y R3 (Fig. 23). Sin embargo, ninguno de los programas utilizados *in silico* para detectar este tipo de señales mostraron resultados positivos. Pero el tamaño de la proteína de fusión p25-GFP descartaría en un principio que la localización nuclear de la misma, observada en los aislados T36 y T385, fuera consecuencia de un transporte pasivo.

Además de éstas regiones tipo NLS, también se encontró un polimorfismo de secuencia en el aminoácido 31 de la R1, en el que existe una valina (V) en el aislado T36 y otros aislados suaves, mientras que en aislados más severos como T318A se encuentra una leucina (L) (Fig. 23). Así pues, la distribución celular de las quimeras estudiadas sugiere la implicación directa de la R1 de la p25 de CTV en la localización nuclear/extranuclear de la proteína. Sin embargo, el ensayo de múltiples mutantes de sustitución y de delección afectando los primeros 31 aminoácidos para analizar el putativo motivo NLS (Fig. 26 y 27), no mostró resultados concluyentes. La delección de esta región de aminoácidos no afectó la localización nuclear de la p25 de los aislados T36 y T318A. También se descartó la posibilidad de que existiera una señal NLS bipartita ya que el mutante de delección de la posible NLS en la R3 (datos no mostrados) y el doble mutante que carecía de ambas NLS putativas en la R1 y R3 mantuvo principalmente la misma localización (datos no mostrados). Adicionalmente, el resto de mutantes puntuales de las putativas NLS (total o parcialmente) ensayados tampoco modificaron la localización mayoritaria de la proteína, descartando su implicación. A priori, estos resultados descartarían este motivo como una NLS, pero se sabe que hay proteínas víricas que son capaces de entrar al núcleo co-transportadas con otra proteína nuclear formando complejos multiproteicos (Roberts *et al.*, 1987; Freitas y Cunha, 2009; Ding *et al.*, 2010). No se podría descartar que este fuese el caso de p25, aunque también existe la posibilidad de que esta proteína contenga una NLS atípica al igual que, por ejemplo, la proteína VP19C del

virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1), en la que recientemente se ha descubierto la presencia de un tipo de NLS cuya secuencia es ⁵⁰PRGSGPRRAAS⁶¹ (Li *et al.*, 2012). Por otra parte, también se han descrito proteínas de virus de plantas que carecen de señales NLS pero cuya localización subcelular se regula por otras proteínas virales. Así, este mecanismo podría operar para algunas VPgs de potyvirus como se ha descrito para el virus del mosaico amarillento del trigo (WYMV), en el que la interacción entre su CP y VPg regula el transporte núcleo-citosol de esta última (Liyang *et al.*, 2013).

Continuando con la región Nt de la p25 de CTV, las deleciones realizadas de los primeros 29 o 31 aminoácidos cambiaron por completo la localización de la p25 de T318A, que pasó a ser nuclear en ambos casos (Fig. 25 y datos no mostrados). Al descartar que las NLS putativas regularan la localización nuclear de la proteína, se analizó la implicación del aminoácido polimórfico de la posición 31. El intercambio de la leucina 31 por valina hizo que la p25-T318A se localizara completamente en el núcleo (Fig. 32), mientras que el cambio inverso V31L en la p25-T36 y la p25-T385 provocó que éstas se localizasen exclusivamente en el citosol y perinúcleo (Fig. 32). Este cambio radical de localización indica la existencia de al menos otro motivo diferente en la región N-t de esta proteína que regula su exportación del núcleo al citosol de forma activa y que se ve afectado por la deleción realizada. Este tipo de regiones se han descrito como reguladoras de la exportación núcleo-citosol en otras proteínas al contener señales de exportación nuclear (NES) (Boulo *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010) (Fig. 31). Así, esta región de la p25 de T318A actuaría como una NES, formada por aminoácidos hidrofóbicos y varias leucinas, del tipo *leucine-rich* NES, las más comunes descritas en la bibliografía (Dong *et al.*, 2009, Ding *et al.*, 2010) y su secuencia seguiría el consenso φ -X₍₂₋₃₎- φ -X₍₂₋₃₎- φ -X- φ (donde φ es Leu, Val, Ile, Phe o Met, X es cualquier aminoácido y los números entre paréntesis el número de repeticiones). En este contexto, cabe destacar la función relevante de la leucina de la posición 31 que no sólo es necesaria sino que es suficiente para regular el cambio de localización de p25 como se ha demostrado con los mutantes ensayados que afectan a las distintas leucinas (Fig. 34). De este modo, la mutación de la leucina de la posición 31 a valina implica que esta NES dejaría de

ser funcional, o no sería tan potente como para regular la salida completa de la p25 del núcleo al citosol.

Sin embargo, el análisis de la secuencia aminoacídica de p25 de los aislados T36 y T318A mediante el programa NetNES 1.1 (la Cour *et al.*, 2004) detectó como leucinas potenciales de formar parte de una NES las de las posiciones 33, 62 y 64, pero no así la L31. Como se ha mencionado antes, los programas *in silico* no siempre detectan los motivos funcionales *in vivo*. Sin embargo es interesante destacar que las L62 y L64 se encuentran inmersas en una región rica en aminoácidos de tipo lisina alternados con hidrofóbicos y otras leucinas, por lo que no se podría descartar la existencia de una segunda señal de tipo NES. A pesar de ello, el análisis de la localización subcelular de los mutantes puntuales L62 y L64 ensayados para las p25 no mostró cambios mayores respecto a la de las p25 salvajes. Este resultado no es de extrañar, ya que se han descrito muchas señales de este tipo que no han sido previamente predichas con programas *in silico* lo que ocurriría en el caso de la L31.

Era pertinente pues estudiar la implicación de la L31 de la p25 *in vivo* en un contexto de infección viral mediante la expresión de un clon de longitud completa del aislado T36 marcado con GFP (El-Mohtar y Dawson, 2014) en *N. benthamiana*, ya que no se dispone de un clon infeccioso del aislado T318A en este huésped. Así, el clon 88-3 e8 de T36 porta la mutación V31L en la p25 de este aislado. La expresión/replicación de este clon quedó reducida a escasos *foci* únicamente detectables en algunas de las hojas inoculadas que no progresaban al resto de la planta, lo que implicaba una falta o deficiencia en el movimiento viral y/o en establecer las interacciones necesarias para ello. Estos resultados sugieren que la presencia de p25 en el núcleo, lo que ocurre con la p25 de T36, podría ser esencial para la infección local y/o sistémica en este huésped debido a alguna interacción esencial con proteínas del huésped. Sin embargo, no hay que obviar dos problemas importantes; por una parte, el no disponer de un clon completo para el aislado T318A en el que analizar la mutación complementaria L31V de p25, que permita confirmar que la localización nuclear de p25 es la que posibilita la infección sistémica de *N. benthamiana* por CTV. En segundo lugar, no podemos descartar que la falta de

funcionalidad de los clones mutantes obtenidos de 88-3 e8 sea consecuencia de alguna otra mutación ajena a la introducida.

Volviendo a los ensayos de expresión transitoria y localización subcelular de la p25, la implicación de la L31 en la NES de p25-T318A podría verse anulada en los mutantes de delección $\Delta 31$, lo que explicaría su cambio de localización subcelular. Sin embargo, éste no sería el caso de los mutantes $\Delta 29$ cuya localización es más difícil de explicar. En este mutante deben concurrir otras regiones o factores que expliquen el cambio de localización de la p25-T318A, así como el mantenimiento de la localización nuclear de p25-T36. Para ésta última podría existir otro motivo en otra región de la proteína, ya que al eliminar los primeros 29 aminoácidos y dejar intacta la posible NES, tanto p25-T36 como p25-T318A se han localizado en el núcleo.

Así, se analizaron otras regiones adicionales en la proteína como la subregión de los aminoácidos 18 a 21 dentro de la R1, en la cual se alternan aminoácidos de carga negativa con aminoácidos hidrofóbicos, y cuya delección mostró un cambio de localización en la p25 de T318A (Fig. 28). Delecciones más pequeñas de esta región que afectaban a los aminoácidos 20 y 21 determinaron que éstos aminoácidos eran clave en la localización de la p25-T318A ya que su delección modificaba la localización (Fig. 29 inferior). Ello sugería la posibilidad de que estos 2 aminoácidos, o uno de ellos, fueran relevantes en regular dicha localización bien directa o indirectamente a través de un cambio conformacional de la región, un cambio del balance de cargas pe. En este sentido, ya que los aminoácidos de las posiciones 19 y 20 son dos ácidos aspárticos (D) con carga positiva, se ensayaron diversos mutantes de sustitución de los mismos (Fig. 30). Únicamente el doble mutante a un aminoácido sin carga como la alanina (A) entraba ligeramente en el núcleo, mostrando una localización subcelular intermedia.

En su conjunto, la descripción de una señal de tipo NES en la p25 de CTV, que se analiza extensivamente en este trabajo y que determina una localización subcelular diferencial de esta proteína según el aislado, no explica todo. Si bien la presencia de la NES en p25 iría en la dirección de lo descrito en muchas otras proteínas virales, como muchas de las CP de virus de plantas, cuya regulación núcleo-citoplasmática esencial está regulada por una o varias señales NLS y NES, la ausencia de una NLS clara o de otras

regiones reguladoras en p25 está por determinar. Así, la localización de p25 es más compleja de lo anticipado, pudiendo existir varios motivos o regiones implicados, y no se explica únicamente por la presencia de la NES o señales NLS clásicas, sino que también podrían intervenir otros factores conformacionales o de interacción. De este modo, los resultados de localización observados con los mutantes de delección $\Delta 64-74$ no sugieren que este motivo actúe como una NLS, pero tampoco descartan que lo haga como una NES. En este caso además, también se observó un cambio de localización subcelular diferente de la p25-T318A según el huésped, ya que el mutante delecionado se acumulaba en el núcleo de las células del huésped herbáceo pero permanecía mayormente extranuclear en cítricos (Fig. 36). Adicionalmente y como se ha sugerido, los patrones predichos de glicosilación y fosforilación en algunos aminoácidos de esta región también podrían regular la función de posibles motivos en esta zona.

Aunque se requerirán más estudios para discernir entre estas posibilidades en el futuro, los resultados aportados en este trabajo suscitan numerosas preguntas y son un sólido e interesante punto de partida para ello.

CAPÍTULO II

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa frente a las infecciones inducidas por patógenos como los virus, siendo una de las más relevantes el silenciamiento génico mediado por RNA. Éste puede actuar a nivel transcripcional o postranscripcional y es un mecanismo regulador muy conservado. Tal como se mencionó en la Introducción general (apartado 4.2), este proceso de silenciamiento (Fig. 1) consiste básicamente en: i) una fase inicial mediada por dsRNAs y dependiente de las enzimas tipo DICER, cuya acción causa la producción específica de siRNAs virales de 21 a 24 nt (Hamilton and Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001); ii) una fase efectora en la que participan las proteínas Argonauta (AGO) para formar los complejos RISC (Fagard *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004) y, iii) una fase de amplificación en la que están implicadas diversas RDRs (Voinnet *et al.*, 1998; Dalmay *et al.*, 2000; Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002), que causa una amplia dispersión de la señal de silenciamiento de RNA por la planta.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han descrito cuatro proteínas de la familia DICER, también llamadas Dicer-like o DCL (Bologna y Voinnet, 2014) y 10 tipos de AGOs (Mallory y Vaucheret, 2010; Carbonell y Carrington, 2015). Estas proteínas tienen un papel redundante y su acción se combina para formar los diversos pequeños RNAs que intervienen en el mecanismo de silenciamiento. DCL1 actúa como regulador positivo en la producción de siRNAs haciendo que los dsRNAs derivados de los genomas virales estén disponibles para el resto de proteínas DCL, tanto en infecciones causadas por virus de DNA como de RNA (Blevins *et al.*, 2006; Moissiard y Voinnet, 2006), pero también actúa como regulador negativo limitando la disponibilidad de DCL3 y DCL4 en la ruta de los miRNAs (Qu *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010). Por su parte, DCL3 es esencial frente a infecciones causadas por virus de DNA (Akbergenov *et al.*, 2006), aunque en menor medida también interviene en las inducidas por virus de RNA (Qu *et al.*, 2008; Raja *et al.*, 2008) generando siRNAs de 24 nt. También se ha postulado que podría actuar induciendo la metilación del DNA (Blevins *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2014) y tener un papel importante en la regulación de genes relacionados con la defensa antiviral, ya

que algunas proteínas supresoras del silenciamiento virales inhiben su función (Azevedo *et al.*, 2010; Lacombe *et al.*, 2010; Hamera *et al.*, 2012).

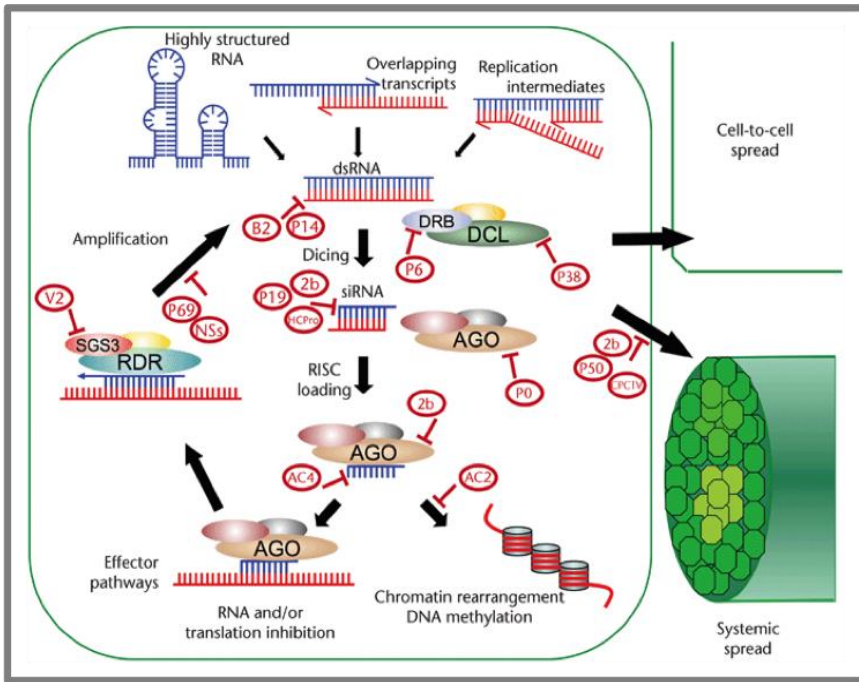


Fig. 1. Modelo de supresión del silenciamiento génico viral en plantas. Los supresores de silenciamiento están marcados con círculos rojos. DRB: proteína de unión a dsRNAs; DCL: proteína Dicer-like; RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA; AGO: proteína Argonaute; RDR: RNA polimerasa dependiente de RNA; SGS3: proteína supresora del silenciamiento 3. Tomado de Valli *et al.*, 2009.

Por último, DCL4 y DCL2 actúan principalmente frente a infecciones causadas por virus de RNA (Deleris *et al.*, 2006; Donaire *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010) y generan siRNAs de 21 y 22 nt, respectivamente (Csorba *et al.*, 2015). Estudios recientes apuntan a que DCL2 se encarga de una producción secundaria de siRNAs mientras que DCL4 es suficiente para el proceso de silenciamiento (Parent *et al.*, 2015).

Las proteínas AGO, de las cuales las más estudiadas son AGO1, AGO2 y AGO4 debido a su mayor implicación en el

mecanismo de silenciamiento, son las encargadas de unir o cargar los siRNAs generados por las DCL y formar el complejo RISC, interviniendo tanto en infecciones causadas por virus de DNA como de RNA (Pantaleo *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Raja *et al.*, 2008, 2014; Azevedo *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Carbonell *et al.*, 2012). AGO1, al igual que AGO2, es capaz de cargar siRNAs de 21 y 22 nt, pero mientras que la primera puede degradar el RNA viral o reprimir la traducción de sus proteínas (Carbonell *et al.*, 2012; Ghoshal y Sanfaçon, 2014), AGO2 tiene un papel secundario en la defensa antiviral, siendo regulada negativamente por AGO1, de modo que interviene cuando los niveles de esta última son bajos (Azevedo *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2011). Por otra parte, AGO4 carga los siRNAs de 24 nt, tiene una función clave en regular la metilación del DNA mediada por RNA (Zilberman *et al.*, 2003, 2004), y se ha descrito su papel antiviral importante en infecciones causadas por geminivirus, regulando la transcripción de los genes de defensa de la planta (Hamera *et al.*, 2012; Raja *et al.*, 2014)

Hasta el momento, en *N. benthamiana* se han identificado los homólogos de DCL2, DCL3 y DCL4 (Nakasugi *et al.*, 2013), aunque su implicación en el proceso de silenciamiento génico aún no se ha demostrado. Lo que se sabe es que los niveles de transcripción de estas DCL son similares en hojas y raíces (Nakasugi *et al.*, 2013; Andika *et al.*, 2015), y que la inactivación de DCL4 provoca un incremento en la replicación de PVX en las raíces de esta planta (Andika *et al.*, 2015). En el caso de las proteínas AGO, hasta hace poco no se conocía su papel en el silenciamiento génico de *N. benthamiana*. Estudios recientes han mostrado que AGO2 protege a la planta frente a infecciones provocadas por TBSV al que se le ha delecionado el supresor p19 (Scholthof *et al.*, 2011), mientras que AGO1 es necesaria para intensificar los síntomas causados por ToRSV al reprimir la traducción de su RNA 2 (Ghoshal y Sanfaçon, 2014). Por su parte, AGO4 es necesaria para el silenciamiento sistémico (a larga distancia) y regula los genes R frente a infecciones inducidas por PVX (Jones *et al.*, 2006; Bhattacharjee *et al.*, 2009).

Los virus requieren de la maquinaria y mecanismos celulares del hospedador para completar su ciclo biológico (Hull, 2002),

eludiendo al mismo tiempo los procesos de defensa que el huésped desencadena como respuesta a la infección. Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de virus codifican proteínas que inhiben la defensa del huésped basada en el silenciamiento génico a distintos niveles, para permitir su colonización. En los virus de plantas, dicha inhibición permite una infección local inicial de una o varias células, a partir de las cuales las nuevas partículas virales se mueven célula-célula a través de los plasmodesmos y acceden al floema permitiendo el movimiento sistémico del virus para invadir otros órganos distales de la planta. De forma general, los supresores virales inhabilitan el mecanismo de silenciamiento de las plantas actuando sobre moléculas de RNA relacionadas con dicho mecanismo, o con factores proteicos clave para el mismo (Fig. 1 y apartado 4.2 de la Introducción general).

En la Introducción de esta tesis se ha presentado una amplia descripción de las proteínas virales supresoras de silenciamiento de RNA descritas en virus de plantas y sus características (ver apartado 4.2 de la Introducción general). Queda patente que los mecanismos de acción de estas proteínas supresoras son muy diversos y complejos, y en muchos casos aún desconocidos. Una de las razones principales es la multifuncionalidad de estas proteínas, normalmente implicadas en una o más funciones virales adicionales que incluyen la replicación, movimiento y ensamblaje

Por ello, en muchos casos las proteínas supresoras del silenciamiento coinciden con los determinantes de patogenicidad del virus y se relacionan con su replicación y movimiento dentro de la planta (Moissiard y Voinnet, 2004; MacDiarmid *et al.*, 2005). En CTV, el único determinante de patogenicidad descrito hasta el momento es la proteína p23, situada en el extremo 3' del virus y que, además, también actúa como supresor del silenciamiento intracelular (Lu *et al.*, 2004; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el mecanismo de acción de p23 puede ser similar al del supresor HC-Pro del género potyvirus, ya que ambas proteínas son potentes supresoras a nivel intracelular y no intervienen en la metilación del DNA (Mallory *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004). Cabe destacar que en CTV también se han descrito otros dos supresores del silenciamiento génico, la proteína p25, que actúa a nivel intercelular, y la p20, que actúa tanto a nivel intra- como intercelular (Lu *et al.*, 2004). Se desconoce si la proteína p20 podría operar de

modo similar a la 2b de CMV (*Cucumber mosaic virus*) ya que ambas suprimen a nivel intercelular pero su supresión a nivel intracelular es más débil (Lu *et al.*, 2004). Por último, el mecanismo de acción de p25 todavía se desconoce.

Diversos tipos de bioensayos permiten identificar las proteínas virales supresoras del silenciamiento así como determinar su capacidad de supresión. Habitualmente se llevan a cabo: 1) ensayos de reversión del silenciamiento, en los que se examina el fenotipo de una planta con un gen indicador silenciado cuando se expresa la proteína candidata; 2) ensayos de expresión estable, en los que se cruza una planta transgénica portadora de un gen indicador silenciado con otra que expresa el gen candidato y se examina la expresión del gen indicador en la progenie; y 3) ensayos de expresión transitoria, en los que plantas transgénicas de *N. benthamiana* línea 16c, que expresan de forma constitutiva la proteína fluorescente verde (GFP) (Brigneti *et al.*, 1998), se co-infiltran con dos cultivos de *A. tumefaciens* transfectados con plásmidos binarios que expresan la GFP y la proteína candidata, respectivamente (Moissiard y Voinnet, 2004; Roth *et al.*, 2004; Qu y Morris, 2005; Li y Ding, 2006). En proteínas virales supresoras del silenciamiento génico postranscripcional a larga distancia, la técnica más empleada es ésta última. En este caso, todos los tejidos de la planta emiten fluorescencia verde cuando se iluminan con luz ultravioleta (UV). Al infiltrar las hojas con un cultivo de células de *A. tumefaciens* que contiene vectores binarios que expresan la GFP, la planta desencadena la respuesta de silenciamiento génico mediado por RNA degradando el mRNA de GFP y, al iluminar con UV, la fluorescencia observada es roja debido a la clorofila (Fig. 3). Sin embargo, cuando las hojas se agroinfiltran con una construcción que expresa la GFP y otra que expresa una proteína viral supresora del silenciamiento génico, el mRNA de la GFP no se degrada y aumenta la fluorescencia verde que se observa en las hojas iluminadas con luz UV (Fig. 3).

Esta técnica se ha empleado en muchas ocasiones para determinar la capacidad de supresión de las proteínas sintetizadas por diversos virus de plantas. Un ejemplo de ello ha sido la identificación de la proteína Rep del virus del enanismo del trigo (WDV), un geminivirus del género *Mastrevirus*, como supresora del silenciamiento génico a larga distancia (Wang *et al.*, 2014). Los

experimentos de supresión del silenciamiento génico revelaron que la capacidad de supresión de Rep es similar a la observada con el supresor p19 de tombusvirus (Fig. 2).

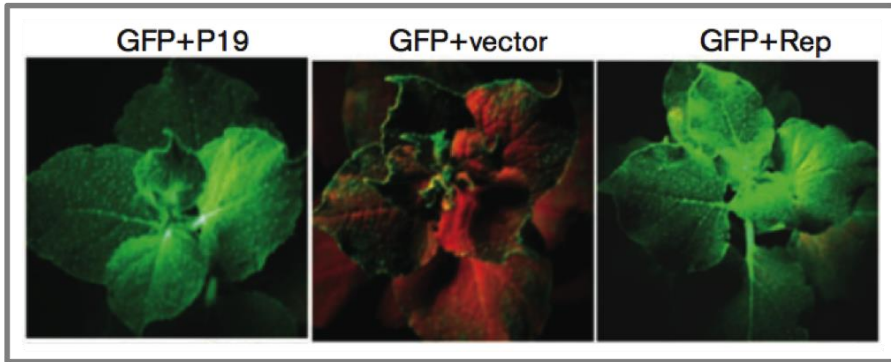


Fig. 2. Supresión del silenciamiento de GFP a larga distancia por Rep observada en hojas superiores de plantas de *N. benthamiana*. La capacidad de supresión de Rep es equiparable a la del supresor p19 de tombusvirus. Tomado de Wang *et al.*, 2014.

Por otra parte, la capacidad de supresión intracelular de la proteína p23 de CTV es similar a la que se observa con HC-Pro cuando se expresan transitoriamente en *N. benthamiana* línea 16c (Fig. 4, panel B) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). La función supresora de p23 involucra a la mayor parte de la proteína, ya que los mismos ensayos utilizando diversas versiones delecionadas de la misma suprimen el silenciamiento génico mediado por RNA (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). El mecanismo de supresión propuesto para p23 consistiría en el secuestro de los pequeños RNAs derivados de CTV o bien la inactivación de una o más proteínas AGO (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), ya que la acumulación de estos RNAs pequeños es muy elevada en plantas infectadas por el virus (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Además, su localización nucleolar también está relacionada con la función de supresión, por lo que p23 podría facilitar modificaciones epigenéticas del huésped mediante el transporte de siRNAs al núcleo (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), un mecanismo que también se ha propuesto para el supresor 2b de CMV (Kanazawa *et al.*, 2011).

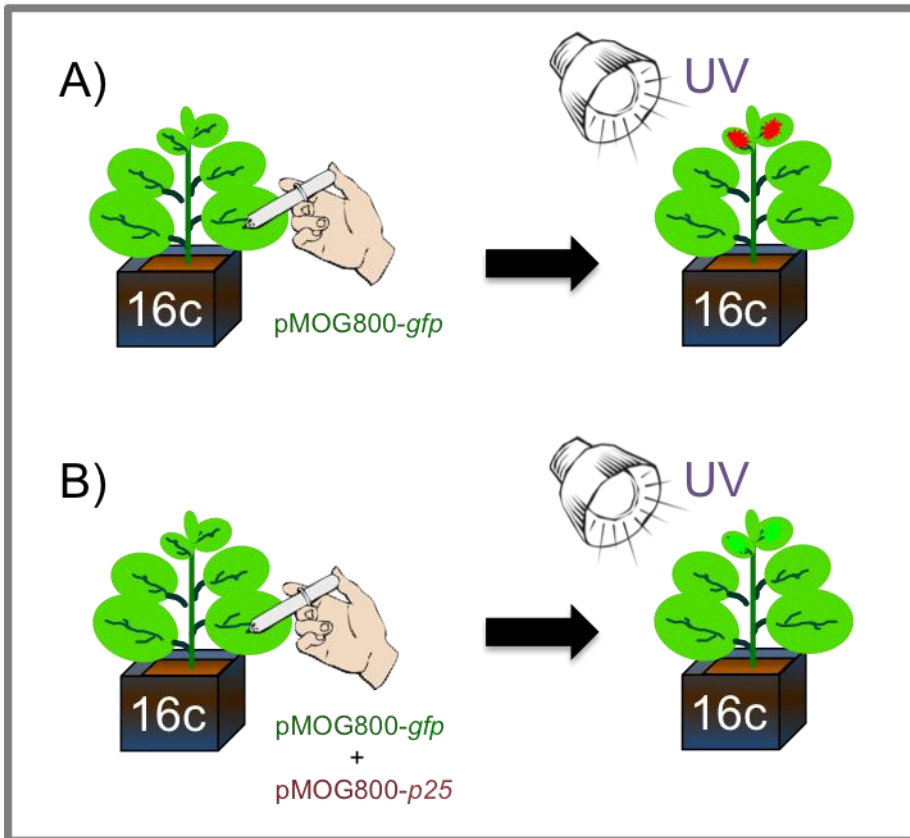


Fig. 3. Representación esquemática parcial del ensayo de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. (A) Lote de plantas agroinfiltradas con el vector binario pMOG800-*gfp*, o (B) con la combinación pMOG800-*gfp* y pMOG800-*p25* (que expresa la p25 de los aislados T36, T318A o T385). La agroinfiltración de pMOG800-*gfp* en hojas de *N. benthamiana* 16c produce el silenciamiento sistémico del transgen de *gfp* (hojas superiores rojas). La co-infiltración pMOG800-*gfp* y cualquiera de los vectores pMOG800-*p25* en *N. benthamiana* 16c produce la supresión del silenciamiento de *gfp* y, por consiguiente, el aumento sistémico de fluorescencia verde que comienza en las hojas superiores (B).

Adicionalmente, la expresión de p23 como un sgRNA de PVX *in vivo*, ha revelado que esta proteína actúa como determinante de patogenicidad de CTV, una capacidad que está limitada a sus primeros 157 aminoácidos que incluyen el dedo de Zn y las regiones básicas flanqueantes (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Su expresión en *N.*

benthamiana provoca un aclaramiento de las nerviaduras y un mosaico clorótico suave en hojas superiores a los 7 dpi, seguido de retraso en el crecimiento y necrosis en tallos y hojas infectadas a los 10 dpi y, finalmente, la muerte de las plantas a los 15 dpi (Fig. 4, panel A) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013).

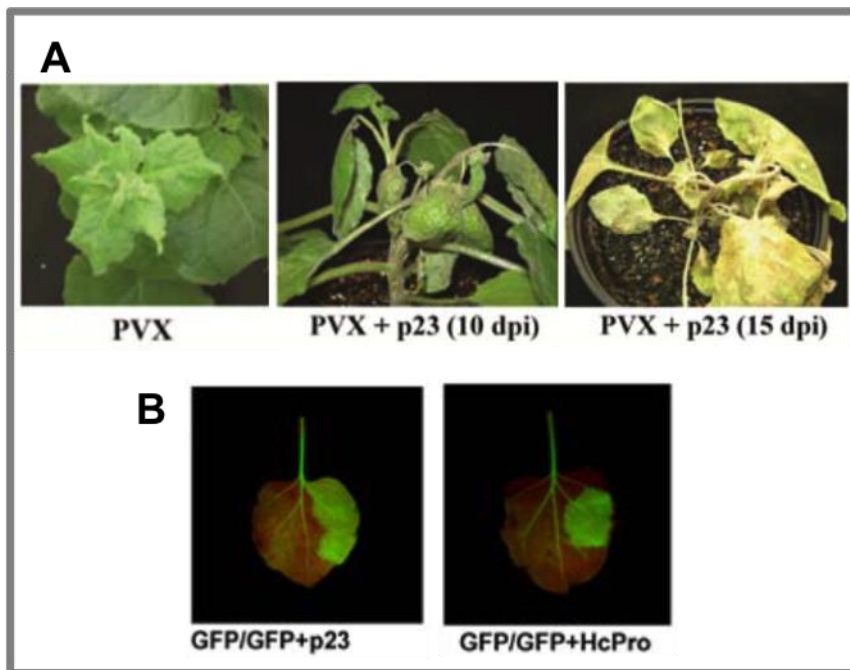


Fig. 4. A) Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* al expresar p23 como un sgRNA de PVX a los 10 y 15 dpi. B) Fluorescencia observada a 6 dpi en hojas de *N. benthamiana* 16c que expresan en su mitad izquierda la GFP, y en la derecha la GFP junto con p23 o HC-Pro. Tomado de Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013.

En este trabajo, nos propusimos utilizar la misma técnica para analizar la capacidad supresora del silenciamiento génico a larga distancia de la p25 de los tres aislados de CTV estudiados en el huésped *N. benthamiana*. Por otra parte, con objeto de determinar si p20 o p25 o ambas actúan como determinantes de patogenicidad, tal como se ha descrito para otros supresores virales de plantas y la misma p23 de CTV, recurrimos a la expresión *in planta* de estas proteínas como un RNA subgenómico (sgRNA) del virus heterólogo PVX.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Generación de vectores virales PVX-p20 y PVX-p25 e inoculación mecánica en plantas de *N. benthamiana*

Para expresar los genes *p20* y *p25* de CTV de los aislados T36 y T318A como sgRNAs del virus X de la patata (PVX), éstos se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores específicos con sitios de corte para *EagI* en el extremo 5' (sentido mensajero) y *SalI* o *XhoI* en el extremo 3' (antisentido) (Tabla 1) y se siguió la estrategia descrita en el apartado 2.2 del Capítulo 1. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pPVX202 (Sablowski *et al.*, 1995) (Fig. 1), previamente digerido con *EagI* y *SalI*, y las construcciones resultantes se transformaron mediante electroporación en células competentes JM109 de *E. coli* (ver apartado 2.3 del Capítulo 1).

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar los genes *p20* y *p25* de los aislados T36 y T318A y clonarlos en el vector viral pPVX202 (Sablowski *et al.*, 1995).

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
p20D	GTCTACT <u>CCGGCCG</u> ¹ ATGCGAGCTTACTTTA GTGTTAA	17765-17787
p20-T36R	AGAAGCGT <u>CTCGAG</u> ² CTACACGCAAGATGGA GAGACTA	18291-18313
p20-T318R	AGAAGCGT <u>CTCGAG</u> ² CTACACGCATGAAGGA GAAACTA	18245-18267
p25-T36D	ACAAC <u>GGCCG</u> ¹ ATGGACGACGAAACAAAGAA ATTGAAG	16155-16181
p25-T36R	GTACT <u>CTCGAG</u> ² TCAACGTGTGTTGAATTTCC CAAGCTGC	16799-16826
p25-T318D	ATGAC <u>GGCCG</u> ¹ ATGGACGACGAGACAAAGAA ATTGAAG	16110-16136
p25-T318R	GTACT <u>GTCGAC</u> ³ TCAACGTGTGTTAAATTTCC CAAGCTGC	16754-16781

D indica sentido mensajero o directo y R antisentido o reverso
Los sitios de corte para *EagI* (1), *XhoI* (2) y *SalI* (3) se muestran subrayados

Los vectores purificados se inocularon mecánicamente en plantas de *N. benthamiana*, espolvoreando tres hojas con carborundum, aplicando 30 µl de inóculo (60 ng/µl pPVX202, 50 mM K₂HPO₄ y agua libre de RNasa) y esparciéndolo manualmente. La

visualización de síntomas y la toma de material vegetal se realizó entre los días 7 y 15 post-inoculación. Además, los síntomas se fotografiaron con una cámara digital Canon G11.

2.2. Construcción de vectores binarios para la expresión transitoria en planta de la proteína supresora del silenciamiento génico p25 de CTV

El gen *p25* de los aislados de CTV T36, T318A y T385 se amplificó por PCR a partir de las construcciones descritas en el apartado 2.2 del Capítulo 1, utilizando cebadores específicos con sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *NheI* en el extremo 5' (sentido mensajero) y en el 3' (antisentido), respectivamente (Tabla 2), siguiendo la metodología descrita. Los fragmentos obtenidos se clonaron en un vector pBS sin *gfp* (cedido por la Dra. Susana Ruiz, IBMCP), previamente digerido con estas dos enzimas según el apartado 2.2 del Capítulo 1. El módulo 35S:p25:PoPit obtenido se escindió con *HindIII* para subclonarlo en el vector binario pMOG800. Los diversos clones pMOG800-p25 se transformaron mediante electroporación en células competentes de la cepa C58 de *A. tumefaciens*.

Tabla 2. Cebadores empleados para amplificar el gen *p25* de los aislados T36, T318A y T385 y clonarlo en el plásmido pBS.

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
p25-T36D	TGACG <u>ACCATGG</u> ¹ ACGACGAAACAAAGA AATTGAAG	16155-16181
p25-T36R	TGACGAGCTAGC ² TCAACGTGTGTTGAA TTCCCAAGC	16799-16826
p25-T318D	TGACG <u>ACCATGG</u> ¹ ACGACGAGACAAAGA AATTGAAGAAC	16110-16139
p25-T318R	TGACGAGCTAGC ² TCAACGTGTGTTAAAT TTCCCAAGC	16754-16781
p25-T385D	TGACG <u>ACCATGG</u> ¹ ACGACGAAACAAAGA AATTGAAG	16116-16142
p25-T385R	TGACGAGCTAGC ² TCAACGTGTGTTAAAT TTCCCAAGC	16760-16787

D indica sentido mensajero o directo y R antisentido o reverso

Los sitios de corte para *NcoI* (1) y *NheI* (2) se muestran subrayados

2.3. Ensayos de la actividad supresora del silenciamiento génico a larga distancia mediado por p25

La agroinfiltración y el mantenimiento de las plantas de *N. benthamiana* de la línea 16c, que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) de forma constitutiva, se llevó a cabo siguiendo la estrategia descrita en los apartados 2.8 y 2.9 del Capítulo 1. En cada ensayo se co-infiltraron siete plantas con volúmenes equivalentes de cultivos de *A. tumefaciens* a una $DO_{600} = 0.5$ que con las construcciones pMOG800-*gfp* y pMOG800-p25 de cada uno de los tres aislados analizados. Como controles negativos se emplearon los vectores pMOG800-*gfp* y el vector pMOG800 vacío, que se infiltraron en dos plantas cada uno. La progresión del silenciamiento se observó a lo largo del tiempo visualizando la fluorescencia verde en las hojas superiores a distintos días post-inoculación, utilizando una lámpara de luz UV Blak-Ray B-100AP High Intensity (Fig. 1) con una longitud de onda de 365 nm y potencia de 100 W. Se realizaron fotos con una cámara Canon G11 usando un filtro amarillo para la luz UV.

2.4. Extracción de RNAt de *N. benthamiana*

La extracción de RNAt se realizó a partir de 0.1-0.2 g de material fresco (hojas agroinfiltradas u hojas y peciolo de plantas infectadas con los vectores PVX) homogeneizado en tubo Eppendorf con N_2 líquido y bolas de acero de 4 mm de diámetro en un molino mezclador (Retsch MM 400). Este material se homogeneizó con 0.75 ml de TCES (0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.2 M NaCl y 2% SDS) y se añadieron 0.75 ml de fenol saturado con agua y 3.75 μ l de β -mercaptoetanol. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm 10 min y la fase acuosa se extrajo con un volumen de fenol saturado con agua y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El RNAt se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, y dos volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. El precipitado obtenido tras una centrifugación a 13000 rpm durante 30 min se lavó con etanol al 70% y se centrifugó 15 min a 13000 rpm. Finalmente, el RNAt se resuspendió en 20 μ l de agua libre de RNasa. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro

(NanoDrop 1000, Thermo Scientific) con 1.5 µl de los extractos diluidos.

Con el fin de cuantificar y equilibrar las muestras de RNA utilizadas en hibridaciones posteriores, 5 µg de cada extracto de RNA_t se mezcló con un volumen de tampón desnaturante (50% formamida, 50 mM EDTA, 8 M urea, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% de cianol de xileno), se incubó durante 5 min a 95°C y se enfrió inmediatamente en hielo durante 2 min. Las preparaciones se separaron en geles de poliacrilamida al 5% (relación 29:1 de acrilamida:bisacrilamida) con 8 M urea y 1X TBE (100 mM Tris, 90 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, pH 8.3). La electroforesis se realizó en tampón 1X TBE durante 1 h a 200 V constantes, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (GeneChoice, 0.5 µg/ml) y los RNAs se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, y se detectaron empleándose el 5S RNA como control de carga para los geles de poliacrilamida transferidos.

2.5. Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina

Para realizar los ensayos de hibridación molecular se sintetizaron sondas de RNA marcadas con digoxigenina mediante transcripción *in vitro*, empleando como molde productos de PCR sintetizados con cebadores que incluían promotores de transcripción para las RNA polimerasas T7 o SP6, y secuencias del gen de la CP de PVX o de la GFP, respectivamente (Tabla 4). Las reacciones de transcripción se incubaron a 37°C durante 2 h en un volumen de 30 µl que contenía 250 ng de molde, 1X DIG RNA *labeling mix* (1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP y 0.35 mM DIG-11-UTP) (Roche), 1X del tampón de la RNA polimerasa (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 2 mM espermidina), 40 U de inhibidor de RNasa, 40 U de RNA polimerasa T7 (Roche) o SP6 (Ambion) y agua libre de RNasa. Posteriormente, para degradar el molde de DNA, se añadieron 2 U de DNasa libre de RNasa (Ambion) y se incubó durante 30 min a 37°C. Finalmente, los transcritos se purificaron con el estuche “RNaid Spin” (MP Biomedicals), se desnaturizaron a 95°C durante 10 min y se añadieron a la solución de hibridación comercial ULTRAhyb (Ambion) a una concentración de 10 ng/ml para utilizarlos como ribosondas en las hibridaciones.

Tabla 3. Sondas de RNA marcadas con digoxigenina sintetizadas para detectar los sgRNAs y gRNA de PVX y el mRNA de GFP mediante hibridación Northern.

SONDA	POLARIDAD	POLIMERASA	DETECCIÓN
CP-PVX	(-)	T7	Gen de la cápsida de PVX
GFP	(-)	SP6	Gen de la GFP

2.6. Detección y cuantificación de los sgRNAs y gRNA de PVX, y del mRNA de GFP mediante hibridación *Northern blot*

Las preparaciones de RNAt se separaron en geles de agarosa-formaldehído al 0.9%. Un volumen equivalente a 5 µg de RNAt se diluyó en dos volúmenes de solución desnaturalizante [0.1 ml MOPS 10X (50 mM acetato sódico, 10 mM EDTA, pH 8.0, y 0.2 M MOPS, pH 7.0), 0.35 ml formaldehído 37% y 1 ml formamida], se incubó durante 18 min a 70°C y se enfrió inmediatamente en hielo durante 2 min. A continuación, se añadió el tampón de carga (50% glicerol, 1% azul de bromofenol y 1% cianol de xileno en agua libre de RNasa) y la electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPS 1X a un voltaje constante de 90-100 V durante 3.5 horas.

La transferencia de los RNAs a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) se efectuó en una cubeta de electrotransferencia Hoefer TE-42 (Hoefer Inc.) con tampón fosfato 25 mM, pH 6.45, a una intensidad constante de 250 mA durante 1 h y 1 A durante 14-16 h. Los RNAs transferidos a la membrana se fijaron mediante luz ultravioleta (120 mJ/cm²) por ambas caras de la membrana.

Las membranas se prehibridaron durante 1 h a 68°C con solución de prehibridación [5X SSC (750 mM NaCl y 75 mM citrato sódico, pH 7.0), 0.1% N-laurylsarcosina, 0.02% SDS, 2% reactivo bloqueante (Roche) y 50% formamida] y a continuación se hibridaron con solución de hibridación ULTRAHyb de AMBION conteniendo 10 ng/ml de la ribsonda correspondiente a 68°C durante 14-16 h. Posteriormente, se lavaron dos veces durante 10 min con 2X SSC y 0.1% SDS a temperatura ambiente, y dos veces más con 0.1X SSC y 0.1% SDS a 68°C para eliminar el exceso de sonda. Las membranas se equilibraron lavando dos veces durante 10 min con tampón maleato (100 mM ácido maleico y 150 mM NaCl,

pH 7.5) con 0.3% Tween 20, y dos más con tampón maleato sólo. A continuación se bloquearon con tampón de bloqueo (1% de reactivo bloqueante en tampón maleato) durante 45 min y se incubaron durante 30 min con una dilución 1:10000 del anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) en tampón de bloqueo. Se lavaron dos veces durante 15 min con tampón maleato con 0.3% Tween 20, dos veces con tampón maleato durante 10 min y una con tampón de detección (100 mM Tris-HCl y 100 mM NaCl, pH 9.5). Finalmente, se revelaron con el sustrato quimioluminiscente CSPD *ready-to-use* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7. Fraccionamiento de los extractos de RNAt

Las preparaciones de RNAt obtenidas de hojas y peciolas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente con los diversos virus recombinantes PVX o controles sanos, se fraccionaron para enriquecerlas en mRNAs y siRNAs. Para ello, el RNAt se precipitó con 1/6 volúmenes de LiCl 12M a 4°C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min, el sobrenadante se precipitó nuevamente con 1/20 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C, y el sedimento (enriquecido en mRNAs) se resuspendió en agua libre de RNasa. El precipitado proveniente del sobrenadante de LiCl (enriquecido en siRNAs) se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm y el sedimento obtenido se resuspendió en agua libre de RNasa.

2.8. Detección de siRNAs derivados de PVX mediante hibridación *Northern blot*

Los siRNAs obtenidos en el fraccionamiento se separaron en geles de poliacrilamida al 17% (relación 19:1 de acrilamida:bisacrilamida) con 7 M urea y tampón 1X TBE (100 mM Tris, 90 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, pH 8.3). Para ello, 20-40 µg de cada uno de las preparaciones se mezclaron con un volumen de tampón desnaturante (50% formamida, 50 mM EDTA, 8 M urea, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% de cianol de xileno), se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se enfriaron durante 2 min

en hielo. La electroforesis se efectuó en tampón 1X TBE durante 4 h a un voltaje constante de 200 V.

La transferencia de los siRNAs a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) se realizó como se ha indicado en el apartado 2.4.

Las membranas se prehibridaron como se ha descrito en el apartado 2.4 pero a 42°C y a continuación se hibridaron de igual modo con la ribosonda a 42°C durante 14-16 h. Posteriormente se lavaron dos veces durante 10 min con 2X SSC y 0.1% SDS a temperatura ambiente, y dos veces más con 0.5X SSC y 0.1% SDS a 42°C para eliminar el exceso de sonda. El resto del protocolo se realizó como en el apartado 2.4.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio de la capacidad patogénica de la proteína p20 de CTV en un sistema viral heterólogo *in vivo*

Con el fin de determinar la capacidad patogénica de la proteína p20 de CTV, ésta se expresó *in vivo* como un RNA subgenómico del virus X de la patata (PVX), un sistema genético ampliamente utilizado (Sablowski *et al.*, 1995; Scholthof *et al.*, 1995). Para ello, el gen *p20* de los aislados T36 y T318A se clonó en el vector viral de PVX pPVX202 (Sablowski *et al.*, 1995), y las construcciones obtenidas se inocularon mecánicamente en lotes de plantas de *N. benthamiana* realizando al menos \geq tres bioensayos diferentes. El análisis de la sintomatología a lo largo del tiempo mostró que la expresión de p20, como un sgRNA de PVX (PVX-p20), causa una acentuación y adelanto de los síntomas inducidos por PVX en *N. benthamiana* en comparación con las plantas infectadas con el virus PVX-wt (PVX). Estos síntomas consistieron en arrugamiento y clorosis nervial en las hojas apicales a partir de los 7 dpi, seguido de necrosis apical a partir de los 10 dpi, y la muerte de la planta a los 14 dpi (Tabla 4 y Fig. 5). Es de destacar que la expresión de PVX-p20 del aislado T36 indujo unos síntomas más acusados de necrosis apical y un mayor adelanto de éstos, observables ya a los 10 dpi, que los inducidos por el virus PVX-p20 del aislado T318A (Tabla 4 y Fig. 5).

Tabla 4. Bioensayos de inoculación mecánica de diversos virus PVX en *N. benthamiana*. Se representa el número de plantas infectadas o con necrosis apical respecto al total de plantas inoculadas, según los dpi (D). EXP: experimento; wt: tipo silvestre, C-: planta sana.

					Necrosis apical	
CONSTRUCCIÓN		D7	D10	D13	D13	D15
EXP. 1	PVX-p20 T36	0/5	5/5	5/5	2/5	4/5
	PVX-p20 T318A	0/5	5/5	5/5	3/5	3/5
	PVX	0/5	5/5	5/5	0/5	0/5
	C- SANA	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
					Necrosis apical	
CONSTRUCCIÓN		D7	D10	D14	D10	D14
EXP. 2	PVX-p20 T36	0/4	4/4	4/4	3/4	3/4
	PVX-p20 T318A	0/4	4/4	4/4	1/4	2/4
	PVX	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4
	C- SANA	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Todas las plantas inoculadas con los virus PVX wt presentaron infección sistémica en cada uno de los bioensayos y, al menos el 75% de las inoculadas con PVX-p20-T36 o el 50% de las infectadas con PVX-p20-T318A sufrieron también fuerte necrosis apical y muerte rápida en comparación con las infectadas por la cepa salvaje de PVX (Tabla 4).

Las preparaciones de RNAt de estas plantas se analizaron mediante hibridación *Northern blot* utilizando una sonda del gen de la cápsida de PVX (CP-PVX). La intensificación de síntomas observada en las plantas infectadas con los virus PVX-p20 se correlacionó con un aumento en la acumulación del gRNA y sgRNAs derivados de PVX en comparación con las plantas infectadas por PVX salvaje (Fig. 6, panel superior). Además, la acumulación de sgRNAs de PVX-p20 del aislado T36 fue mucho mayor en las fases avanzadas de la infección (14 dpi), mientras que los de PVX-p20 del aislado T318A se acumularon más al inicio de la infección (Fig. 6, panel superior).

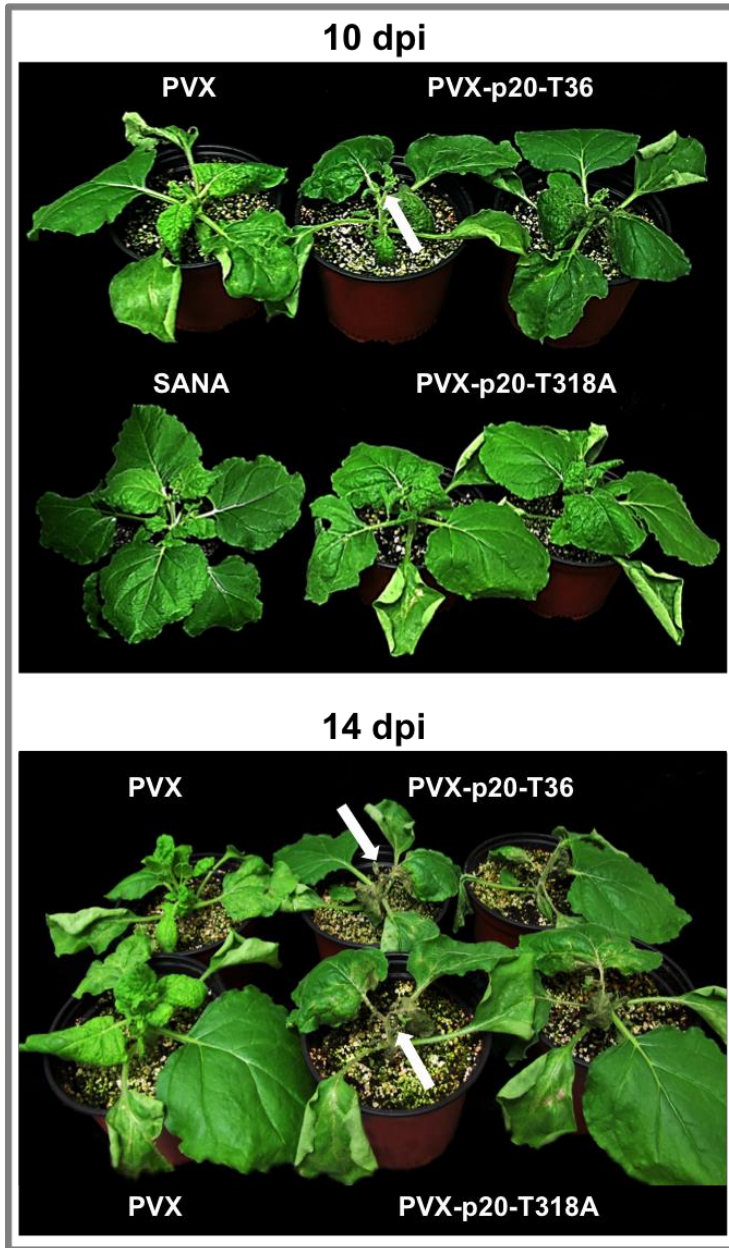


Fig. 5. Intensificación de los síntomas causados por PVX en *N. benthamiana* como resultado de la expresión de p20 como un sgRNA de éste a los 10 y 14 dpi. Las flechas blancas muestran las zonas de necrosis apical.

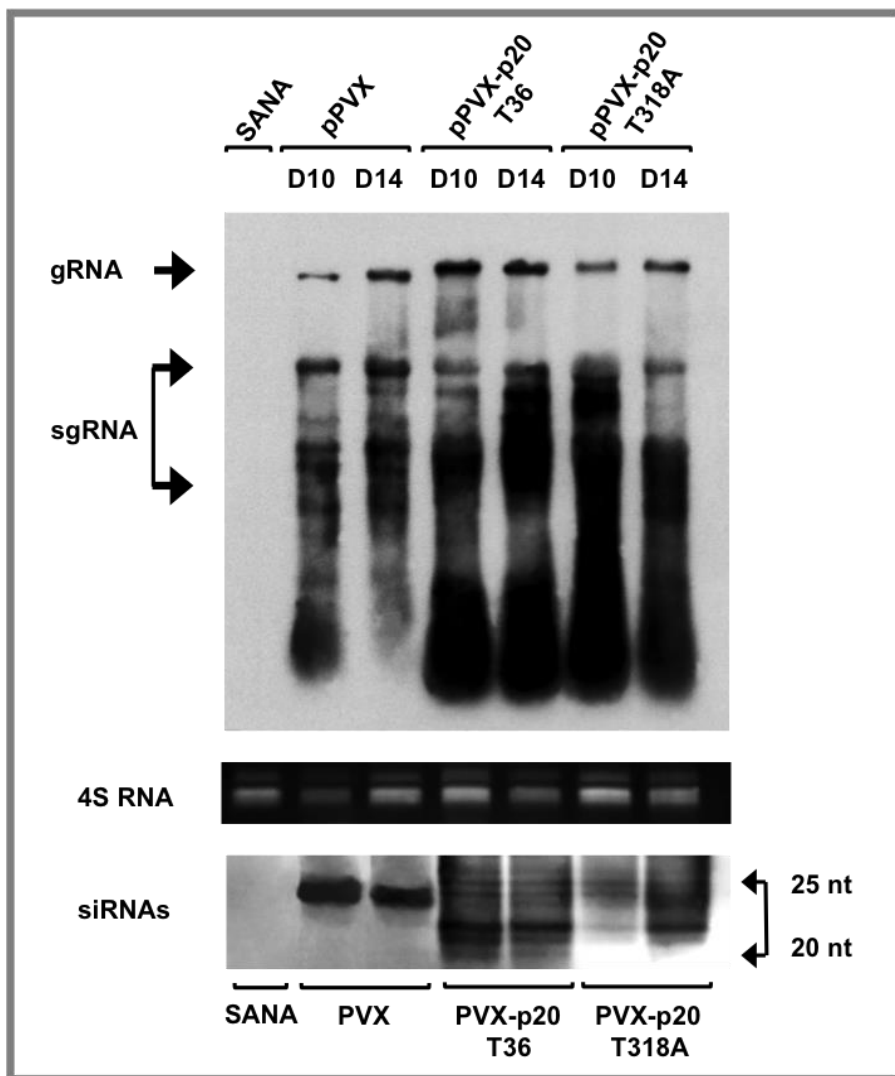


Fig. 6. Análisis *Northern blot* de las preparaciones de RNAt de plantas de *N. benthamiana* sanas (wt) e infectadas por PVX o PVX-p20 a los 10 y 14 dpi. Panel superior, gRNA: RNA genómico, sgRNAs: RNAs subgenómicos de PVX. Panel intermedio: control de carga rRNA 5S. Panel inferior siRNAs: pequeños RNAs derivados de PVX. Hibridación molecular utilizando una ribosonda de la cápsida de PVX (CP-PVX). D10: 10 dpi; D14: 14 dpi; nt: nucleótidos.

Por otra parte, el análisis mediante PAGE de los siRNAs derivados de PVX en las plantas infectadas por los virus PVX silvestre y PVX-p20, mostró una mayor acumulación de siRNAs en las plantas infectadas por el virus silvestre que en las que expresan cualquiera de las dos proteínas p20 de CTV, siendo ésta mayor a 10 dpi que a 14 dpi (Fig. 6, panel inferior). Sin embargo, es relevante destacar que el perfil de siRNAs detectado en las plantas infectadas por el virus silvestre, en las que se observaron principalmente siRNAs de mayor tamaño (24 nt), fue diferente al de las infectadas por cualquiera de los dos virus PVX-p20, en los que se observó una predominancia de los siRNAs pequeños (21-22 nt) y un perfil más complejo de siRNAs de otros tamaños. Por último, la acumulación de los siRNAs de 21 nt fue mayor al inicio de las infecciones causadas por PVX-p20 T36 (Fig. 6, panel inferior 10 dpi), mientras que en las inducidas por PVX-p20 T318A parecía detectarse en fases más avanzadas (Fig. 6, panel inferior 14 dpi).

3.2. Estudio de la capacidad patogénica de la proteína p25 de CTV *in vivo* en un sistema viral heterólogo

Siguiendo la misma estrategia que en el apartado anterior, la expresión de p25 como un sgRNA de PVX no acentuó la patogenicidad de este virus en *N. benthamiana*. Las plantas inoculadas mostraron arrugamiento, aclaramiento de las nerviaduras y mosaico clorótico suave en hojas a los 10 dpi, y enanismo acompañado de una ligera intensificación de los síntomas anteriores a los 15 dpi, tanto en plantas inoculadas con los virus PVX-p25 como en las plantas inoculadas con PVX silvestre (Fig. 7).

Todas las plantas de los bioensayos inoculadas con los virus PVX presentaron infección sistémica, al igual que las inoculadas con los dos virus PVX-p25, independientemente del aislado utilizado (Tabla 5), y en ninguna se observó inducción de necrosis apical y muerte de la planta, al contrario de lo que sucedió con los virus PVX-p20.

Tabla 5. Bioensayos de inoculación mecánica de virus PVX en *N. benthamiana*. Se representa el número de plantas infectadas respecto al total de plantas inoculadas según los dpi (D). EXP: experimento; wt: tipo silvestre, C-: planta sana.

CONSTRUCCIÓN		D7	D10	D14
EXP. 1	PVX-p25 T36	0/4	4/4	4/4
	PVX-p25 T318A	0/4	4/4	4/4
	PVX	0/4	4/4	4/4
	C- SANA	0/2	0/2	0/2
CONSTRUCCIÓN		D7	D10	D14
EXP. 2	PVX-p25 T36	0/4	4/4	4/4
	PVX-p25 T318A	0/4	4/4	4/4
	PVX	0/4	4/4	4/4
	C- SANA	0/2	0/2	0/2

La cantidad de gRNA de PVX detectada mediante *Northern blot* no varió prácticamente a lo largo del tiempo (Fig. 8, panel superior) en los diferentes bioensayos, en concordancia con la patogenicidad similar observada en las plantas inoculadas con PVX y los distintos virus PVX-p25. Por el contrario, la acumulación de sgRNAs de PVX y PVX-p25 del aislado T36 disminuyó en las fases avanzadas de la infección (13 dpi), mientras que la de PVX-p25 del aislado T318A aumentó ligeramente (Fig. 8, panel superior).

Por otro lado, el análisis PAGE para la detección de los siRNAs derivados de las infecciones por PVX mostró una mayor acumulación de éstos a 13 dpi en las infecciones inducidas por PVX salvaje o los virus PVX-p25 (Fig. 8, panel inferior). El perfil de siRNAs detectado en las plantas infectadas por el virus silvestre fue similar al de las infectadas por cualquiera de los dos virus PVX-p25, aunque en el primero se observaron siRNAs de varios tamaños (22-25 nt). Por último, la acumulación detectada de siRNAs de 24 nt pareció ligeramente superior en las infecciones causadas por PVX-p25 T36 con respecto a las causadas por PVX-p25 T318A (Fig. 8, panel inferior).

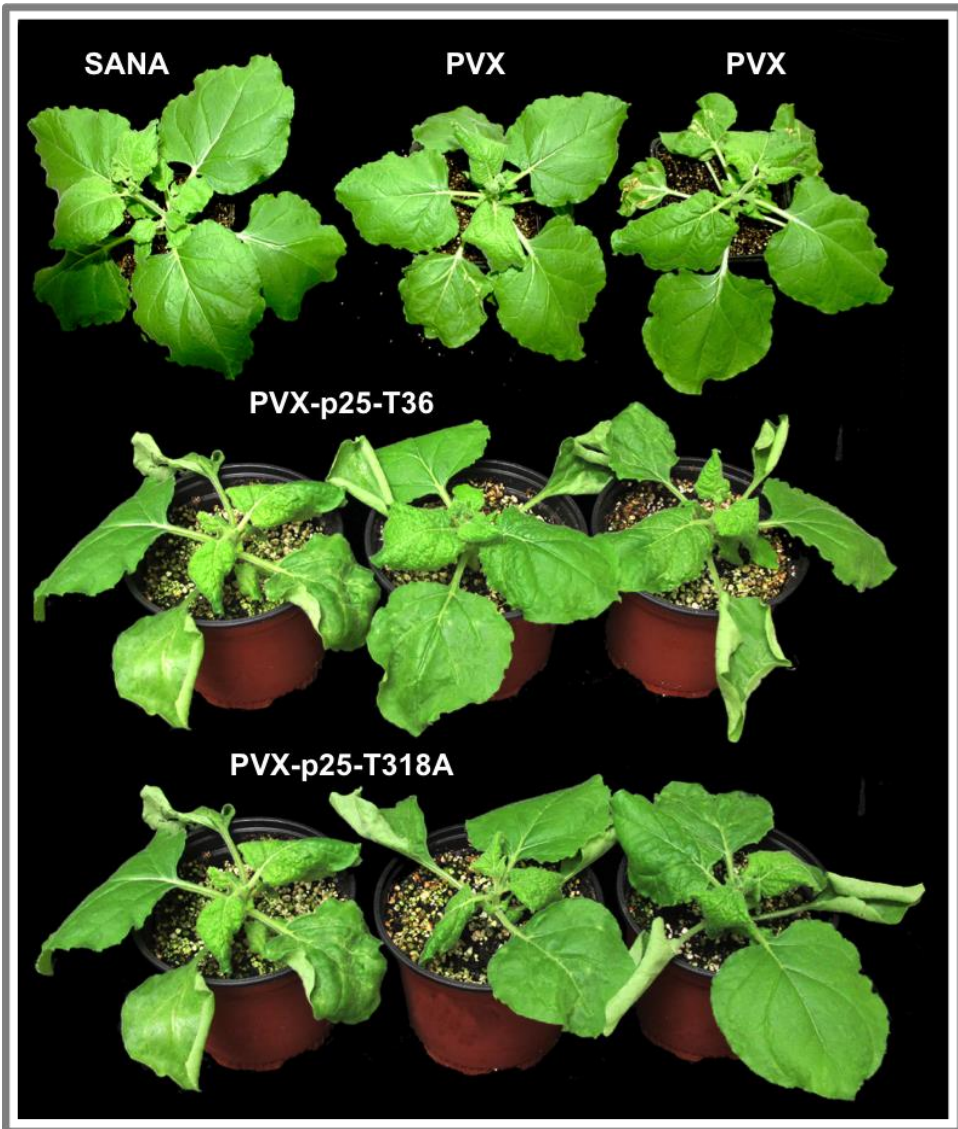


Fig. 7. Síntomas causados por PVX en *N. benthamiana* al expresar la proteína p25 de T36 o de T318A como un sgRNA de éste en comparación con el virus silvestre (10 dpi).

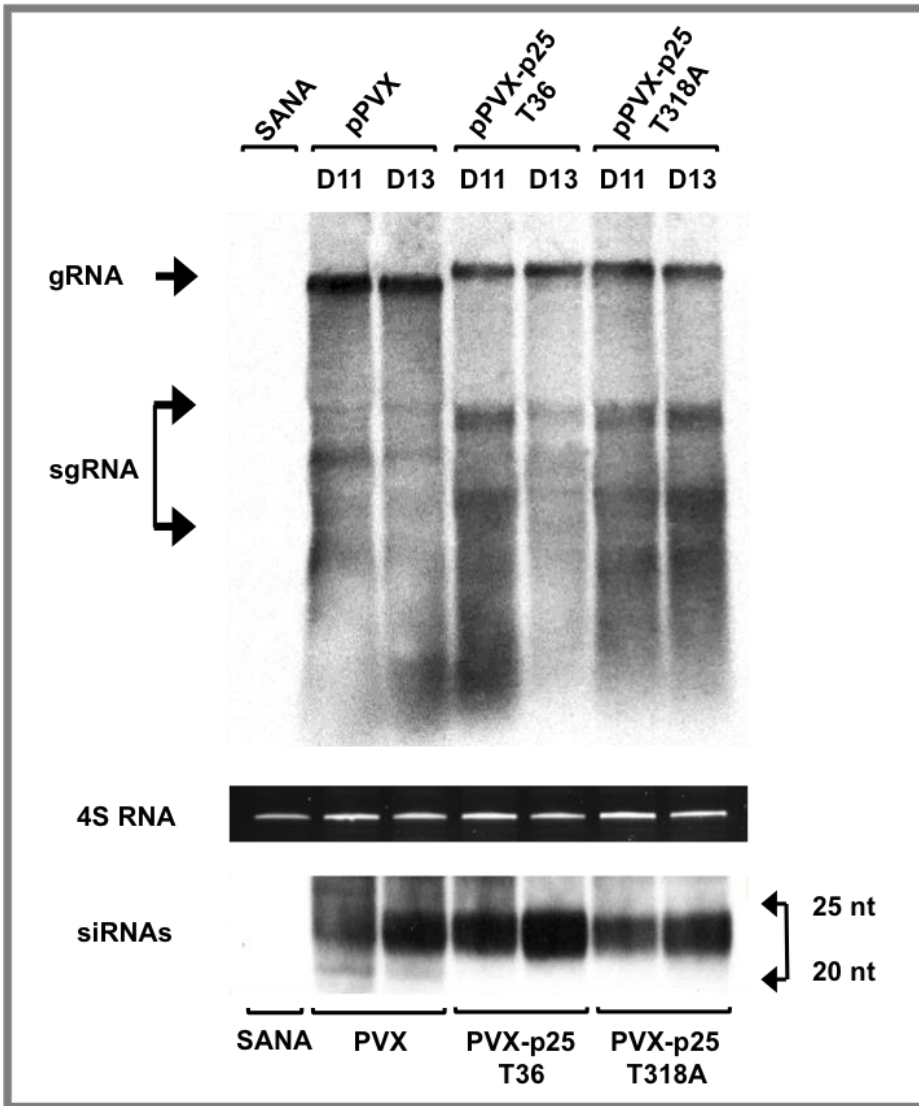


Fig. 8. Análisis *Northern blot* de los extractos de RNA_t obtenidos de plantas de *N. benthamiana* sanas (wt) e infectadas por PVX o PVX-p25 a los 11 y 13 dpi. Panel superior gRNA: RNA genómico, sgRNAs: RNAs subgenómicos de PVX. Panel intermedio: control de carga rRNA 5S, tinción de BrEt. Panel inferior: siRNAs pequeños derivados de PVX. Hibridación molecular utilizando una ribosonda de la cápsida de PVX (CP-PVX). D11: 11 dpi; D13: 13 dpi; nt: nucleótidos.

3.3. Capacidad de silenciamiento génico a larga distancia de la proteína p25 de distintos aislados de CTV

La proteína p25 de CTV-T36 se ha descrito como supresora de silenciamiento génico intercelular mediado por RNA en *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2004). Para comparar la capacidad de supresión de esta p25 con la de otros aislados utilizados en este trabajo (T318A y T385), se generaron construcciones para co-expresar transitoriamente la p25 de los tres aislados (pMOG800-p25) y la proteína GFP (pMOG800-gfp) en plantas de *N. benthamiana* 16c. Esta línea transgénica expresa de forma constitutiva el mRNA de la proteína fluorescente verde (GFP). Como construcciones genéticas control se emplearon el vector vacío (pMOG800) y el vector que expresa la GFP (pMOG800-gfp) en tres bioensayos realizados de forma independiente.

En ausencia de infiltración, o al infiltrar el vector vacío, las plantas 16c mostraron un fenotipo ligeramente verde bajo la luz UV (Fig. 9) al expresar constitutivamente el mRNA de GFP. Cuando se agroinfiltró con el vector de GFP, la expresión transitoria del mRNA-gfp indujo una respuesta de silenciamiento post-transcripcional en estas plantas que generó un mosaico rojo alrededor de las nerviaduras de las hojas superiores debido a la pérdida de la fluorescencia, así como un enrojecimiento general de las hojas (Fig. 9). Esta respuesta se observó en el 70-80% de las plantas infiltradas (Tabla 6), y progresó lentamente desde los 11 hasta los 14-15 dpi. Sin embargo, al co-infiltrar la proteína GFP con la p25 de cada uno de los tres aislados, se observó un ligero retraso en la pérdida de fluorescencia verde de las hojas, así como un decrecimiento en el número de plantas silenciadas según el aislado utilizado: con la p25-T36 la fracción de plantas silenciadas a D15 disminuyó al 33%, mientras que con la p25-T318A lo hizo al 57% y con la p25 de T385 al 50% (Tabla 6 y Fig. 9).

Las preparaciones de RNA_t de las hojas superiores de estas plantas se analizaron mediante *Northern blot* utilizando una sonda del gen *gfp* para detectar su mRNA. La capacidad supresora del silenciamiento de la p25 de cada aislado mostró una correlación con los niveles de mRNA-gfp detectados en las plantas que expresan esta proteína de cada uno de los tres aislados.

Tabla 6. Bioensayos de supresión del silenciamiento génico en plantas de *N. benthamiana* línea 16c infiltradas con las proteínas supresoras p25 de CTV-T36, T318A y T385 y GFP (junto a los controles correspondientes). Se representa el número de plantas que muestran pérdida de fluorescencia verde en las hojas superiores (silenciadas) respecto al total de plantas agroinfiltradas según los dpi (D). EXP: experimento.

		CONSTRUCCIÓN	D10	D13	D15
EXP. 1		GFP + p25 T36	0/7	2/7	2/7
		GFP + p25 T318A	0/7	3/7	5/7
		GFP + p25 T385	0/7	4/7	4/7
		Vector GFP	0/7	3/7	5/7
		Vector vacío	0/2	0/2	0/2
		CONSTRUCCIÓN	D11	D13	D15
EXP. 2		GFP + p25 T36	2/7	2/7	4/7
		GFP + p25 T318A	3/7	3/7	4/7
		GFP + p25 T385	1/7	3/7	3/7
		Vector GFP	4/7	4/7	5/7
		Vector vacío	0/2	0/2	0/2
		CONSTRUCCIÓN	D10	D13	D15
EXP. 3		GFP + p25 T36	0/7	0/7	1/7
		GFP + p25 T318A	0/7	2/7	3/7
		Vector GFP	0/5	3/5	4/5
		Vector vacío	0/1	0/1	0/1

La mayor cantidad de mRNA-*gfp* se detectó en plantas infiltradas con la p25-T36, tanto a 13 como a 15 dpi, sugiriendo una capacidad de supresión superior a la ejercida por la p25-T318A y la de T385 (Fig. 10). La hibridación también mostró una capacidad de supresión de p25-T385 ligeramente inferior a la de p25-T318A (Fig. 10). El mRNA-*gfp* apenas se detectó en las plantas control infiltradas con GFP a 13 dpi, debido al silenciamiento del transgen, mientras que a 15 dpi ya se observó (Fig. 10), posiblemente porque la GFP dejara de expresarse de forma transitoria y su silenciamiento ya no ocurriera.

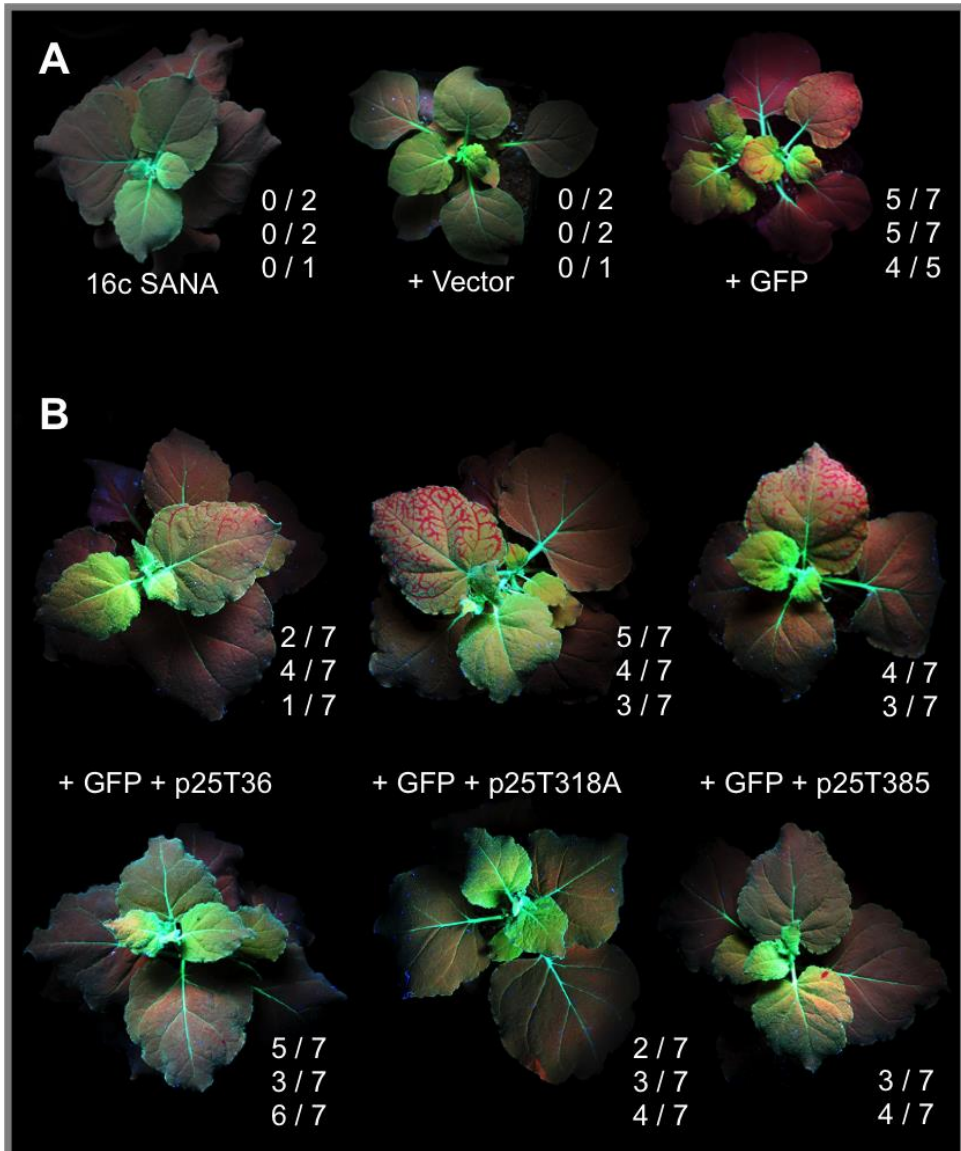


Fig. 9. Plantas de *N. benthamiana* 16c sin inocular, expresando el vector vacío o el transgén *gfp* (A) (de izquierda a derecha, respectivamente), y co-expresando la GFP y la p25 de los aislados T36, T318A o T385 (B). Se indica el número de plantas que presentan silenciamiento del gen *gfp* (entramado rojo de las hojas superiores, panel B plantas del parte superior) o en las que se ha suprimido su silenciamiento al expresar las diferentes p25 (panel B, parte inferior), respecto al total de infiltradas en 3 bioensayos independientes (15 dpi).

Diversos experimentos encaminados a detectar y analizar los siRNAs de GFP en las plantas de estos bioensayos resultaron siempre negativos.

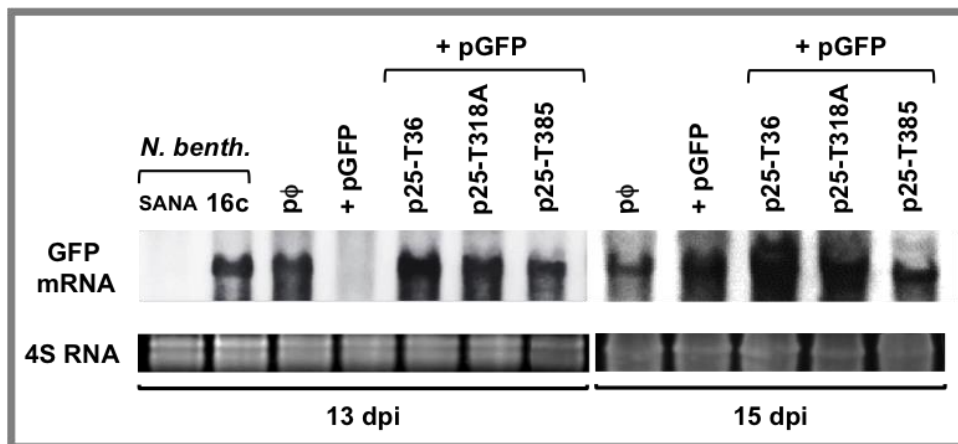


Fig. 10. Análisis *Northern blot* del RNA_t extraído de las hojas superiores de plantas de *N. benthamiana* sin agroinfiltrar (*wt* y 16c) o infiltradas con las distintas combinaciones de vectores que expresan las p25 de CTV a los 13 y 15 dpi o el vector vacío (pφ). El panel superior muestra los niveles de acumulación de los mRNA de *gfp*, mientras que el inferior los controles de carga rRNA 5S teñidos con bromuro de etidio. Hibridación molecular empleando una ribosonda del gen *gfp*.

4. DISCUSIÓN

Uno de los mecanismos de defensa más efectivos que han desarrollado las plantas es el silenciamiento génico mediado por RNA, que las capacita a contrarrestar las infecciones causadas por sus principales patógenos, entre los cuales se encuentran los virus. A su vez, los virus también han adquirido mecanismos para evadir esta defensa y conseguir infectar a su huésped. En CTV, se han descrito tres proteínas supresoras del silenciamiento génico: p25, que actúa a nivel intercelular, p23 a nivel intracelular y p20 a ambos niveles (Lu *et al.*, 2004). De las tres la más estudiada ha sido p23, ya que es una proteína única dentro del género *Closterovirus*, y de la que se ha descrito su estructura, localización subcelular y función patogénica (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). El estudio actual sobre la capacidad supresora a larga distancia de p25 de los aislados T36,

T318A y T385 de CTV ha mostrado, en líneas generales, que esta proteína es un supresor débil a larga distancia en *N. benthamiana*. Sin embargo, la comparación de su función supresora en tres aislados que difieren en sus características patogénicas, ha permitido determinar algunas diferencias. Más específicamente, la observación de la fluorescencia en las plantas de *N. benthamiana* 16c donde se expresaban la GFP y la p25 reveló que, a 15 dpi, se retrasó la pérdida de fluorescencia y que el número de plantas silenciadas decreció según el aislado del que provenía p25: una disminución que llegó al 33% utilizando la p25-T36, al 57% con la p25-T318A y al 50% con la p25-T385.

Estas observaciones se correlacionaron con los niveles de acumulación del mRNA de GFP analizado por *Northern blot*, que mostraron en las plantas infiltradas con p25-T36 la mayor cantidad de mRNA, sugiriendo una mayor capacidad de supresión del silenciamiento de ésta proteína. Además, los niveles de acumulación observados sugieren una capacidad de supresión de p25-T318A ligeramente superior a la de p25-T385.

Los resultados confirman que p25 es una proteína supresora de silenciamiento génico a larga distancia, tal y como se había descrito con anterioridad (Lu *et al.*, 2004), aunque muy débil, lo que no debe extrañar si consideramos que es una proteína estructural clave del virión y que CTV se mueve a larga distancia como un “viral device” (Alzhanova *et al.*, 2001; Dolja, 2003; Napuli *et al.*, 2003). Con relación a otras proteínas supresoras del silenciamiento génico descritas en plantas, como p19 de TBSV o HC-Pro de TEV (Voinnet *et al.*, 1999; Anandalakshmi *et al.*, 2000), la capacidad de p25 de CTV es considerablemente menor, ya que la supresión ejercida es parcial, afecta solo a parte de las plantas y se retrasa mucho en el tiempo.

Los supresores del silenciamiento de los virus pueden interferir en distintos niveles de la ruta de silenciamiento (Moissiard y Voinnet, 2004; Díaz-Pendón y Ding, 2008; Valli *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que los pequeños RNAs derivados de CTV se acumulan en grandes cantidades en los cítricos infectados (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011) y que la acumulación de siRNAs derivados de un transgén de CTV en lima Mexicana no es suficiente para proteger a este cítrico frente al virus (López *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2012), parece poco probable que p25 se una a los precursores

de dsRNA y bloquee su procesamiento por DICER; más bien cabría pensar que el mecanismo de silenciamiento consistiría en la interacción, reclutamiento o inactivación de una o más proteínas AGO. En este sentido hay que destacar que, por ejemplo AGO4, es una proteína para la que se asumen únicamente funciones nucleares basándose en su localización subcelular y su conocida función en la metilación del DNA (Xie *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). Tal como se ha descrito en el Capítulo 1 de esta tesis, tanto p20 como la p25 de determinados aislados de CTV tienen una localización mayoritariamente nuclear. Para valorar la hipótesis de una interacción entre alguno de los supresores de CTV, como p25, y proteínas AGO, se requiere un estudio más profundo. Un primer análisis proteómico a este respecto se presenta en el Capítulo 3 de esta memoria.

Dentro del grupo de los virus de plantas se han descrito otras proteínas de cubierta que, al igual que p25, también actúan como supresoras del silenciamiento génico. Ejemplo son las CP del virus del arrugamiento del nabo (TCV) y del virus de las manchas cloróticas en anillo del hibisco (HCRSV), ambos del género *Carmovirus*. La primera, también conocida como p38, es un fuerte supresor del silenciamiento (equiparable a HC-Pro de TEV) y actúa a distintos niveles durante las primeras etapas del proceso de silenciamiento: se une a los dsRNAs derivados del virus impidiendo que se generen los siRNAs, inhibe la acción de DICER y, también de AGO1, proteína encargada de unirse a los siRNAs de 21-22 nt derivados de TCV (Qu *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003; Deleris *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2010). Por otra parte, la CP de HCRSV es también un fuerte supresor del silenciamiento génico, pero en este caso la interferencia en la ruta de silenciamiento se encuentra aguas abajo de la proteína RDR6, encargada de sintetizar dsRNA a partir de ssRNA para amplificar la señal del silenciamiento (Meng *et al.*, 2006, 2008). Las diferencias entre estas dos CP y p25 de CTV son evidentes, no sólo por su distinta capacidad de suprimir el silenciamiento, sino también por los diferentes mecanismos de acción que presentan.

Como se ha indicado anteriormente, muchas proteínas supresoras del silenciamiento génico son, a su vez, los determinantes de patogenicidad virales (Moissiard y Voinnet, 2004; MacDiarmid *et al.*, 2005). En este sentido, el supresor p23 de CTV

es el único determinante de patogenicidad descrito hasta el momento para este virus y actúa como un fuerte supresor del silenciamiento intracelular en *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2004; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo han revelado que mientras p20 sí parece actuar como otro determinante de patogenicidad de CTV similar a p23, p25 no. La expresión de estos genes como un sgRNA de PVX (Sablowski *et al.*, 1995; Scholthof *et al.*, 1995) infectando plantas de *N. benthamiana* mostró resultados dispares para cada uno de ellas. La expresión de p20 (T36 o T318A) provocó un adelanto en la aparición de los síntomas de PVX, induciendo arrugamiento y clorosis nervial en las hojas apicales a los 7 dpi, seguido de necrosis apical y muerte de la planta a los 14 dpi. Estos síntomas fueron más acusados con PVX-p20-T36 que con el homólogo de T318A, induciendo el primero necrosis apical y muerte del 75% de las plantas infectadas en tan sólo 10-12 días. Estos resultados son muy similares a los inducidos por los virus PVX-p23-T36 en las mismas condiciones (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), sugiriendo que p20, al igual que p23, sería un determinante de patogenicidad de CTV en este huésped y en cítricos (Leandro Peña, comunicación personal).

Por lo tanto, el comportamiento patogénico de ambos supresores de CTV es fuerte y similar. Este mismo fenómeno sucede cuando se expresa el supresor p19 de TBSV como sgRNA de PVX en plantas de *N. benthamiana*, en las que se observan lesiones necróticas en las hojas inoculadas a 7 dpi, seguido de necrosis apical y muerte (Scholthof *et al.*, 1995). De forma similar, la expresión del supresor 2b de CMV también intensifica los síntomas de PVX, causando un notable retraso del crecimiento y la deformación de las hojas, pero con sin que la planta llegue a morir (Lucy *et al.*, 2000), lo que sí ocurre con su homólogo 2b del virus de la aspermia del tomate (TAV) (Li *et al.*, 1999).

La intensificación de los síntomas en las plantas infectadas por PVX-p20 va acompañada de un aumento en la acumulación del gRNA y sgRNAs de PVX en comparación con la del virus silvestre. Hay que indicar, no obstante, que este aumento es inferior al detectado en las infecciones causadas por PVX expresando otros supresores como p23-CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), p38-TCV (Thomas *et al.*, 2003), p22-ToCV (Cañizares *et al.*, 2008) o HC-Pro-TEV (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

Además, en el perfil de siRNAs detectado en las plantas infectadas por PVX-p20 se observó una predominancia de los siRNAs pequeños (21-22 nt). Esta acumulación fue mayor durante las primeras etapas de la infección por PVX-p20-T36, mientras que en las infecciones por PVX-p20-T318A la acumulación fue superior en las etapas avanzadas. Este perfil de siRNAs es similar al observado cuando se expresa p23 como sgRNA de PVX (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), por lo que el mecanismo de acción de ambos supresores pudiera ser similar. Como se ha comentado anteriormente, durante las infecciones por CTV, los cítricos acumulan grandes cantidades de pequeños RNAs derivados del virus (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011), por lo que se podrían sugerir dos posibles mecanismos de acción de p20. El primero consistiría en bloquear la metiltransferasa HEN1, impidiendo así la modificación de los siRNAs y, como consecuencia, la imposibilidad de ser cargados en las proteínas AGO. Este modo de acción es uno de los que se ha propuesto por ejemplo para el supresor HC-Pro de potyvirus (Lozsa *et al.*, 2008; Jamous *et al.*, 2011). El segundo mecanismo inhibiría AGO1 y/o AGO2, evitando que carguen los siRNAs generados en la ruta de silenciamiento impidiendo la degradación del gRNA viral. La unión e inactivación de AGOs también se ha descrito para los supresores del silenciamiento p0 de enamovirus (Fusaro *et al.*, 2012), p38 de TCV (Azevedo *et al.*, 2010; Jin y Zhu, 2010) y 2b de cucumovirus (Zhang *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013). Estas hipótesis deberán ser comprobadas en futuros estudios de interacción entre p20 y los componentes del proteoma de la planta.

Por el contrario, las plantas infectadas con los vectores PVX-p25 de los aislados T36 y T318A sólo mostraron enanismo, arrugamiento, aclaramiento de las nervaduras y mosaico clorótico en las hojas. Estos síntomas se intensificaron ligeramente a los 15 dpi de igual forma que los inducidos por el virus PVX silvestre, pero en ningún caso se observó necrosis apical ni muerte de las plantas. Además, la detección del gRNA de PVX reveló que su cantidad prácticamente no variaba a lo largo del tiempo, por lo que la patogenicidad de PVX-p25 y de PVX silvestre son similares. En cambio, los niveles de sgRNAs sí que cambiaron a lo largo del tiempo, observándose una disminución en PVX-p25-T36 y un ligero aumento en PVX-p25-T318A en las fases avanzadas de la infección.

Así pues, la expresión de p25 *in vivo* en un sistema viral heterólogo no aumenta la patogenicidad inducida por PVX, al contrario de lo descrito previamente para los otros dos supresores de silenciamiento de CTV, p23 (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013) y p20 (este capítulo), por lo que cabe descartar la acción de p25 como determinante de patogenicidad de CTV. Este resultado concuerda con lo observado previamente en plantas transgénicas de lima mexicana que expresan la p25 de T36 de forma constitutiva (Domínguez *et al.*, 2002).

Durante la expresión de PVX-p25 pareció observarse una ligera predominancia de los siRNAs de 24 nt, y una acumulación ligeramente superior en las infecciones causadas por PVX-p25-T36 con respecto a las causadas por PVX-p25-T318A. La acumulación de este tipo de siRNAs se detecta también durante la expresión del supresor del silenciamiento p0 de Polerovirus, para el cual se ha descrito un mecanismo consistente en la desestabilización de las AGOs mediante su degradación (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Mangwende *et al.*, 2009; Csorba *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; Kozłowska-Makulska *et al.*, 2010; Derrien *et al.*, 2012; Fusaro *et al.*, 2012; Hendelman *et al.*, 2013; Delfosse *et al.*, 2014). La formación de siRNAs de 24 nt se debe, principalmente, a la acción de las proteínas RDR2 y DCL3 que forman parte de la ruta de silenciamiento. Una vez sintetizados, estos siRNAs son cargados en la proteína AGO4, que media la metilación del DNA vírico impidiendo su expresión. Este tipo de silenciamiento génico es el que usan las plantas frente a virus de DNA como los de la familia *Geminiviridae* (Raja *et al.*, 2008), aunque también existe un supresor del silenciamiento que pertenece a un virus de RNA y que interacciona e inhibe la función de AGO4: la proteína 2b de CMV (Hamera *et al.*, 2012). En el caso de p25, en el Capítulo 3 de esta memoria al analizar complejos proteína virus-proteína del huésped *N. benthamiana* detectamos a AGO4 como un interactor potencial aunque débil. Estudios posteriores en nuestro grupo realizados por Neus Gómez (tesis doctoral en escritura, Gómez *et al.*, datos no publicados) han mostrado la interacción potencial entre p25 y esta proteína, por lo que sugerimos que la acumulación de siRNAs de 24 nt observada en los experimentos con los virus PVX-p25 podría deberse a la inhibición total o parcial de AGO4 a través de la formación de un complejo AGO4-p25. Se

desconoce, por el momento, la implicación que puede tener este tipo de interacción al tratarse de un virus de RNA, pero pudiera darse el caso de que la hipometilación de ciertos genes de la planta favorezca la replicación e invasión de tejidos por parte del virus.

CAPÍTULO III

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución diversos mecanismos para reconocer y defenderse de los distintos tipos de patógenos. Entre estos mecanismos se encuentra la resistencia mediada por genes R, la respuesta hipersensible (HR) y necrótica, la resistencia sistémica adquirida (SAR) o el silenciamiento génico mediado por RNA, uno de los más estudiados y conocidos (información ampliada en los apartados 4.1 y 4.2 de la Introducción general). A su vez, los virus, y en general cualquier tipo de patógeno, también han desarrollado diferentes mecanismos para evadir los sistemas de defensa de las plantas y conseguir una infección exitosa, induciendo, en la mayoría de los casos, una sintomatología característica que dependerá del tipo de interacciones que se produzcan entre ambas entidades.

Las interacciones virus-huésped son esenciales durante todo el ciclo vital del virus. Su reducido genoma, que sólo les permite sintetizar un pequeño número de proteínas, hace que requieran una gran cantidad de factores proteicos del huésped para llevar a cabo funciones como la replicación, el movimiento a corta y larga distancia o la patogénesis (Fig. 1), y así poder completar su ciclo de vida con éxito (Whitham y Wang, 2004; Boevink y Oparka, 2005).

En este contexto, muchos virus de RNA usan diversos factores de transcripción del huésped como parte de su complejo de replicación. Los tobamovirus por ejemplo, utilizan los factores de elongación 1A (eEF1A), eEF1B y eIF3 (Hwang *et al.*, 2013; Osman y Buck, 1997). De igual modo, miembros de la familia *Tombusviridae* y *Luteoviridae* interaccionan con diversos eIFs para reclutar los ribosomas y poder traducir sus mRNAs. La proteína VPg de potivirus requiere el factor de iniciación 4E (eIF4E) del huésped para la traducción de sus proteínas (Torrance *et al.*, 2006). Así, los virus han desarrollado diversas estrategias evolutivas para utilizar y controlar la maquinaria traduccional de sus huéspedes (para un review ver Miras *et al.*, 2017). De hecho, el rango de huésped de un virus puede depender de su habilidad para traducir eficientemente su mRNA usando los factores del huésped (Truniger *et al.*, 2008; Miras *et al.*, 2017). Se ha demostrado que cambios en las interacciones específicas entre determinadas proteínas virales y factores concretos de la planta, como el eIF4E, son responsables de la

resistencia o susceptibilidad a la infección viral (Nieto *et al.*, 2006; Miras *et al.*, 2017).

Además de usar los factores del huésped, los virus también pueden alterar las funciones y la composición de las células que infectan para aumentar sus niveles de replicación, ya sea incrementando la expresión de proteínas necesarias para su ciclo infeccioso, inhibiendo el sistema de defensa, modificando la composición lipídica de la membrana de las células infectadas, o incluso alterando las rutas hormonales del huésped (Ahlquist *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Lodha y Basak, 2012; Whitham *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2011). Así, la RNA polimerasa 2a del virus del mosaico del bromo (BMV) requiere una interacción con YDJ1 (co-chaperona HSP40 tipo 1) para incrementar su replicación gracias a la capacidad de síntesis de cadenas negativas de su gRNA (Ahlquist *et al.*, 2003). Además, la interacción de las polimerasas 1a y 2a de este virus con OLE1 (Acil-CoA desaturasa 1) interviene en la modificación de las membranas aportando más ácidos grasos insaturados con el fin de favorecer su replicación (Schwartz *et al.*, 2004). Por otra parte, la proteína P2 del virus del enanismo del arroz (RDV) interacciona con algunas oxidasas celulares, reduciendo así la síntesis de giberelinas y fitoalexinas, lo que induce la aparición del síndrome de enanismo y favorece la replicación del virus (Zhu *et al.*, 2005).

Se ha descrito ampliamente la intervención de las proteínas del choque térmico (*Heat shock proteins*, HSPs), proteínas muy conservadas y ubicuas que actúan como citoprotectores y chaperonas moleculares, en procesos celulares tan importantes como la replicación, ensamblaje del virión y movimiento intracelular, especialmente de las HSP70 y HSP90 (Mayer, 2005; Dufresne *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Hafren *et al.*, 2010; Gorovits *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

Asimismo, la interacción de proteínas virales con las del citoesqueleto de las células, es esencial para la localización de las primeras en los compartimentos celulares adecuados (y poder llevar a cabo su función correctamente), y para el movimiento viral intra e intercelular. En este contexto, virus como el del mosaico del tabaco (TMV) o el del mosaico del nabo (TuMV) emplean los filamentos de miosina para tráfico intracelular y para moverse a través de los plasmodesmos (Agbeci *et al.*, 2013; Amari *et al.*, 2014), mientras

que otros, como el virus del mosaico de la haba de soja (SMV), también hacen uso de los filamentos de actina para moverse por el interior de la célula (Lu *et al.*, 2015). Y este último mecanismo también se ha descrito para el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), cuya proteína de movimiento p7B requiere los filamentos de actina para localizarse en los plasmodesmos y propagar la infección a otras células (Genovés *et al.*, 2010).

La interacción con proteínas de defensa de la planta, especialmente las relacionadas con el sistema de silenciamiento génico mediado por RNA, también resulta importante para que los virus sean capaces de completar su ciclo biológico con éxito. Así, la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) interacciona con AGO4, implicada en la metilación del DNA dirigida por RNA, inhibiendo su actividad de defensa frente a virus (Hamera *et al.*, 2012). Otra proteína que interacciona con una AGO, en este caso con AGO1, es la proteína de la cápsida (CP) del virus de la mancha anular del tomate (ToRSV), uniéndose a ella e impidiendo la degradación del RNA (Karran y Sanfaçon, 2014). Por otra parte, la interacción de la proteína P6 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con DRB4, también implicada en la ruta de silenciamiento génico, induce un cambio de localización subcelular o conformacional en ésta que afecta a su capacidad de unir dsRNAs, favoreciendo la replicación viral (Haas *et al.*, 2008).

Para entender cómo funcionan las proteínas virales dentro de las células infectadas de las plantas y así poder caracterizar sus funciones e interacciones con proteínas del huésped, se han desarrollado en los últimos años diferentes técnicas que analizan dichas interacciones. Entre ellas se pueden destacar el sistema del doble híbrido de levadura (*Yeast two-hybrid system* o Y2H), la co-inmunoprecipitación o la complementación bimolecular fluorescente (BiFC), todas ellas descritas previamente en el apartado 4.4 de la Introducción general.

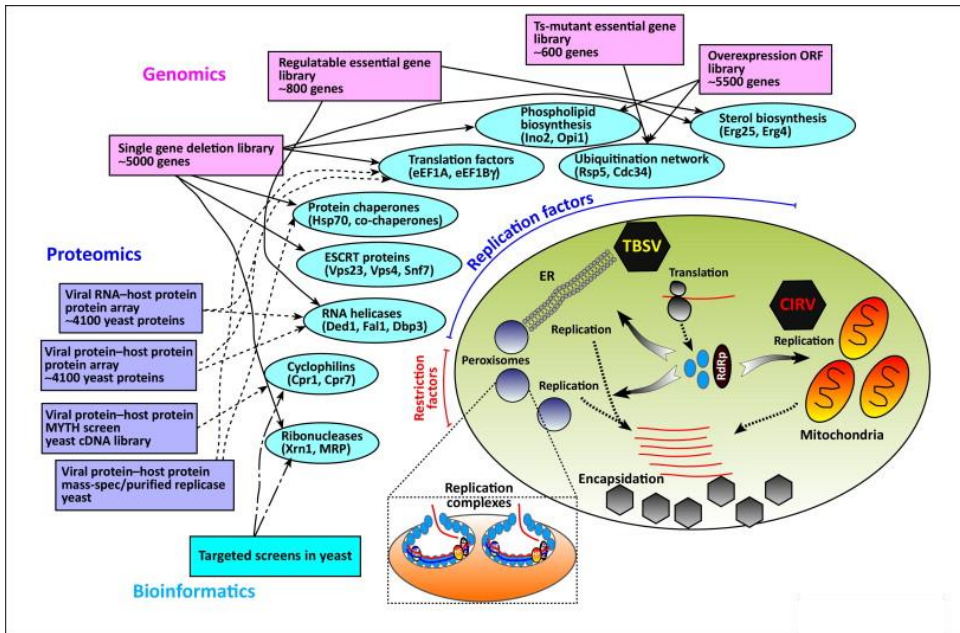


Fig. 1. Ejemplo del ciclo biológico del virus TBSV (virus del enanismo ramificado del tomate) y CIRV (virus de la mancha anular del clavel italiano) donde se reflejan las complejas interacciones con diversos factores del huésped necesarios para poder completarlos. También se muestran las disciplinas encargadas del estudio de estas interacciones en levadura. Tomado de Nagy *et al.*, 2014.

Así se han conseguido identificar un gran número de factores de la planta que interactúan con proteínas virales, como por ejemplo las proteínas TGB12K (proteína 12K del bloque triple de genes), las de movimiento y TGBp1 del virus X de la patata (PVX) con proteínas TIP (proteínas inducibles por temperatura), NbMPB2Cb (proteína de unión 2C a MP30) y EF1B (factor de elongación 1B), respectivamente (Fridborg *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2015), la proteína de movimiento del virus de las manchas cloróticas de la hoja de la manzana (ACLSV) con hidrolasas, fosfatasa, ligasa, peroxidasas, ... (He *et al.*, 2015), la proteína de movimiento de CMV con una oxidasa del apoplasto (Kumari *et al.*, 2016) o la proteína P3 de potivirus con la proteína RubisCO de plantas (Lin *et al.*, 2011). Algunos ejemplos más se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Breve listado de algunas de las interacciones entre proteínas virales y del huésped que se han descubierto empleando las técnicas descritas anteriormente.

VIRUS	PROTEÍNA VIRAL	PROTEÍNA HUÉSPED	TÉCNICA	REFERENCIAS
BaMV	CP	PNbMTS1	Y2H	Lee <i>et al.</i> , 2006; Cheng <i>et al.</i> , 2009
BMV	1a	RHPs	co-IP	Diaz <i>et al.</i> , 2010
BMV	2a	YDJ1		Tomita <i>et al.</i> , 2003
CMV	2a	CBL-interacting protein kinase 12	Y2H	Kang <i>et al.</i> , 2012
CNV	p33	HSP70	co-IP	Serva y Nagy, 2006
RCNMV	p27	ARF1	co-IP	Hyodo <i>et al.</i> , 2013
RSV	RdRp	HSP20	Y2H, BiFC, co-IP	Li <i>et al.</i> , 2015
SMV	P3N-PIPO	GOS12	Y2H, BiFC	Song <i>et al.</i> , 2016
TBSV	p92	GAPDH	BiFC, co-IP	Wang y Nagy, 2008; Huang y Nagy, 2011
TBSV	p33	PEX19	co-IP	Pathak <i>et al.</i> , 2008
TMV	MP	γ -tubulina, EB1	co-IP	Ashby <i>et al.</i> , 2006; Brander <i>et al.</i> , 2008; Sambade <i>et al.</i> , 2008
ToMV	CP	IP-L	Y2H	Li <i>et al.</i> , 2005

BaMV: virus del mosaico del bambú; BMV: virus del mosaico del bromo; CMV: virus del mosaico del pepino; CNV: virus de la necrosis del pepino; RCNMV: virus del mosaico necrótico del trébol rojo; RSV: virus del rayado del arroz; SMV: virus del mosaico de la haba de soja; TBSV: virus del enanismo ramificado del tomate; TMV: virus del mosaico del tabaco; ToMV: virus del mosaico del tomate; HSP70: proteína de choque térmico 70; RHPs: proteínas de homología del reticulón; YDJ1: proteína de la familia de HSP40; CBL: calcineurina tipo B; eIF4E: factor de elongación 4E; ARF1: factor 1 de ribosilación del ADP; HSP20: proteína de choque térmico 20; GOS12: Golgi SNARE 12; GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; PEX19: factor 19 de biogénesis del peroxisoma; EB1: proteína 1 de unión final a microtúbulos; IP-L: proteína de interacción L; Y2H: doble híbrido de levadura; co-IP: co-inmunoprecipitación; BiFC: complementación bimolecular fluorescente.

Las CPs han sido ampliamente estudiadas en las interacciones virus-planta. Esto es debido a que son proteínas estructurales importantes que recubren el genoma de los virus

interviniendo en el proceso de entrada y salida de las células, y en su movimiento en la planta, además de sintetizarse en gran cantidad durante la infección celular. Asimismo, las CPs pueden regular la expresión de los genes virales, la síntesis de RNA y las interacciones virus-huésped a lo largo de todo el ciclo biológico del virus (Ni y Kao, 2013). Así por ejemplo, las CPs de potivirus, además de ser claves para el ensamblaje del virión, intervienen en el movimiento célula-célula y a larga distancia (Dolja *et al.*, 1994), y para ello han de interactuar con gran cantidad de factores del huésped (Ivanov y Mäkinen, 2012). Estas interacciones se producen a muchos niveles, de modo que durante las primeras etapas de la infección, la CP de los potivirus interactúa con la co-chaperona CPIP de HSP70 para permitir la replicación y traducción eficaz de su genoma, evitando una formación prematura de los viriones (Hofius *et al.*, 2007; Hafren *et al.*, 2010). Asimismo, la interacción de esta proteína con la DnaJ de *N. benthamiana*, una pequeña chaperona, puede afectar los niveles de replicación y el movimiento viral (Cho *et al.*, 2012).

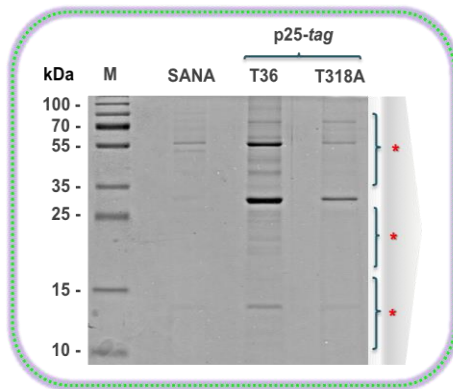
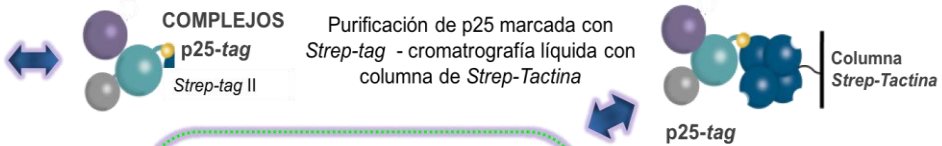
Una de las técnicas más utilizadas para abordar el estudio de la interacción de proteínas de virus con las de su huésped, es la llamada AP-MS (del inglés *Affinity Purification – Mass Spectroscopy*) (Dunham *et al.*, 2012), que consiste en la co-inmunoprecipitación de complejos proteína-proteína (PIP). Para ello, la proteína de estudio se fusiona con un péptido pequeño que presenta una gran afinidad por las moléculas adheridas a una columna de purificación (cromatografía líquida), de modo que queda retenida en la columna junto con las proteínas del huésped con las que interactúa. A continuación, los complejos purificados son analizados mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para identificar las secuencias polipeptídicas. En este capítulo se ha empleado un sistema de este tipo, basado en el principio de unión de la biotina con la estreptavidina, para unir nuestra proteína de estudio, la p25 de CTV, a un pequeño péptido de 8 aminoácidos llamado *Strep-tag* II (que actuaría como la biotina). Los complejos formados por la p25-*tag* con las proteínas unidas del huésped, se purifican utilizando una columna de resina con moléculas de *Strep-Tactina* (que actuaría como la estreptavidina), que presentan una gran afinidad por la *Strep-tag* II (Fig. 2). Los complejos purificados se analizan por LC-

MS/MS y se secuencian, identificando las proteínas problema mediante un extenso análisis bioinformático.

Expresión transitoria en *N. benthamiana* de proteínas p25-Strep-tag



Unión específica de p25 *in vivo* con proteínas del huésped – Formación de PIPs



**ESPECTROMETRÍA DE MASAS
ESTUDIO INTERACTÓMICO**

Secuenciación y análisis de posibles proteínas interactoras

Fig. 2. Esquema resumen de la técnica AP-MS en el que se detalla el procedimiento seguido para identificar las proteínas de *N. benthamiana* que interaccionan con la p25 de CTV.

Hasta el momento, los estudios llevados a cabo con CTV han demostrado que el determinante patológico de la inducción del síndrome de *seedling yellows* (SY), uno de los síndromes característicos observado en invernadero en plantas de semilla de naranjo amargo, se encuentra asociado a la región p23-3'UTR del virus (Fagoaga *et al.*, 2005; Albiach-Martí *et al.*, 2010). Por otra parte, también se ha descrito la implicación de p23 como supresor del silenciamiento génico mediado por RNA (Lu *et al.*, 2004) a nivel intracelular, además de actuar como determinante de patogenicidad en cítricos y *N. benthamiana* (Fagoaga *et al.*, 2005; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la adquisición evolutiva de tres de los

genes de CTV, *p33*, *p18* y *p13* le permitió ampliar su gama de huéspedes cítricos (Tatineni *et al.*, 2011). Asimismo, se ha propuesto la implicación de *p33* en el fenómeno de protección cruzada, de modo que mutantes de CTV que no la expresan son incapaces de evitar una nueva infección por parte de otro aislado (Folimonova, 2012). Estudios recientes han revelado que *p33* también podría estar implicada en el movimiento viral debido a su co-localización, en *N. benthamiana*, en plasmodesmos y endosomas (Bak y Folimonova, 2015). Asimismo, se ha descrito que *p33* interacciona consigo misma, tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, de doble híbrido y de BiFC, revelando que dicha interacción ocurre mediante una α -hélice presente en el extremo Nt de la proteína (Kang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, tal como hemos demostrado en los capítulos anteriores de esta tesis, *p20* también es un determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* al igual que *p23* (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que *p20* es capaz de interaccionar consigo misma mediante ensayos de doble híbrido en levadura y BiFC (Gowda *et al.*, 2000; Nchongboh *et al.*, 2014), y que forma parte de los cuerpos de inclusión amorfos presentes en las células infectadas por CTV (Gowda *et al.*, 2000). Estudios más recientes, llevados a cabo utilizando la técnica del doble híbrido y confirmados por BiFC, también han revelado la interacción consigo misma de *p25* a través de un dominio localizado entre los aminoácidos 41-84 (Nchongboh *et al.*, 2014).

Los primeros análisis de interacción CTV-cítricos, se abordaron utilizando la técnica de *microarrays* para determinar las diferencias de expresión génica en plantas de lima mexicana inducidas por la infección con un aislado severo de CTV (T305), o por uno suave (T385). Se observó que la infección con el aislado suave no produjo cambios muy significativos en los niveles de expresión de los genes del huésped, mientras que la inducida por el aislado severo alteró la expresión de 334 genes, la mayoría relacionados con la respuesta al estrés y la defensa de la planta. Estos cambios en el transcriptoma de la planta podrían estar asociados a la expresión de síntomas, o bien a una respuesta general frente al estrés generado por la infección (Gandía *et al.*, 2007).

Recientemente, diversos análisis transcriptómicos de cítricos infectados por CTV se han llevado a cabo utilizando como material infectado diversas combinaciones susceptibles o tolerantes de injerto/patrón (Laino *et al.*, 2015) o bien el huésped naranjo dulce (Dória *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016). De estos estudios se ha podido concluir que en plantas tolerantes a la infección por CTV, se reprime la expresión de genes relacionados con el tratamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS), y con la defensa general frente a patógenos, sugiriendo que este tipo de respuesta sería capaz de minimizar los efectos sistémicos de la infección viral (Laino *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que la infección causada por CTV en plantas de naranjo dulce, un huésped sensible, induce cambios tanto en la expresión como en la actividad de enzimas antioxidantes (Dória *et al.*, 2015). Además, en este huésped también se ha determinado que las rutas implicadas en defensa de la planta (concretamente aquellas relacionadas con la modificación de la pared celular), regulación de la transcripción, hormonas, metabolitos secundarios, quinasas y estrés se ven alteradas tanto en infecciones causadas por un aislado suave como por uno agresivo (Fu *et al.*, 2016).

En líneas generales, en estos análisis se concluyó que en huéspedes tolerantes, los genes relacionados con metabolismo energético, con la respuesta a estrés oxidativo y con su defensa, reducen su expresión. Por el contrario, en huéspedes susceptibles se observó la sobre-expresión de genes de defensa y estrés oxidativo, y de genes relacionados con crecimiento vegetativo y daño en tejidos floemáticos.

Sin embargo, este tipo de estudios son preliminares, aportan una visión general de las alteraciones metabólicas, de rutas de regulación y diversos procesos de la planta durante las infecciones en las que está implicado CTV. Además, estos efectos se analizan utilizando un único aislado de CTV y en una combinación concreta variedad/patrón. Por ello, no permiten averiguar qué proteínas específicas del virus, o del aislado analizado, interaccionan con qué proteínas diana de la planta huésped. Así, es necesario recurrir a análisis proteómicos que permitan identificar las interacciones primarias proteína viral-proteína planta utilizando un huésped que facilite este tipo de estudios.

En el contexto de esta tesis, se ha mostrado como el huésped herbáceo *N. benthamiana*, para el cual se ha desarrollado en nuestro laboratorio la agroinfección de clones de cDNA del aislado T36 de CTV (Ambrós *et al.*, 2011, 2013), supone un modelo adecuado para abordar estudios de interacción CTV-planta debido a:

- i) su facilidad de manejo como huésped y rápido ciclo de infección sistémica (comparada con cítricos)
- ii) la inducción en dicho huésped de muchos de los síntomas específicos y característicos de las infecciones causadas por CTV-T36 en el huésped natural, como epinastia, clorosis/amarilleo, arrugamiento de los brotes apicales...
- iii) su comportamiento diferencial frente a infecciones causadas por diferentes aislados de CTV: T36, que se replica e infecta sistémicamente, T318A que sólo infecta localmente y T385 que ni siquiera se replica (como ejemplo).
- iv) los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 2 de esta tesis que demuestran que muchas de las interacciones base CTV-planta son semejantes entre *N. benthamiana* y cítricos (véase datos de localización subcelular de las proteínas p25 en ambos huéspedes, capítulo 1, y de supresión del silenciamiento de RNA y patogénesis del capítulo 2), y al mismo tiempo son específicas de la interacción aislado CTV-planta (véase en los capítulos indicados los resultados comparados principalmente entre los aislados T36 y T318A de CTV).

Otra de las ventajas de utilizar este huésped es el hecho de poder identificar las funciones de sus genes por comparación de sus secuencias con las ortólogas bien anotadas de *A. thaliana* (al carecer del genoma anotado completo de *N. benthamiana*). Además, *N. benthamiana* se ha utilizado previamente como modelo eficaz para el estudio de interacciones planta-patógeno a nivel molecular (Silveira *et al.*, 2013), y para estudiar la función de algunos de sus genes mediante el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) o mediante la expresión transitoria de sus proteínas (Goodin *et al.*, 2008; Senthil-Kumar *et al.*, 2011). Parte de estos estudios se han llevado a cabo con virus o proteínas virales, incluyendo algunas de CTV (Lu *et al.*, 2004; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011, 2013; Bak y Folimonova, 2015). Así, muchas de las interacciones CTV-planta se podrían

abordar utilizando este sistema y los aislados T36 y T318A de CTV, para los que se ha demostrado que algunas de sus proteínas, como p25 y p20 estudiadas en esta tesis, tienen un comportamiento patogénico, supresor y de localización subcelular diferencial en este huésped.

En concreto, el objetivo de este capítulo consistió en el estudio proteómico de las interacciones entre la proteína p25 de CTV de ambos aislados y las del huésped *N. benthamiana*, empleando para ello: i) un análisis de interacción proteína-proteína basado en la purificación de los complejos mediante la técnica AP-MS descrita anteriormente, ii) seguida de un análisis bioinformático de alto rendimiento para obtener el interactoma y las redes funcionales de p25. Al tratarse de una proteína estructural del virus, la expresión de p25-tag utilizando el clon infeccioso no es viable. Por ello, la estrategia se basó en la expresión transitoria de la proteína marcada, mediante agroinfiltración, en las hojas de este huésped herbáceo.

La proteína p25 de CTV es multifuncional, al igual que la de muchos virus, por lo que además de formar parte de la cápsida del virión, también actúa como proteína supresora del silenciamiento génico a nivel intercelular (Lu *et al.*, 2004 y resultados de esta tesis). Por este motivo, el estudio de las interacciones con las proteínas del huésped podría ayudar a entender el mecanismo de silenciamiento, así como dilucidar su implicación en funciones desconocidas hasta el momento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Fusión del gen *p25* a la etiqueta *One-STrEP-tag*, clonación en un plásmido binario y expresión en planta

Con el fin de purificar complejos proteína-proteína entre la proteína p25 de los aislados T36 y T318A de CTV y potenciales proteínas interactoras del huésped, ésta se fusionó a la etiqueta *One-STrEP-tag* (IBA Lifesciences). Para ello, la secuencia correspondiente a la etiqueta se amplificó por PCR siguiendo las condiciones descritas (apartado 2.2, Capítulo 1) con cebadores que contenían un sitio de restricción *NheI* en el extremo 5' (sentido

mensajero) y un sitio *Afel* en el extremo 3' (antisentido) (Tabla 2). Se utilizó como molde el plásmido pUBSt (proporcionado amablemente por el Dr. José Antonio Darós, IBMCP, Valencia). El producto de PCR purificado y digerido se subclonó en el plásmido pBS-p25-GFP (ver apartado 2.2 del Capítulo 1), al que previamente se le había eliminado el gen *gfp* digiriendo con las enzimas mencionadas. Los *cassettes* 35S:p25-One-StrEP-*tag*:PoPit resultantes se escindieron vía *HindIII* y subclonaron en el vector binario pMOG800, que se transformó en células competentes de la cepa C58 de *A. tumefaciens* mediante electroporación (apartado 2.3 del Capítulo 1).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar la etiqueta *One-StrEP-tag*.

CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIONES
PM-570D	TACCCGGCGGGCTAGC ¹ AGCGCATGG AGTCATCCTCAATT	-
PM-571R	AGAGGATCCCAGCGCT ² AGATTATCCG GATTTTTCGAACTGCGGGTGG	-

D indica sentido directo y R reverso

Se indican los sitios de corte para *NheI* (1) y *AfeI* (2) que aparecen con caracteres subrayados

La agroinoculación de hojas de las plantas de *N. benthamiana* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.8 del Capítulo 1, y el material vegetal (hojas infiltradas) se recogió a los 3 días post-inoculación.

2.2. Extracción de proteínas totales de *N. benthamiana*

A partir de esta sección, todo el trabajo relativo a la parte experimental de proteómica, se realizó en el laboratorio del Dr. JA Darós (IBMCP-CSIC-UPV, Valencia).

La extracción de proteínas totales a partir de las hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las construcciones p25-T36- y p25-T318A-*tag* o procedentes de planta sana, se realizó homogeneizando 15 g de material vegetal con N₂ líquido en mortero y 45 ml de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1% NP40) y una pastilla de inhibidor de proteasa *cOmplete, EDTA-free* (Roche). El

material homogeneizado se centrifugó en frío a 10.000 rpm y 15 min y el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó en frío durante 30 min a 30.000 rpm. El sobrenadante final se filtró a través de un filtro de 1 μm de diámetro para eliminar impurezas.

2.3. Detección del complejo proteico p25-One-STrEP-tag mediante hibridación molecular de tipo *Western blot*

Para detectar la expresión del complejo proteico p25-tag mediante *Western blot*, 40 μl de extracto proteico se desnaturalizó junto a 10 μl de tampón de carga (0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 0.5 M DTT, 50% glicerol y 0.05% azul de bromofenol) a 95°C durante 2 min. Las muestras se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (PAGE) al 12.5% (relación acrilamida:bisacrilamida de 36.5:1) conteniendo 0.05% SDS. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 h en tampón TGS 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.6) utilizando un voltaje constante de 200 V.

La transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (GE Healthcare) se realizó con un aparato de electrotransferencia (Unidad de transferencia semi-seca, VWR) y el tampón correspondiente (25 mM Tris y 192 mM glicina) durante 1 h a intensidad constante (1 mA/cm² de membrana). Después, las membranas se bloquearon con tampón bloqueante (5% leche desnatada, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 154 mM NaCl y 0.1% Nonidet P40) en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, y luego se incubaron con una dilución 1:10000 del anticuerpo Strep-Tactin-HRP (IBA Lifesciences) en el mismo tampón de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón de lavado (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 154 mM NaCl y 0.1% Nonidet P40) y, finalmente, las proteínas se detectaron con el kit “ECL Western Blotting Detection Reagents” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4. Purificación de los complejos p25-tag:proteínas del huésped mediante cromatografía en columna de afinidad

Para la purificación de los complejos p25-tag:proteínas del huésped se utilizó la columna de cromatografía Strep-Tactin

Superflow Cartridge H-PR (IBA Lifesciences) y un aparato AKTA Prime Plus (GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

La columna se equilibró con 10 ml de tampón de extracción de proteínas y luego se cargó el extracto proteico de modo que los complejos con la p25-tag se unieran a ella dada su afinidad por la Strep-Tactin. Seguidamente, la columna se lavó con 20 ml de tampón de extracción y los complejos proteicos se eluyeron con 20 ml de tampón de extracción conteniendo 10 mM de d-destiobiotina. Se recogieron 10 fracciones de 0.5 ml y 10 fracciones de 1.5 ml.

2.5. Comprobación de la calidad y concentración de los complejos purificados mediante *Western blot*.

Las fracciones conteniendo los complejos proteicos purificados se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (PAGE) al 15% (relación 36.5:1 de acrilamida:bisacrilamida) con 0.05% SDS. Para ello, 20 µl de cada una de las fracciones primeras obtenidas se mezclaron con 5 µl de tampón de carga y se desnaturalizaron durante 2 min a 95°C. El resto del protocolo se llevó a cabo como en el apartado 2.3.

2.6. Precipitación de los complejos p25-tag:proteínas del huésped.

Las fracciones con la mayor concentración de complejos proteicos purificados (PIP), se juntaron y concentraron mediante precipitación con 4 volúmenes de ácido tricloroacético 12.5% y 10 mM DTT en acetona. La mezcla se incubó toda la noche a -20°C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. El sedimento se lavó 2 veces con acetona fría y, finalmente, se resuspendió en un tampón adecuado.

Los complejos proteína-proteína (PIP) purificados se enviaron a secuenciar a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Valencia, donde se llevó a cabo una digestión en gel con tripsina para su separación en fracciones de mayor y menor tamaño, su identificación mediante espectroscopia de masas en tándem MS/MS y su secuenciación analizando éstas en las bases de datos.

2.7. Análisis bioinformático de las secuencias

El análisis bioinformático de este estudio se llevó a cabo en el grupo del Dr. Guillermo Rodrigo (IBMCP, Valencia), con el que se mantuvo una colaboración estrecha para esta parte del trabajo.

Las secuencias recibidas se analizaron con los programas ProteinPilot v4.5 (AB Sciex) y Mascot v2.2 (Matrix Science) para obtener los listados brutos de proteínas de las muestras p25-*tag* de cada aislado de CTV (T36 y T318A) y del control de planta sana. Cada proteína del listado lleva asignado un número de acceso (Mascot) y un índice de abundancia (emPAI) que refleja la estimación de la cantidad de proteína absoluta de manera exponencial (Ishima *et al.*, 2005). Estos listados se filtraron aplicando un valor diferencial de $\Delta\text{emPAI} \geq 0.1$, donde 0.1 representa las distribuciones medias de ΔemPAI para las proteínas identificadas mediante esta técnica. Así, se obtuvo un segundo listado enriquecido en las proteínas del huésped con mayor probabilidad de unirse a p25, habiendo eliminado las proteínas con menor nivel de expresión y aquellas compartidas con la muestra control.

Ya que no se dispone del genoma completo anotado de *N. benthamiana*, la identificación funcional de las proteínas de los listados se llevó a cabo comparando sus secuencias con las de proteínas ortólogas de la base de datos de *A. thaliana*, cuya función es conocida, utilizando la herramienta Biopython (Cock *et al.*, 2009). Se relacionaron los números de acceso Mascot con el identificador GenInfo (GI) utilizando la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org/>) y, a continuación, para cada GI se obtuvieron las secuencias aminoacídicas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Finalmente, las secuencias obtenidas se alinearon en la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a fin de identificar el gen ortólogo de *A. thaliana*.

Con el listado obtenido de proteínas ortólogas de *A. thaliana*, se llevó a cabo una clasificación funcional y estructural empleando las bases de datos Panther (<http://pantherdb.org/>) y agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>; Du *et al.*, 2010). Con esta

información, y utilizando el programa REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>; Supek *et al.*, 2011) se construyó una red funcional con las proteínas que compartían funciones y se agruparon en módulos metabólicos de la planta huésped.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención e identificación de los complejos proteicos CTV-p25-*N. benthamiana*.

La complejidad de CTV, un virus que codifica para al menos 17 proteínas, y el elevado número de interacciones que éstas deben establecer con proteínas del huésped en el ciclo infeccioso del virus, ha dificultado el conocimiento de dichas interacciones. Un reflejo de esta complejidad es el hecho de que CTV posee tres supresores del silenciamiento génico (Lu *et al.*, 2004), aunque sólo uno de ellos, p23, se ha caracterizado de forma precisa (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Por ello, para el presente estudio seleccionamos otra de las proteínas supresoras del silenciamiento del virus, p25, que además es una proteína estructural implicada en la encapsidación del virión, y dos aislados de CTV estudiados en este trabajo que difieren en sus características patogénicas en cítricos y *N. benthamiana*.

La identificación de proteínas de *N. benthamiana* que potencialmente interaccionen con p25, permitiría conocer el mecanismo de acción que emplea ésta para contrarrestar la ruta de silenciamiento de la planta, o determinar si interviene en otras funciones en el proceso de infección o en la regulación de rutas metabólicas del huésped todavía no conocidas. Por otra parte, la obtención del interactoma de la planta y las p25 de T36 y T318A, permitiría detectar interacciones diferenciales de éstas con proteínas diana del huésped, y si ello se puede asociar a distintos mecanismos de acción que expliquen el comportamiento diferencial de estos aislados en el huésped herbáceo.

Para abordar este trabajo, se siguió una estrategia proteómica en la que la p25 de ambos aislados se fusionó al péptido *Strep-tag* II, las construcciones se clonaron en un vector binario pMOG y se expresaron en planta de forma transitoria mediante agroinfiltración

de hojas de *N. benthamiana*. La fusión se llevó a cabo en el extremo Ct de la p25, ya que en experimentos previos la fusión en la región Nt no resultó funcional (datos no mostrados).

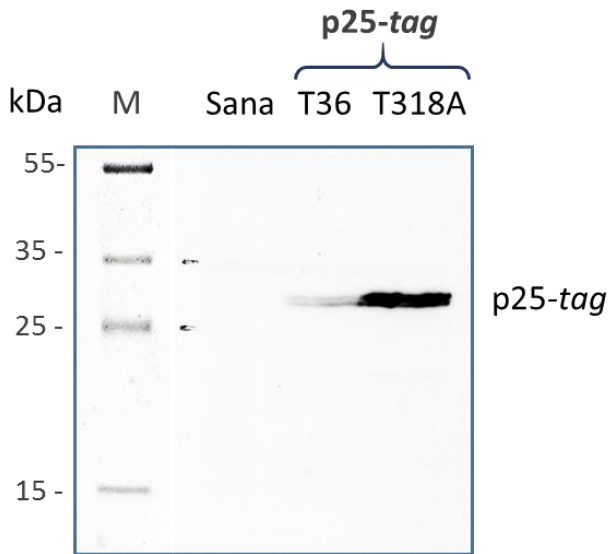


Fig 3. Gel desnaturalizante SDS-PAGE al 12,5% e hibridación *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-*Strep-tag* y una detección luminogénica. Migración de los extractos proteicos p25-tag de *N. benthamiana* procedentes de plantas sanas o infiltradas con p25-T36-tag y p25-T318A-tag a 3dpi. M: marcador de peso molecular de proteínas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

A los 3 días post-infiltración (dpi) se recolectó el material vegetal junto al de planta sana no-infiltrada, y se realizó una extracción de proteínas y posterior purificación de los complejos proteicos *N. benthamiana*-p25-tag (PIPs). Previamente a dicha purificación, se realizó una extracción de proteínas standard a partir de una pequeña muestra de tejido con el fin de determinar la expresión correcta *in planta* de las proteínas. Las muestras de proteína procedentes de tejidos infiltrados con la p25-tag de T36 y T318A y de una planta sana, se migraron en un gel PAGE desnaturalizante y se realizó un *Western blot* hibridando con un anticuerpo monoclonal anti-*Strep-tag* y una detección luminogénica (Martínez *et al.*, 2016) (Fig. 3).

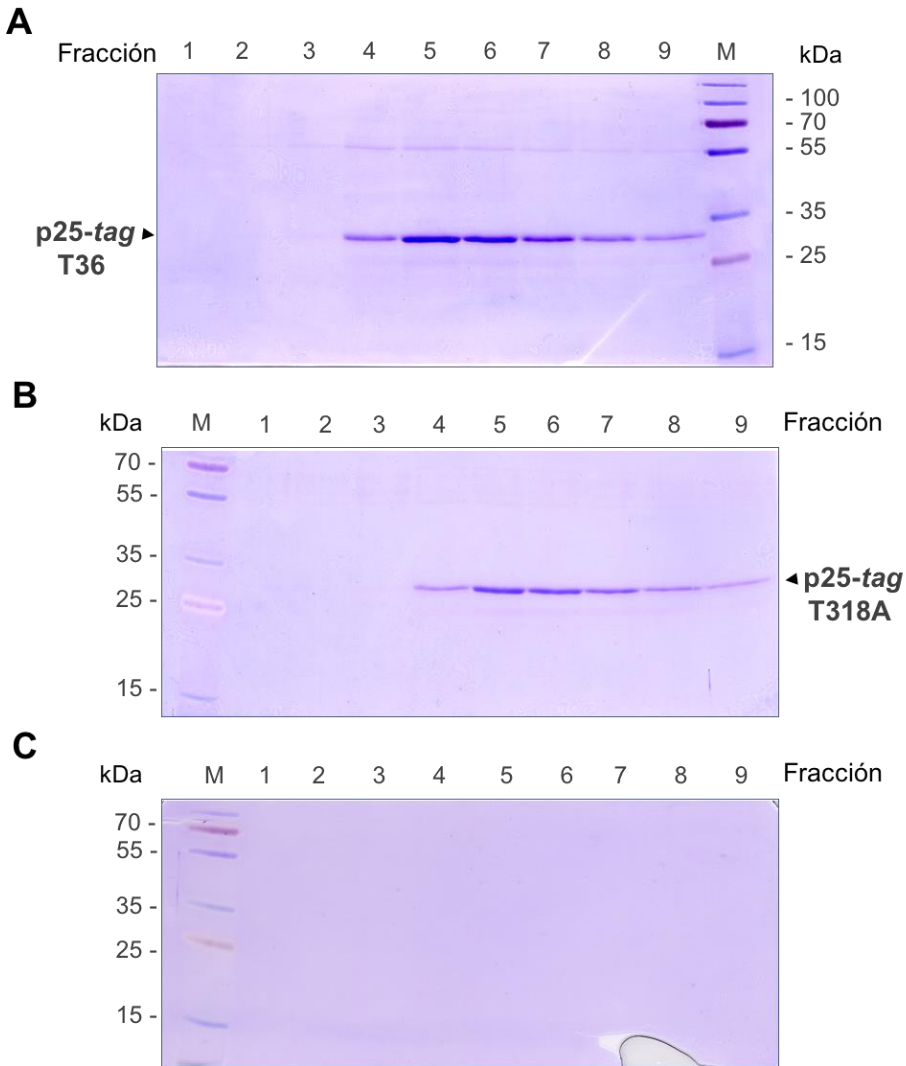


Fig 4. Geles desnaturizantes SDS-PAGE al 12.5% (tinción coomassie). Migración de las fracciones principales del gradiente de purificación de los complejos proteicos p25-tag-*N. benthamiana*. Carriles de 1 a 9: complejos PIPs purificados de de plantas infiltradas con p25-T36-tag (A), p25-T318A-tag (B) o sanas (C). M: marcador de peso molecular de proteínas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Se confirmó así que ambas construcciones de p25-tag marcadas en Ct eran funcionales *in vivo*. Para la purificación de los

complejos proteicos a partir de estos tejidos, se realizó una cromatografía de afinidad líquida utilizando una columna de *Strep-Tactin* (que contiene el residuo de estreptavidina). Durante la cromatografía, los complejos *p25-tag*-proteínas del huésped quedaron unidos covalentemente a la *Strep-tag* de la p25. Tras liberar esta unión lavando con el competidor desbiotina, se eluyeron un conjunto de fracciones que contenían los PIPs.

Para determinar qué fracciones proteicas contenían la mayor concentración de complejos proteína-proteína y poder así concentrar las muestras de interés, se separó una alícuota de cada una de las fracciones principales (las nueve centrales del gradiente), en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Fig. 4). Finalmente, las fracciones más concentradas se purificaron de forma conjunta y una alícuota de los eluidos finales se migró en un SDS-PAGE desnaturalizante al 15% para comprobar su pureza (Fig. 5).

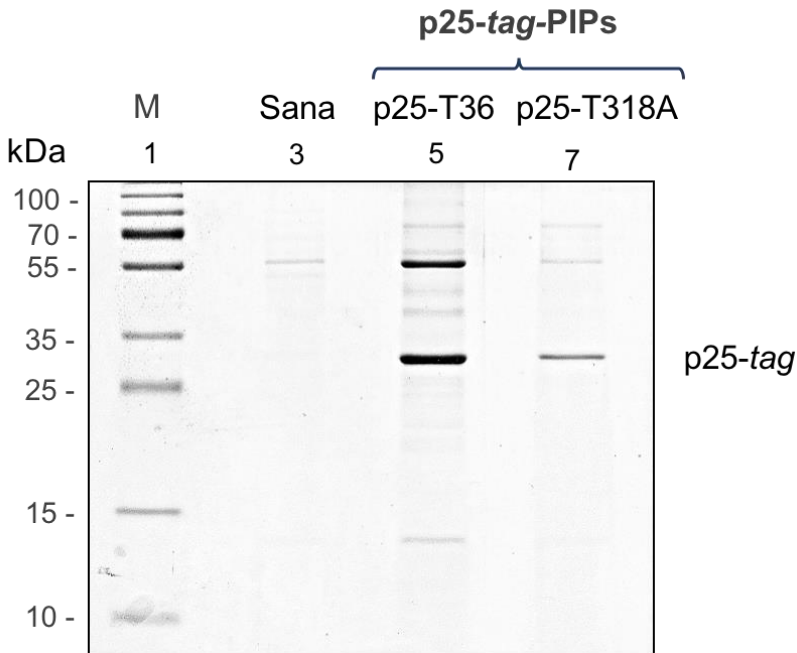


Fig. 5. PAGE-SDS desnaturalizante al 15% de los complejos proteicos purificados a partir de hojas de *N. benthamiana* de las *p25-tag* de los aislados T36 y T318A de CTV. Tinción con coomasie coloidal. M: marcador de peso molecular de proteínas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

3.2. Análisis bioinformático para identificar y categorizar las proteínas interactoras del huésped *N. benthamiana* con las p25 de CTV.

Tras analizar los complejos proteicos purificados mediante LC-MS/MS en función de su masa, se identificaron un gran número de proteínas diana en las muestras procedentes de cada aislado y de la planta sana. Los listados brutos de proteínas se filtraron y normalizaron para eliminar duplicados, sustraer las proteínas compartidas con el control (corrección de las proteínas presentes en la planta sana) y aquellas que se expresaban a niveles bajos. Se utilizaron los programas Protein Pilot v4.5 (ABSciex) y Mascot v2.2 (Matrix Science). Para el posterior filtrado de las listas proteicas se asignó un código proteico (número de acceso Mascot) y un índice relativo de abundancia (emPAI) con el fin de realizar una corrección por concentración en la muestra. Con objeto de realizar la identificación de las proteínas interactoras de *N. benthamiana*, se llevó a cabo la contextualización de éstas mediante su asignación a genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*. De este modo, se correlacionaron los números de acceso Mascot y el identificador GenInfo (GI) empleando la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), después se obtuvieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los GI en la base NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se realizaron los alineamientos correspondientes mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) obteniendo los listados de genes ortólogos en *A. thaliana*. En un segundo filtrado de las listas se realizó una nueva corrección con el fin de quedarse con aquellas que entraban dentro de un intervalo de confianza más estricto aplicando un algoritmo determinado. Con el análisis de las listas se procedió a llevar a cabo el análisis funcional utilizando varias herramientas bioinformáticas.

En un primer análisis se empleó la base de datos AgriGO (Du *et al.*, 2010) con el fin de identificar los procesos biológicos en los cuales intervendría cada proteína; para la clasificación estructural y funcional de las proteínas identificadas se utilizó también la base de datos Panther (<http://pantherdb.org/>), mientras que el análisis utilizando la herramienta REVIGO (Supek *et al.*, 2011) permitió una descripción general de las categorías funcionales y subcategorías mediante los valores de identificación génica o Gene Ontology (GO).

Los análisis identificaron un total de 249 proteínas del huésped potencialmente interactoras de p25-T36 mientras que este número fue mucho más inferior para la p25-T318A, con un total de 127. Con todos estos datos se construyó la red funcional de p25 y se identificaron los grupos metabólicos principalmente implicados en las interacciones potenciales con proteínas dianas del huésped.

Al comparar las categorías funcionales obtenidas de los complejos interactores de la p25 de los aislados T36 y T318A, se observó una red de interacción muy diferencial entre ambas con el proteoma de la planta: dicha red era mucho mayor para la p25-T36, interviniendo en un número muy elevado de procesos metabólicos (y catabólicos), seguida de aquellos relacionados con respuesta al estrés y en menor medida, en los de transporte/localización (Fig. 6). Por el contrario, la p25 de T318A presentó una menor interacción con proteínas relacionadas con procesos metabólicos, principalmente relacionadas con biosíntesis, fotosíntesis y otros metabolismos celulares (incluido catabolismo), mientras que proporcionalmente su interactoma con potenciales dianas de respuesta a estrés fue mucho más rico. Es de destacar que en el módulo de metabolismo se detectó una interacción diferencial con proteínas relacionadas con el metabolismo de proteínas (a diferencia de lo observado para la p25-T36). Las dianas potenciales de transporte/localización fueron mucho menores que las detectadas para p25-T36 (Fig. 6). Estos resultados, reflejarían un posible comportamiento diferencial a nivel biológico para ambas p25 en *N. benthamiana*.

El módulo de metabolismo, el mayoritario para la p25-T36, engloba un gran número de proteínas potencialmente interactoras del huésped que afectan a procesos como la biogénesis, la fotosíntesis, fijación de carbono (compartidas por ambas p25), así como la regulación biológica o el desarrollo (Fig. 6). Dentro de éste, las proteínas mayoritarias para la p25-T36 estaban relacionadas con funciones catalíticas, seguidas de proteínas transportadoras o de unión, relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, síntesis y degradación de proteínas, o en procesos de oxido-reducción (actividad antioxidante o en rutas de nitrógeno, calcio o especies reactivas de oxígeno). Gran parte de estas interacciones producen alteraciones celulares asociadas a infecciones virales producidas por CTV en cítricos (Gandía *et al.*, 2007).

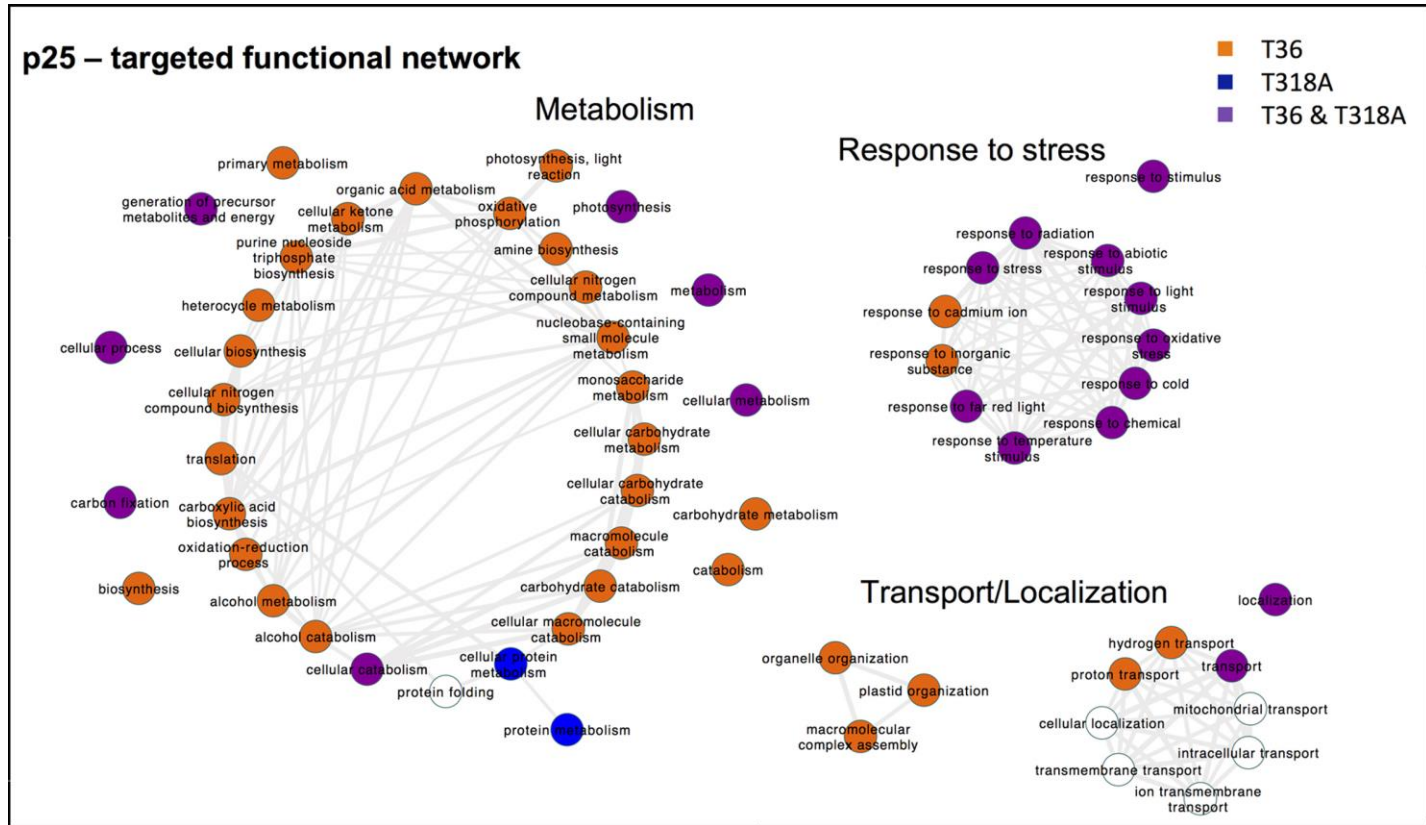


Fig. 6: Clasificación por categorías funcionales de los complejos proteicos de interacción de las p25 de T36 y T318A con proteínas del huésped *N. benthamiana*. Obtenida con la base de datos REVIGO.

El segundo módulo de proteínas relacionadas con respuesta al estrés, incluía aquellas tanto de estrés biótico como abiótico, frío u oxidativo así como con respuestas generales de defensa, destacando la interacción específica de respuesta a cadmio detectada sólo para la p25 de T36.

El último módulo de localización y transporte incluía proteínas implicadas en estas funciones para ambas p25, aunque ésta red era más extensa para la p25 de T36, en cuyo interactoma aparecían proteínas principalmente implicadas en la organización de orgánulos y plastidios, el transporte iónico intracelular y la participación en el ensamblaje de complejos macromoleculares (Fig. 6).

Ambas p25 comparten potenciales interactores que forman parte principalmente de componentes del citosol (> 40%), de orgánulos celulares (> 27%), de la membrana plasmática (> 11%), o de complejos macromoleculares (> 11%). También se detectó una pequeña fracción (0.7%) de proteínas relacionadas con la región extracelular pero sólo en el caso de p25-T36 (Fig. 7A). Dichos interactores (para ambas p25) están implicados mayormente en procesos metabólicos (> 41%), esencialmente relacionados con el metabolismo primario, la glicólisis y los compuestos nitrogenados, así como en procesos celulares (> 30%) que afectan al ciclo celular, a la segregación de cromosomas durante el ciclo de división celular y a la citocinesis (Fig. 7B). Otra fracción importante corresponde a proteínas que intervienen en la biosíntesis (> 8%) y en rutas de respuesta a estímulos (incluyendo el estrés biótico y oxidativo). En este último caso es interesante destacar que dicha fracción representa el doble para la p25 de T318A (~12%) que para la de T36 (~6%) (Fig. 7B).

Gran parte de las proteínas que interaccionan con las p25 poseen una actividad catalítica principalmente como oxido-reductasas (>14%) e hidrolasas (>12%) (especialmente metalo-proteasas y cisteín-proteasas), o de unión a ácidos nucleicos (>20%) (especialmente a ssDNA), con actividad transportadora (~10%) (como ATP sintasas o canales iónicos), o con el citoesqueleto (~5%) a través de complejos asociados a microtúbulos. Otra fracción importante corresponde a factores de iniciación o elongación de la traducción (Fig. 7D). Es de destacar que la fracción de proteínas implicadas en la unión a calcio que se detectó en el interactoma fue el doble para la p25 de T318A (>6%) que para la de T36.

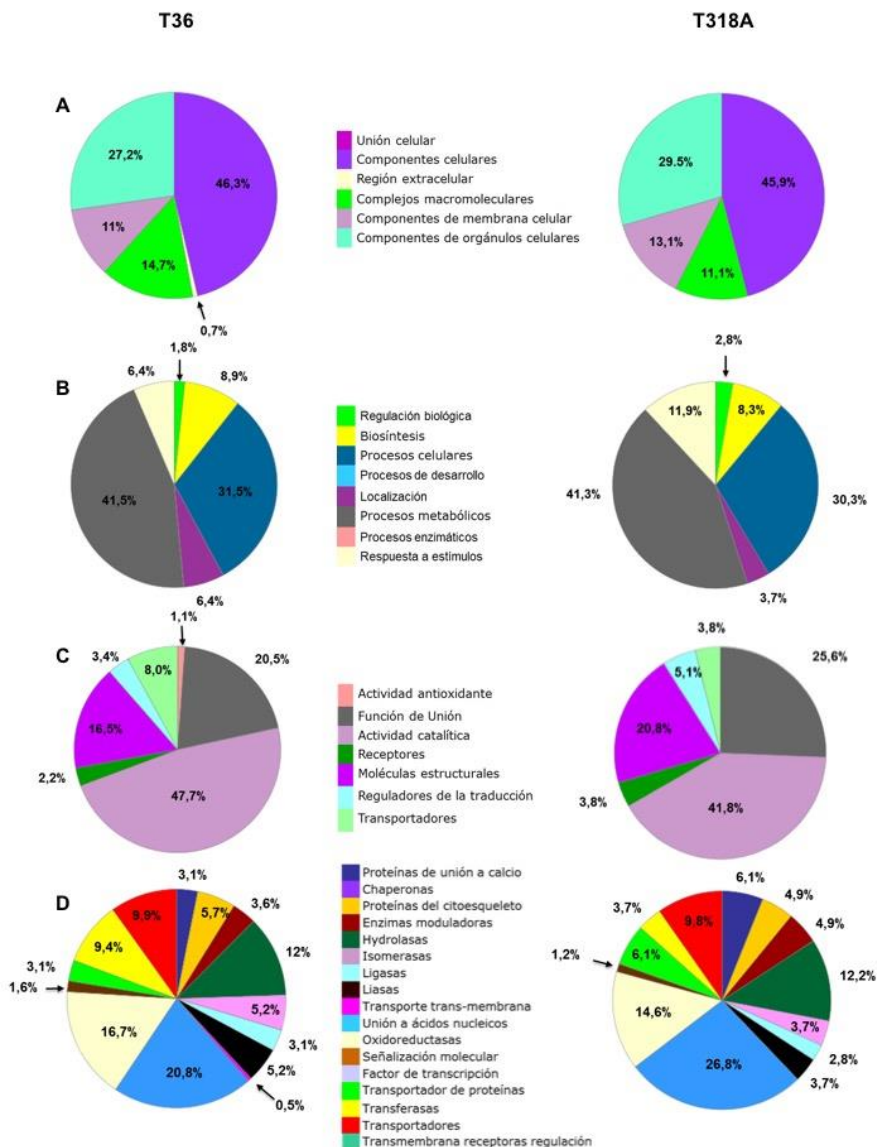


Fig. 7. Clasificación de las proteínas de *N. benthamiana* detectadas como potenciales interactores de la proteína p25 de los aislados T36 y T318A de CTV, según los componentes celulares de los que forman parte (A), el proceso biológico en el cual intervienen (B), su función molecular (C), o su caracterización enzimática (D).

Los interactores de la planta para ambas p25 se relacionaron, en gran medida, con componentes plastídicos. En este sentido, la CP de CTV mostró afinidad por proteínas ribosómicas y transportadores mitocondriales o cloroplásticos. Por otro lado, la interacción de ambas p25 con elementos del citoesqueleto reflejó una mayor afinidad por componentes relacionados con los filamentos de actina. Entre los complejos asociados a la membrana celular se observó que p25-T36 interactuaba con numerosas ATP sintasas (subunidades alfa, beta, delta y épsilon tanto cloroplásticas como mitocondriales, así como las putativas YMF19 y MI25) y diferentes acuaporinas (PIP1-4, PIP2-1 y PIP2-7), mientras que p25-T318A solo lo hacía con las primeras. Asimismo, ambas proteínas interactúan con factores de elongación (EF1A, EF-TuA y EF-TuB).

Además, del análisis de los complejos obtenidos de p25-T318A se pueden destacar tres datos importantes: i) incluyen la fracción principal de proteínas de unión a calcio (6.1%), ii) gran parte de los interactores detectados están implicados en unión a ácidos nucleicos, el 80% de los cuales presentan actividad de unión a RNA, y iii) contienen el mayor porcentaje de proteínas implicadas en la ruta de apoptosis (14.3%) y en la de señalización mediada por proteínas del choque térmico (HSP).

Atendiendo al análisis de un subconjunto reducido de las listas de interactores observadas para ambas p25, al realizar un nuevo filtro por mayor abundancia, obtuvimos una lista reducida a 173 posibles interactores para p25-T36 y 76 para T318A, de las que ambas comparten un total de 52. Las proteínas del huésped más representativas de estas listas se muestran en las Tablas 3, 4 y 5.

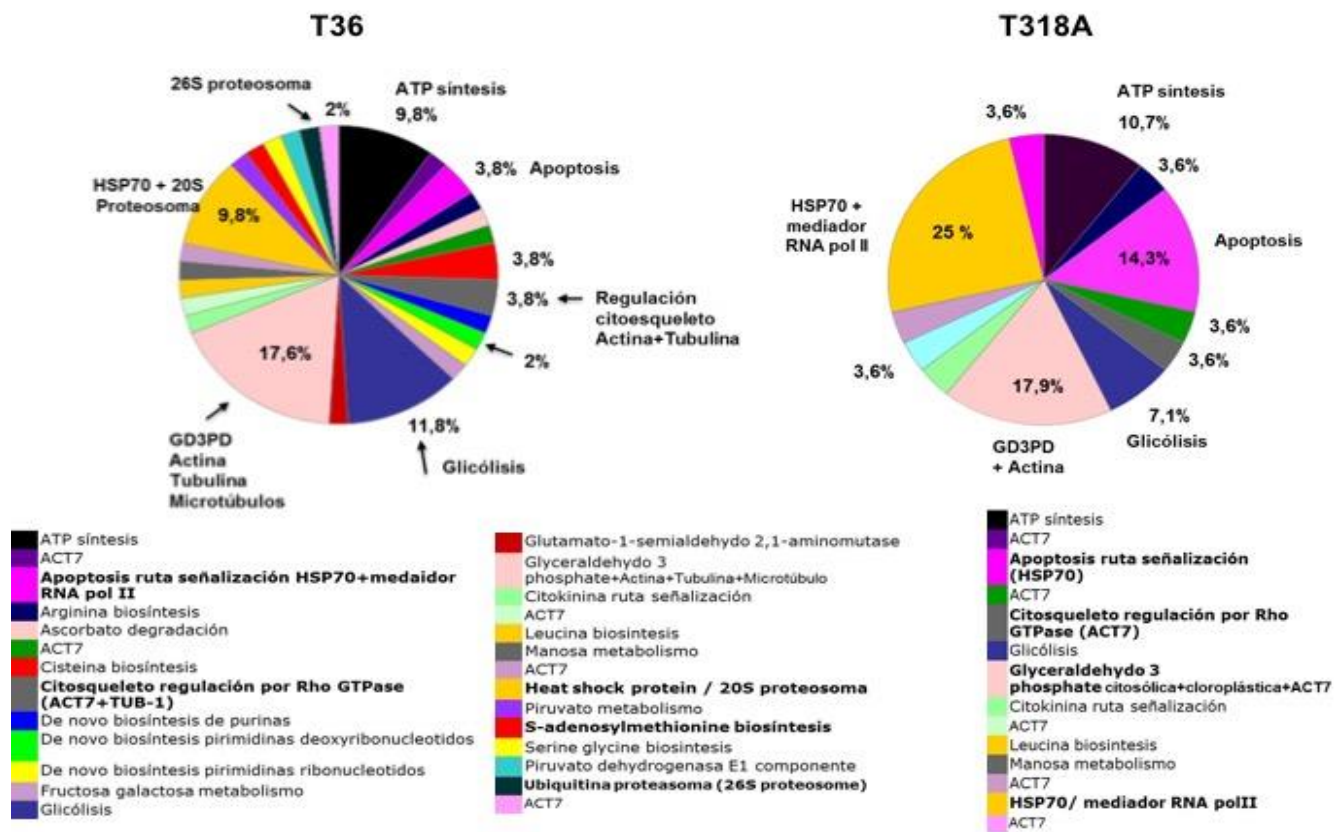


Fig. 8. Clasificación de los interactores de p25-T36 y p25-T318A según la ruta metabólica en la que están implicados.

Tabla 3. Subconjunto de interactores potenciales del huésped detectados en complejos con la p25-T36, clasificación según su función molecular.

FUNCIÓN	PROTEÍNAS DETECTADAS
	FOTOSÍNTESIS
ATCG00490	RUBISCO
AT5G38410	RBCS3B , RUBISCO SUBUNIT PEQUEÑA 3B
AT3G48730	GSA2 , GLUTAMATO-1-SEMIALDEHIDO 2,1-AMINOMUTASA 2
AT5G23120	HCF136 , HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE 136
AT1G54780	TLP18.3 , PROTEINA DEL LUMEN TILACOIDAL
ATCG00020	PSBA , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CENTRO CATALÍTICO
AT1G29930	LHCB1.3 CAB140 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA
AT4G05180	LHCB1.4 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA LIGHT HARVESTING
AT3G08940	LHCB4.2 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA CP29
AT2G05100	LHCB2 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA LIGHT HARVESTING
AT5G54270	LHCB3 , LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-PROTEÍNA DE UNIÓN 3
AT4G10340	LHCB5 , FOTOSISTEMA II LIGHT HARVESTING COMPLEX CP26
AT1G15820	LHCB6 , FOTOSISTEMA II LIGHT HARVESTING COMPLEX CP24
AT4G05180	PSBQ , FOTOSISTEMA II SUBUNIDAD Q-2, PROTEÍNA OEC
ATCG00270	PSBD proteína del FOTOSISTEMA II
AT1G71500	PSB33 , PsbO (OEC) FOTOSISTEMA II PROTEINA 33 TIPO OEC
AT1G06680	OEE2 , PSBP-1, FOTOSISTEMA II SUBUNIDAD P, OXYGEN EVOLVING
AT1G31330	PSAF CITOCROMO, FOTOSISTEMA I SUBUNIDAD F
AT5G64040	PSAN , LUMEN DEL TILACOIDE Y FOTOSISTEMA I
AT4G12800	PSAL , SUBUNIDAD L DEL FOTOSISTEMA I, PROTEÍNA LMM
AT1G30380	PSAK , FOTOSISTEMA I SUBUNIT K
AT3G54890	LHCA1 , FOTOSISTEMA I LIGHT HARVESTING COMPLEX GENE 1
AT3G47470	LHCA4 , FOTOSISTEMA I LIGHT-HARV. CHLOROPHYLL-SUBUNIT A4
AT3G61470	LHCA2 , FOTOSISTEMA I COMPLEJO LIGHT HARVESTING GEN 2
ATCG00520	YCF4 , PROTEÍNA DE ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA I
AT3G56650	PSBP , PPD6, - PROTEÍNA FOTOSISTEMA 6, OEC
AT3G26710	CCB1 , COFACTOR DE ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO C
AT4G09650	ATPD , ATP SINTASA SUBUNIDAD DELTA , CLOROPLASTO
AT4G04640	ATPC1 , ATP SINTASA SUBUNIDAD GAMMA
ATCG00470	ATPE , ATP SINTASA SUBUNIDAD EPSILON
AT3G56130	BLP3 , BCCP-LIKE PROTEINA 3
AT4G01150	CURT1A , PROTEÍNA CURVATURA TILACOIDE 1A
AT3G60750	TKL1 , TRANSCETOLASA 1
AT2G45290	TKL2 , TRANSCETOLASA 2
	UNIÓN A PROTEÍNAS
AT3G24590	PLSP1 , PEPTIDASA 1 PLASTIDICA TIPO I
AT3G57560	NAGK , N-ACETIL-L-GLUTAMATO KINASA,
AT4G25550	CPSF5 , Cleavage/polyadenylation specificity factor, 25kDa subunit
AT1G09340	CRB , PROTEÍNA UNIÓN CLOROPLASTO, CSP41B CO-CHAPERONA
AT5G59840	RAS -related PEQUEÑA PROTEÍNA DE UNIÓN A GTP

CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	
AT1G67090	RBCS1A , RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA CADENA CORTA 1A
AT4G38970	FBA2 , FRUCTOSA-BISFOSFATO ALDOLASA 2
AT5G64410	RPE , D-RIBULOSA-5-FOSFATO-3-EPIMERASA
AT1G12900	GAPC2 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A SUB 2
AT1G23190	PGM , FOSFOGLUTAMASA
AT1G79550	PGK , FOSFOGLICERATO KINASA
AT1G56190	PGK , FAMILIA FOSFOGLICERATO KINASA
AT4G37930	SHMT1 , SERIN HIDROXIMETILTRANSFERASA 1
AT5G14740	BETA CA2 , BETA CARBONICO ANHIDRASA 2
AT1G59900	E1 ALPHA , PIRUVATO DEHIDROGENASA COMPLEJO E1 SUB ALPHA
OXIDO-REDOX	
AT3G09270	GST8, GSTZ1 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU8
AT1G59670	GST15 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU15
AT2G02390	GST18, GSTZ1 , GLUTATION S-TRANSFERASA ZETA 1
AT3G51680	SDR2 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT2G47140	SDR5 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT1G72610	GLP1 , GERMIN-LIKE PROTEINA 1,
AT5G20630	GLP3 , GERMIN-LIKE PROTEINA 3,
AT5G17170	ENH1 , ENHANCER SOS3-1, CALCINEURINA
AT3G52730	UBIQUINOL CITOCROMO B-C REDUCTASA MITOCONDRIAL
AT5G50850	MAB1 , MACCI-BOU
AT1G16300	GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DEHIDROGENASA PLASTIDIOS 2
AT3G26650	GAPA-1 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A SUB 1
AT1G42970	GAPA-2 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A SUB 2
AT1G13440	GAPA-C2 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA C2
AT1G59670	GSTAU15 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU 15
AT5G11770	NADH-UBIQUINONA REDUCTASA 20KD MITOCONDRIAL
AT5G06060	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G10920	MSD1 , MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASA 1
AT3G14420	ACC1 , ACETIL-COA CARBOXILASA 1
AT1G36160	GOX1 , GLICOLATO OXIDASA 1
AT5G08680	ATP SINTASA BETA -SUBUNIDAD MITOCONDRIAL
AT1G78900	VHA-A , ATP SINTASA SUBUNIDAD A VACUOLAR
AT5G13430	UBIQUINOL CITOCROMO B-C REDUCTASA SUBUNIDAD 2Fe-2S
AT4G29010	AIM1 , BETA OXIDACIÓN ACIDOS GRASOS
AT4G15093	LIGB , LigB SUBUNIDAD DIOXIGENASA aromatic ring-opening
CATABOLISMO DE PROTEÍNAS	
AT1G56450	PBG1 , 20S PROTEOSOMA BETA SUBUNIDAD G1
AT5G54160	COMT1 , CAFEATO O-METILTRANSFERASA 1
ATCG00670	CLPP1 , SERIN-PROTEASA P1 CLOROPLÁSTICA
AT5G45390	NCLPP4, CLP SERIN-PROTEASA P4 CODIFICADA EN NÚCLEO
AT4G17040	CLPR4, CLP SERIN-PROTEASA R CLOROPLÁSTICA
AT1G02560	CLPP 5 , CLP SERIN-PROTEASA 5 CODIFICADA EN NÚCLEO
AT2G13360	AGT1 , ALANINA-GLIOXILATO AMINOTRANSFERASA

BIOSÍNTESIS PROTEÍNAS	
AT5G60390	EF1 ALPHA, GTP FCTOR ELONGACIÓN Tu
AT3G61440	CYSC1 , CISTEIN SINTASA C1
AT4G10450	RPL6 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT1G33140	PGY2 , RPL9, PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT5G48760	RPL13 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT2G36620	RPL24A , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT2G09990	RPS5 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT3G09680	RPS12/23 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT3G02560	RPS7e , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT1G48830	RPS7e , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT3G57490	RPS5 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT2G37270	RPS5B , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT4G34670	RPS3A , PROTEÍNA RIBOSOMAL
ATCG00800	RPS3 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT3G52580	RPS11 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT5G09500	RPS19 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
ATCG00770	RPS8 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT5G50240	PIMT2 , PROTEINA -L-ISOASPARTATO METILTRANSFERASA 2
AT4G24830	ARGINOSUCCINATO SINTASA CLOROPLASTO
AT2G43090	IPMI SSU1 , ISOPROPILMALATO ISOMERASA SUBUNIDAD PEQUEÑA 1
AT3G59760	OASC , O-ACETILSERINA (THIOL) LIASA
AT2G33800	EMB3113 , SCA1, RPS5
UNIÓN ÁCIDOS NUCLEICOS	
AT1G79050	RECA1 , HOMOLOGO BACTERIANO RECA
AT4G09320	NDPK1 , NUCLEOSIDO DIFOSFATO KINASA 1
AT2G25870	ATYBEY , YBEY ENDORIBONUCLEASA
AT2G28720	H2B , HISTONA 2B
AT5G10770	ASPARTIL PROTEASA EUCARIÓTICA
UNIÓN ATP	
ATCG00150	CF0 , SUBUNIDAD A DEL COMPLEJO ATP SINTASA CLOROPLASTO
AT5G49460	ACLB-2 , ATP CITRATO LIASA SUBUNIDAD B 2
AT5G62670	HA11 , H(+)-ATPASA 11, MEMBRANA PLASMÁTICA
AT3G08580	AAC1 , ADP/ATP TRANSPORTADOR/TRANSLOCADOR MITOCONDRIAL
ATMG01190	ATP1 , ATP SINTASA SUBUNIDAD 1 MITOCONDRIAL
AT5G47030	ATP SINTASA-SUBUNIDAD DELTA MITOCONDRIAL
ATMG00480	ATP8 , ATP SINTASA SUBUNIDAD 8 MITOCONDRIAL
ATCG00130	ATP SINTASA SUBUNIDAD F CLOROSPLASTO
ATCG00120	ATPA , ATP SINTASA SUBUNIDAD ALFA CLOROPLÁSTICA
BIOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS	
AT1G48030	MTLPD1 , LIPOAMIDA DEHIDROGENASA 1 MITOCONDRIAL
BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS	
AT5G16390	BCCP1 , PROTEINA TRANSPORTADORA BIOTIN CARBOXIL

Tabla 4. Subconjunto de interactores potenciales del huésped detectados en complejos con la p25-T318A, clasificación según su función molecular.

	FOTOSÍNTESIS
ATCG00490	RUBISCO
AT1G29930	LHCB1.3 CAB140 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA
AT5G01530	LHCB1.4 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA LIGHT HARVESTING
AT2G05100	LHCB2 , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA LIGHT HARVESTING 2
AT4G10340	LHCB5 , FOTOSISTEMA II LIGHT HARVESTING COMPLEX CP26
AT1G15820	LHCB6 , FOTOSISTEMA II LIGHT HARVESTING COMPLEX CP24
AT3G50820	PSB0 , PSB0-2, - PROTEÍNA FOTOSISTEMA II
ATCG00020	PSBA , FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CENTRO CATALÍTICO
AT1G71500	PSB33 , PsbO (OEC) FOTOSISTEMA II PROTEINA 33 TIPO OEC
AT3G54890	LHCA1 , FOTOSISTEMA I LIGHT HARVESTING COMPLEX GENE 1
AT3G61470	LHCA3 , FOTOSISTEMA I COMPLEJO LIGHT HARVESTING GEN 3
AT3G47470	LHCA4 , FOTOSISTEMA I LIGHT-HARV. CHLOROPHYLL-SUBUNIT A4
AT1G30380	PSAK , FOTOSISTEMA I SUBUNIT K
AT1G55670	PSAG , FOTOSISTEMA I SUBUNIT G
AT1G08380	PSAO , FOTOSISTEMA I SUBUNIT O
AT5G38430	RBCS1B , RUBISCO SUBUNIT PEQUEÑA 1B
AT5G38410	RBCS3B , RUBISCO SUBUNIT PEQUEÑA 3B
OXIDO-REDOX	
AT1G78380	GST19 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU19
AT3G51680	SDR2 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT2G47140	SDR5 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT1G72610	GLP1 , GERMIN-LIKE PROTEINA 1,
AT5G20630	GLP3 , GERMIN-LIKE PROTEINA 3,
AT5G13430	UBIQUINOL CITOCROMO B-C REDUCTASA MITOCONDRIAL
AT3G26650	GAPA-1 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATE DEHIDROGENASA A SUB 1
AT1G42970	GAPA-2 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATE DEHIDROGENASA A SUB 2
AT3G04120	GAPA-C1 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATE DEHIDROGENASA C1
AT1G13440	GAPA-C2 , GLICERALDEHIDO 3-FOSFATE DEHIDROGENASA C2
AT3G45300	IVD , ISOVALERYL-COA-DESHIDROGENASA
UNIÓN A PROTEÍNAS	
AT5G42020	BIP2 , PROTEÍNA DE UNIÓN RNA LUMEN DEL CHLOROPLASTO
AT1G09340	CRB , PROTEÍNA UNIÓN CLOROPLASTO, CSP41B CO-CHAPERONA
AT2G21130	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein.

CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	
AT1G67090	RBCS1A , RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA CADENA CORTA 1A
AT5G14740	BETA CA2 , BETA CARBONICO ANHIDRASA 2
BIOSÍNTESIS PROTEÍNAS	
AT5G60390	EF1 ALPHA , GTP FCTOR ELONGACIÓN Tu
AT2G31610	RPS3 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT5G35530	RPS3A , PROTEÍNA RIBOSOMAL
ATCG00380	RPS4 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
ATCG00770	RPS8 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT5G09500	RPS19 , PROTEÍNA RIBOSOMAL
AT4G08900	ARGAH1 , ARGININE AMIDOHYDROLASE 1
CATABOLISMO DE PROTEÍNAS	
ATCG00670	CLPP1 , SERIN-PROTEASA P 1 CLOROPLÁSTICA
UNIÓN ÁCIDOS NUCLEICOS	
AT1G33140	PGY2 , PIGGYBACK2 S
AT4G11060	MTSSB , MITOCHONDRially TARGETED SINGLE-STRANDED DNA BINDING P
UNIÓN ATP	
ATMG01190	ATP1 , ATP SINTASA SUBUNIDAD 1 MITOCONDRIAL
ATCG00120	ATPA , ATP SINTASA SUBUNIDAD ALFA CLOROPLÁSTICA
AT1G73110	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein

Tabla 5. Subconjunto de interactores potenciales del huésped detectados en complejos con ambas p25, clasificadas según el proceso en el que intervienen.

DEFENSA-p25 T36	
AT3G51680	SDR2 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT2G47440	SDR5 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT1G72610	GLP1 , GERMIN-LIKE PROTEINA 1,
AT5G20630	GLP3 , GERMIN-LIKE PROTEINA 3,
AT5G17170	ENH1 , ENHANCER SOS3-1, CALCINEURINA
AT1G79530	GAPCP-1 , GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DEHID. PLASTIDIOS
AT3G09270	GSTU8 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU 8
AT1G78380	GSTU19 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU 19
AT5G50920	HSP93-V , HEAT SHOCK PROTEIN 93-V,
AT5G02500	HSPc70-1 , HEAT SHOCK COGNATE 70-1
AT4G37910	MTHSC70-1 , HEAT SHOCK PROTEIN 70-1 MITOCHONDRIAL
AT5G09590	HSP70-2 , MTHSC70-2 , MITOCHONDRIAL
AT3G04120	GAPA-C , GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHID. C SUB
ATCG00480	HSP70 , HEAT SHOCK PROTEIN 70, HSP70
AT4G01850	SAM-2 , S-ADENOSILMETIONINA SINTETASA 2
AT4G13940	SAH1 , S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA HIDROLASA 1
AT5G06290	2-CYS PRX B , 2-CYS PEROXIREDOXINA B
AT2G39730	RCA , RUBISCO ACTIVASA
AT3G01500	SABP3 , SALICYLIC ACID-BINDING PROTEIN B-CARBONICO ANI
AT4G11650	OSM34 , OSMOTINA 34
AT1G32220	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT2G47710	A DENINA NUCLEÓTICO HIDROLASA ALFA
AT1G74910	KJC1 , KONJAC 1, RESPUESTA A CADMIO
DEFENSA-p25 T381A	
AT3G51680	SDR2 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 2
AT2G47440	SDR5 , DESHIDROGENASA/REDUCTASA CADENA CORTA 5
AT1G72610	GLP1 , GERMIN-LIKE PROTEINA 1,
AT5G20630	GLP3 , GERMIN-LIKE PROTEINA 3,
AT5G17170	ENH1 , ENHANCER SOS3-1, CALCINEURINA
AT3G04720	PR4 , PROTEÍNA RELACIONADA CON PATOGÉNESIS 4
AT3G08710	TIOREDOXINA H9
ATCG00480	SUBUNIDAD BETA , ATPSINTASA
AT3G12580	HSP70-4 , HEAT SHOCK PROTEIN 70
AT1G16030	HSP70B , HEAT SHOCK PROTEIN 70B
AT1G78380	GSTU19 , GLUTATION S-TRANSFERASA TAU 19
AT5G02500	HSPc70-1 , HEAT SHOCK COGNATE 70-1
AT5G09590	HSP70-2 , MTHSC70-2 , MITOCHONDRIAL
AT3G01500	SALICYLIC ACID-BINDING PROTEIN 3
AT4G37910	MTHSC70-1 , HEAT SHOCK PROTEIN 70-1 MITOCHONDRIAL
AT4G35220	CICLASA 2

TRANSPORTE-p25 T36	
AT5G24650	HP30-2 , IMPORTADOR tRNA MITOCONDRIAL
AT1G12520	CCS , CHAPERONA SUPEROXIDO DISMUTASA SOD1 COBRE
AT5G05010	CLATRINA , ADAPTADOR DE COMPLEJOS SUBUNIDAD MEDIA
AT5G55190	RAN3 , ATRAN3, RAN GTPASA 3
AT5G14040	MPT3 , TRANSPORTADOR FOSFATO 3 MITOCONDRIAL ,
AT4G00430	PIP1E , PROTEINA INTRINSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 1
AT2G37170	PIP2B , PROTEINA INTRINSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 2
AT4G35100	PIP3 , PROTEINA INTRINSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 3
AT4G39460	SAMC1 , S-ADENOSILMETIONINA TRANSPORTADOR 1
AT4G28390	AAC3 , ADP/ATP TRANSPORTADOR 3
CITOESQUELETO--p25 T36	
AT3G53750	ACT3 , ACTINA 3
AT5G09810	ACT7 , ACTINA 7
AT4G00680	ADF8 , FACTOR DESPOLIMERIZADOR DE ACTINA 8
AT3G46000	ADF2 , FACTOR DESPOLIMERIZADOR DE ACTINA 2
AT2G31200	ADF6 , FACTOR DESPOLIMERIZADOR DE ACTINA 6
AT1G75780	TUB1 , TUBULINA BETA-1 CADENA
AT4G14960	TUA6 , TUBULINA ALFA-6
AT5G17920	ATMETS , METIONINA SINTESIS
AT4G20360	RABE1B , RAB GTPASA HOMOLOGO E1B
TRANSPORTE-p25 T318A	
AT4G39460	SAMC1 , S-ADENOSILMETIONINA TRANSPORTADOR 1
AT4G28390	AAC3 , ADP/ATP TRANSPORTADOR 3
AT5G19760	TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL DI/TRICARBOXILATOS
CITOESQUELETO--p25 T318A	
AT5G09810	ACT7 , ACTINA 7
AT3G12110	ACT11 , ACTINA 11
AT4G14960	TUA6 , TUBULINA ALFA-6

3.3. Interactores diferenciales con proteínas componentes de los Fotosistemas I y II

Los virus de plantas alteran los procesos de fotosíntesis y producción de energía debido a la interacción de éstos con los orgánulos encargados de dichos procesos. La interacción de p25 con distintas proteínas mitocondriales y cloroplásticas sugiere su implicación en funciones como la fotorespiración o la fijación de carbono. Los fotosistemas son complejos macromoleculares cuyo ensamblaje, estabilidad y función dependen de distintas subunidades y factores extrínsecos. Los componentes principales de estos fotosistemas son las proteínas Psa (Fotosistema I, PSI) y Psb (Fotosistema II, PSII) que forman parte del núcleo catalítico, la subunidad citocromo b, las proteínas del complejo de captación de luz (LHC), las proteínas LMM y las proteínas extrínsecas del complejo OEC. Se ha visto que en las infecciones causadas por CTV se produce una disminución en la actividad de ambos fotosistemas debido a la interacción de proteínas virales con parte de sus componentes (Synkova *et al.*, 2006; Gandía *et al.*, 2007; Dória *et al.*, 2015).

Los cloroplastos tienen un papel fundamental en la patogénesis viral y en su propagación, a la vez que pueden actuar en rutas de defensa antivirales. Por ello, muchas proteínas de virus inducen una disminución en la cantidad de proteínas cloroplásticas mediante su interacción (Zhao *et al.*, 2016), por lo cual CTV también podría requerir estos orgánulos para poder infectar las células de forma eficaz. En este sentido, para la p25 de ambos aislados se han detectado posibles interacciones con proteínas del complejo LHC como LHCA1, LHCA3, LHCB1, LHCA4 y LHCB6 (CP24), así como con la proteína PsbA del PSII y CP26. Esta última, junto con CP24, se sabe que afecta a la organización del PSII, impidiendo el correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico (de Bianchi *et al.*, 2008).

Asimismo, tanto la p25 de T36 como la de T318A interaccionarían con la proteína PsbO del complejo OEC y otras proteínas del complejo LHC, mientras que p25-T36, además, también interaccionaría con la subunidad beta del citocromo b (PsaF), con la proteína PsaN del lumen de los tilacoides del PSI y con HCF136, proteína implicada en el ensamblaje del PSII (Lu,

2016). Por otro lado, para p25-T318A se detectaron posibles interacciones con PsaO, cuya interacción con otras proteínas virales produce la inducción de síntomas y la desorganización de los cloroplastos (Jang *et al.*, 2013), y con PsaG, una proteína de la membrana tilacoidal implicada en la estabilidad del PSI y en la interacción con plastocianina (Jensen *et al.*, 2002). Por otra parte, la posible interacción de ambas p25 con PsaK estaría directamente relacionada con mecanismos de defensa de la planta, ya que se ha descrito su implicación en la respuesta antiviral frente a infecciones producidas por potyvirus (Jiménez *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2016). Es interesante destacar que el silenciamiento de la subunidad K del fotosistema I o de subunidades OEC del fotosistema II permiten una mayor acumulación de virus como TMV y PPV (Bhat *et al.*, 2013).

3.4. Proteínas interactoras tipo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

La GAPDH es una proteína muy conservada y abundante que se localiza en el citoplasma celular, y que está implicada en la producción de energía y también en otros procesos celulares como apoptosis, endocitosis, transporte de tRNA, modulación del citoesqueleto, replicación y reparación del DNA o regulación transcripcional de las histonas (Sirover, 1999, 2005; Tristan *et al.*, 2011). Además, se ha visto que es capaz de unirse a regiones ricas en AU de virus de RNA como el del enanismo ramificado del tomate (TBSV) o el virus de la hepatitis A (HAV) (Dollenmaier y Weitz, 2003; Wang y Nagy, 2008).

Estudios previos han revelado que la GAPDH interviene en la regulación de la replicación de TBSV, de modo que en ausencia de ésta se inhibe la acumulación preferencial del gRNA viral (RNA de cadena positiva) en *N. benthamiana* (Wang y Nagy, 2008). Asimismo, también se ha descrito la participación de esta proteína en el proceso de replicación y movimiento célula-célula del virus del mosaico necrótico del trébol rojo (RCNMV) (Kaido *et al.*, 2014).

En las listas de ambas p25 aparecen las GAPA-1, GAPB y GAPC1 y C2, además en T36 también aparece la GAPA-2. La potencial interacción de p25-T36 y p25-T318A con estas enzimas podría regular la replicación de CTV a nivel celular, así como su participación en el movimiento viral.

3.5. Relevancia de proteínas interactoras de tipo factores de elongación

En eucariotas, el proceso de traducción requiere diversos factores proteicos no ribosómicos llamados factores de elongación (EF), entre los cuales se encuentran EF1A y EF1B (Le Sourd *et al.*, 2006). La proteína EF1A es una de las más abundantes en células eucariotas y se encarga de cargar los tRNA en los ribosomas durante el proceso de elongación de la traducción. Pero además esta proteína también se encarga del control de calidad de las nuevas proteínas sintetizadas, de su degradación dependiente de ubiquitina y de la organización de los filamentos de actina (Ejiri, 2002; Mateyak y Kinzy, 2010; Sasikumar *et al.*, 2012). También se ha descrito que, al igual que GAPDH, interviene favoreciendo la replicación de ciertos virus mediante su interacción con el gRNA o con la RdRp del virus como el del mosaico amarillento del nabo (TYMV) (Matsuda y Dreher, 2004), el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Zeenko *et al.*, 2002), el virus del mosaico del nabo (TuMV) (Yamagi *et al.*, 2006), TBSV (Sasvari *et al.*, 2011) o el virus X de la patata (PVX) (Hwang *et al.*, 2015). Diversos factores de elongación de tipo eEF1 son esenciales para la replicación, traducción de su RNA, unión a sus polimerasas o extremos del RNA de tobamovirus, potivirus, timovirus, tombusvirus, bromovirus, potexvirus y otros virus de plantas. El éxito de infecciones como las de TMV y PVX depende de la interacción con eEF1a y/o eEF1B (Wang *et al.*, 2013, 2015).

En este sentido, la principal interacción de EF1A con la p25 de ambos aislados, y comparando con los resultados obtenidos de interacciones con otros virus de plantas, revelaría que este factor de elongación es esencial para la infección de CTV y que esta interacción es bastante frecuente en virus de RNA de plantas para facilitar su replicación.

Adicionalmente, en las listas de ambas p25 se observa una diferencia importante en los factores de elongación e iniciación de la traducción detectados, mientras en la p25-T36 se detectan un 83% de factores de elongación eEF y un 17% de iniciación eIF, en p25-T318A sólo se detectan los primeros.

3.6. Proteínas interactoras relacionadas con ATPasas y sus subunidades

Por ejemplo, en la lista de p25-T36 aparece la ATPC1 o CF1, que es la subunidad gamma de la ATP sintasa. Se ha descrito que la interacción transitoria entre la rubisco activasa (RCA) y la ATPC1 con proteínas de tobamovirus en los complejos de replicación (principalmente ricos en CPs) actúa como defensa antiviral al inhibir el movimiento intercelular o su acumulación intracelular (Bhat *et al.*, 2013), aunque no la de otros virus como PVX o TBSV. En el caso de la CP de T36, también se detecta la RCA como un potencial interactor, previamente observado en otros procesos de infecciones virales incluidas las inducidas por CTV (Feki *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2011; Di Carli *et al.*, 2010, 2012), lo que en suma indica proteínas de la planta que de forma habitual interaccionan en defensa antiviral durante infecciones principalmente susceptibles.

La subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial parece ser considerada un indicador de una interacción/infección susceptible. Es interesante destacar que ésta la encontramos en p25-T36. Además de su función en la fosforilación oxidativa también se describe como novedoso regulador de muerte celular (Chinasa *et al.*, 2011). De forma similar, sólo en T36 encontramos las subunidades delta y épsilon de la ATP sintasa del cloroplasto. Por otra parte, para ambas p25 se detecta la subunidad alfa de la ATP sintasa del cloroplasto (ATPA) también implicada en la respuesta de defensa y transporte de protones. Se ha descrito que diferencias en los niveles de esta subunidad están relacionadas con determinar las interacciones de tipo resistente o susceptible en begomovirus (TYLCV) (Huang *et al.*, 2016). También ambas podrían interaccionar con la subunidad 1 de la ATP sintasa ATP1, que está implicada en respuesta a citoquininas y estrés oxidativo.

3.7. Algunos interactores del huésped relevantes detectados diferencialmente en las listas de ambas p25

En la lista de posibles interactores de la p25 de T36 aparece la subunidad PBG1 del proteasoma 20S. La proteasa 20S es un elemento clave del complejo macromolecular ubiquinina/26S proteasoma o Ub/26S. Dicho complejo regula numerosos procesos

celulares como el desarrollo, la señalización hormonal o la senescencia y es una de las rutas más importantes de proteólisis en eucariotas. Se sabe que puede interferir en la traducción del RNA viral en las células infectadas, estando así implicado en la respuesta antiviral (Ballut *et al.*, 2005). Es interesante resaltar que se ha descrito previamente que la proteína supresora HCPro de potivirus interacciona en planta con diversas subunidades del complejo 20S proteasoma y que ello interfiere en su función (Jin *et al.*, 2007). La potencial interacción de p25-T36 con una de las subunidades del complejo 20S podría también interferir en las actividades enzimáticas de éste complejo, como un mecanismo de contradefensa viral durante la infección susceptible de T36.

Otros interactores diferenciales de la p25 de T36 serían un conjunto de proteínas intrínsecas de membrana plasmática, las acuaporinas o PIPs. En plantas, estas proteínas presentan una gran variedad de patrones de localización subcelular. Entre las observadas en la lista de p25-T36 destacan PIP 1E, PIP 2B y PIP3. Dichas acuaporinas se consideran proteínas adaptadoras de actina y reguladores importantes de la organización de la actina intracelular. Al tratarse de la CP del virus, la interacción con este tipo de proteínas podría ser esencial para el movimiento intracelular de CTV. Por otra parte, la interacción de la CP viral con estas proteínas podría incrementar la formación de poros de membrana y permitir un mayor flujo de agua que beneficie la infección viral.

En este sentido también hay que resaltar de forma importante las diferencias detectadas entre ambas p25 en su potencial interacción con componentes del citoesqueleto, tanto estructurales como relacionados con su organización/desorganización. Así, mientras ambas p25 podrían interactuar con la ACT7 y la tubulina alfa-6 (TUA6), la p25 de T36 lo haría con la ACT3 (también con la 1), la TUB1 y TUB8 y la p25-T318A con la ACT11. En este sentido, el número de interactores potenciales de microtúbulos sería mayor para la p25 de T36. Sin embargo, lo más destacable es el hallazgo de 3 factores de despolimerización de la actina, ADF2, 6 y 8, exclusivamente en la lista de la p25 de T36. La regulación de estos factores por parte de las proteínas de algunos virus se ha descrito como necesaria para su movimiento sistémico con éxito, como es el caso de la poliproteína P3 del virus del mosaico de la haba de soja (SMV), cuya interacción con ADF2 es necesaria para su movimiento

(Lu *et al.*, 2015). De ser así, en el caso de CTV esta sería una diferencia clave a nivel intracelular entre la función potencial ejercida por la p25 de T36 y la de T318A, y podría determinar en parte su éxito infeccioso.

Entre las moléculas estructurales y de unión a RNA con las que interaccionarían las p25, un porcentaje muy elevado se dirige a componentes de las subunidades ribosomales, tanto de la subunidad grande 60S (proteínas RPL) como de la pequeña 40S (RPS). Aunque algunas son compartidas entre ambas como la RPS11, RPS15C, RPS19, RPS8 o RPL9, la mayoría sólo se encuentran para p25-T36 (como RPS2, RPS5 y RPS5B, RPS7e, RPS16A, RPS14C, RPS12/23, RPL24 o RPL13), mientras que la RPS4, RPS3 y RPS3A sólo se observan en T318A. Es de destacar que esta última juega un papel importante en la transformación y muerte celular. En general, la mayor interacción del aislado T36 con este tipo de proteínas de ambas subunidades ribosomales podría favorecer un mejor reclutamiento de éstas para traducir con mayor eficacia sus proteínas virales.

En el caso de p25-T36 se han detectado posibles interacciones con MSD1, superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial; con CCS, chaperona de cobre para la SOD; y con BAS-1 like cloroplástica 2-cisteín peroxiredoxina, mientras que como oxidoreductasas diferenciales de la p25-T318A se detectó por ejemplo la tioredoxina TRX9. Todas ellas están implicadas en el metabolismo celular y se ha visto que ciertas disfunciones pueden provocar alteraciones graves, como es el caso de la MSD1, cuya disminución provoca un menor crecimiento radicular (Morgan *et al.*, 2008). Así pues, la posible interacción de p25 con algunas de estas proteínas podría causar síntomas como el enanismo debido al tamaño reducido de las raíces del huésped y a otras alteraciones metabólicas que provocarían un déficit de energía.

Hidrolasas de tipo serin-peptidasa como las proteasas CLP dependientes de ATP, CLPP4, CLPR4 y CLPP5 se han detectado sólo en T36, mientras que la CLPP1 en ambas p25. Estas enzimas son esenciales para el crecimiento y desarrollo en plantas y la función cloroplástica. Constituyen un complejo macromolecular implicado en eliminar las proteínas dañadas, con mal plegamiento o innecesarias para mantener la homeostasis de proteínas celulares. Las CLP4 y 5 son subunidades catalíticas de la CLP del cloroplasto

(Olivares *et al.*, 2011), de modo que alteraciones en su equilibrio (por ejemplo como consecuencia de su interacción con la CP viral) pueden alterar el ensamblaje del complejo y producir desregulaciones funcionales.

Un interacto diferencial observado en la lista de p25-T318A es la BIP2, una proteína precursora de las HSP70 situada en el retículo endoplásmico (ER) y que tiene un papel importante en la translocación de proteínas a través de la membrana del ER. Además, también interviene en el plegamiento de las proteínas y en el proceso de revisión de proteínas con un plegamiento aberrante y, por tanto, no funcionales (Anelli y Sitia, 2008). Teniendo en cuenta que el aislado T318A solo es capaz de replicarse en hojas de *N. benthamiana* y que su p25 no se detecta mediante ensayos ELISA, es probable que la interacción con BIP2 se deba al mal funcionamiento de la proteína.

La proteína p25-T36 también muestra una posible interacción diferencial con la Ran3-GTPasa, una proteína encargada de separar las importinas de las proteínas transportadas al núcleo. Es probable que la interacción de p25 con Ran3 no sea directa, sino que se habría purificado como parte del complejo p25-Importina-Ran3. No obstante, la diferente localización observada para ambas p25, siendo p25-T36 nuclear, estaría en concordancia con esta interacción, más teniendo en cuenta que no hemos localizado ninguna señal NLS en la proteína. Teniendo en cuenta la localización subcelular nuclear tan eficiente de la p25 de T36, su interacción con importinas o complejos RAN3-importinas podrían ser los responsables de su transporte al núcleo. Además de esta Ran3-GTPasa, otro posible interacto de p25-T36 detectado fue CFIS2, un factor implicado en la maduración de los pre-mRNAs celulares y en su poliadenilación, y que tiene una localización nuclear. En este sentido, es posible que p25 secuestre esta proteína con el fin de favorecer la maduración de los RNAs propios de CTV e inducir su traducción.

Otro posible interacto importante a resaltar es la histona 2B (H2B) observada para p25-T36. Dicha histona está implicada en el ensamblaje del nucleosoma en el núcleo que permite la compactación del DNA en cromatina y, por tanto, es clave en la regulación de la transcripción. El hecho de que esta p25 pudiera interactuar con dicha histona implicaría una posible acción

reguladora de p25 sobre la transcripción de determinados genes secuestrando histonas como hacen otras proteínas virales como la AL1 de geminivirus, que se une a la histona H3 alterando la estructura de los cromosomas y, por tanto, modificando la expresión génica del huésped (Bass *et al.*, 2000). Este hecho sería factible si tenemos en cuenta la localización nuclear de la p25 de T36 detectada en esta tesis.

3.8. Interactores diferenciales implicados en rutas de defensa y resistencia.

Un conjunto de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y las rutas de defensa de la planta se detectaron para ambas p25, que compartirían un mecanismo de acción-interacción celular similar en este sentido. Además de las clásicas peroxidasas y piruvatos deshidrogenasas, se encuentran 2 proteínas tipo 24K germin-like, la GLP1 y GLP3, con función SOD y que intervienen frente a invasiones por patógenos generando H_2O_2 , una molécula de señalización en la ruta de defensa que incluye la muerte celular o un aumento del revestimiento de la pared celular (Yamahara *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2004; Laloi *et al.*, 2004). De este modo, la interacción entre ambas proteínas impediría o disminuiría la activación de estos mecanismos de defensa de la planta en beneficio de CTV. También se han detectado las deshidrogenasas de cadena corta SDR2 y SDR5 o la ENH1 o potenciador de SOS3-1, un tipo de subredoxina, que es un factor de unión a calcio de la familia de la calcineurina implicado en regular la homeóstasis de metales y la respuesta de estrés oxidativo. Forma parte de complejos en las membranas tilacoidales de los cloroplastos.

Las glutation S transferasas (GST) son enzimas implicadas en procesos de detoxificación, regulación redox, estrés oxidativo y desempeñan una función defensiva en la resistencia de la planta a las infecciones por patógenos. Es de destacar que el número de enzimas distintas de este tipo con las que la p25-T36 podría interactuar es mayor, la GST-TAU8, TAU15 y TAU19, mientras que sólo la última es compartida con la p25 de T318A. De ellas la GST-TAU8 se conoce como un marcador de respuesta defensiva temprana (Perl-Treves *et al.*, 2004) frente a patógenos compatibles. Además, se ha descrito que cambios en los niveles de ascorbato y

glutation por acción de enzimas como la SOD, catalasas, peroxidasas, glutacion reductasa o transferasa, afectan el nivel redox celular, intervienen en el estrés oxidativo y que la elevación de sus niveles se ha relacionado con la respuesta sistémica adquirida y defensa antiviral (Fodor *et al.*, 1997).

Sin embargo, se han detectado otros interactores diferenciales entre ambas p25 relacionados con procesos de defensa y patogénesis, especialmente el hallazgo de la proteína relacionada con la patogénesis PR4 y la tiorredoxina THX9 para la p25 de T318A. Los virus de RNA activan típicamente la ruta de defensa del SA, y dentro de ella algunas PR son marcadores típicos de esta ruta. La PR4 activaría la respuesta hipersensible de la planta (HR) tal como se ha descrito para infecciones causadas por tobamovirus (Guevara-Morato *et al.*, 2010). En el caso de infecciones de TuMV se ha descrito como una señal de interacción incompatible (Vlot *et al.*, 2009). Es interesante resaltar la proteína ciclasa 2 que aparece en la lista de p25-T318A, que se ha implicado en la biosíntesis del JA durante la infección por geminivirus, con un papel en apoptosis-PCD. Además, un trabajo previo realizado por Neus Gómez en nuestro grupo, ha demostrado que las interacciones incompatibles de resistencia de CTV en naranjo amargo están mediadas por la ruta del SA y el silenciamiento génico (Gómez-Muñoz *et al.*, 2016). Hay que indicar que en la lista de p25-T36 aparece la ACO1 como interactor potencial, y en este caso sería activando la ruta defensiva del jasmónico.

Las HSP juegan un papel fundamental durante el ciclo vital de los virus, participando en procesos como la replicación, el ensamblaje del virión o el movimiento intracelular (Mayer, 2005). Entre ellas se encuentra la familia de las HSP70, chaperonas moleculares muy abundantes y conservadas encargadas del plegamiento de las proteínas tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés biótico o abiótico (Bukau *et al.*, 2006; Hartl *et al.*, 2011). La interacción de ambas p25 con proteínas HSP70 del citosol y de los orgánulos (HSP70c y HSP70mit) del huésped podría sugerir la implicación de éstas en favorecer la replicación y/o ensamblaje del virión, tal y como se ha descrito para la replicasa del virus del mosaico del trigo chino (CWMV) (Yang *et al.*, 2017) o la proteína p27 de RCNMV (Mine *et al.*, 2012) y ser relevante en las infecciones de begomovirus (Lozano-Durán *et al.*, 2011).

Por otra parte, el sistema HSP70-HSP90 tiene un papel muy importante en la formación del complejo RISC durante el proceso de defensa basado en el silenciamiento génico de RNA (Smith *et al.*, 2009), y se ha descrito que la HSP90 facilita el ensamblaje de los siRISC (Iki *et al.*, 2010). Por otro lado los complejos HSP70-HSP90 funcionan como motores importantes en la traslocación de proteínas y homeóstasis de iones al interior del estroma del cloroplasto. En el listado de la p25 de T36 aparece la HSP93V (CLPC1), una proteasa CLP implicada en el importe/transporte de proteínas al interior del cloroplasto e importante en la respuesta a citoquininas. Por otro lado, la proteína CRB, que aparece en ambas p25, es una proteína de unión a RNA del cloroplasto (CSP41B) que actúa como co-chaperona e interacciona con la HSP70 y es esencial para el funcionamiento adecuado del orgánulo (Qi *et al.*, 2012). La posible interacción con la CP produciría algunas de las alteraciones observadas en estos orgánulos durante las infecciones naturales.

La proteína GOX1 (glicolato oxidasa) sólo se ha observado en p25-T36. Dicha enzima tiene una función clave en la ruta de señalización por H_2O_2 y defensa, actuando en el proceso fotorespiratorio en el que los subproductos son importantes para la señalización por ROS, una de las rutas de defensa frente a patógenos.

Otra diferencia destacable entre ambas p25, estaría relacionada con la posible interacción con componentes del ciclo de la S-adenosilmetionina. En p25-T36 se detecta la SAM2 (sintasa) y la SAH1 (hidrolasa), implicadas en procesos de desarrollo embrionario, procesos de apoptosis celular y silenciamiento de la cromatina dependiente de metilación. La SAH1 tiene una función importante en el silenciamiento post-transcripcional. Su función se requiere durante el crecimiento y desarrollo de la planta, y actúa de forma coordinada con la adenosin kinasa (ADK) para reciclar los productos del ciclo de metilación. Ambas son capaces de localizarse en el citosol y en el núcleo, lo que facilitaría su posible interacción también con la CP de T36 (Lee *et al.*, 2011). Si bien en ambas p25 se detecta como interactor potencial el transportador de la S-adenosilmetionina, SAMC1.

A pesar de que en el subconjunto de listas reducidas mostradas en este capítulo no aparece ninguna proteína AGO como interactor potencial de la p25, hay que indicar que en las listas

iniciales obtenidas con el programa PILOT sí aparecía la AGO4, aunque con un valor de abundancia bajo y un valor emPAI por debajo del umbral utilizado para el filtrado de las listas iniciales. En este sentido hay que indicar que a lo largo de la tesis de la doctoranda Neus Gómez (tesis en fase de escritura final), se ha obtenido y analizado el interactoma de la p20 de T36 y T318A con proteínas del huésped *N. benthamiana* siguiendo la misma aproximación proteómica que en este capítulo. Las proteínas AGO 1, 2 y 4 aparecían en los listados de ambas p20 con unos valores de abundancia y relevancia importante (Gómez-Muñoz *et al.*, en preparación). Durante su tesis Neus Gómez ha comprobado la potencial interacción de algunas de estas AGO con las p20 y p25 de T36 y T318A, destacando que la p25 de ambos aislados interacciona con la AGO4 aunque dicha interacción no es muy fuerte. Dicha interacción iría en la línea de los resultados de supresión mostrados en el Capítulo 2 de esta tesis.

En general, los resultados obtenidos analizando el interactoma de las p25 de los aislados T36 y T318A con proteínas del huésped *N. benthamiana*, ha mostrado una visión integral de las posibles funciones y mecanismos que estas proteínas podrían ejercer a nivel intracelular. Adicionalmente, el hecho de haber encontrado posibles interactores diferenciales entre ambas, algunos de ellos claramente relacionados con la localización subcelular diferencial mostrada para estas proteínas en el Capítulo 1, sugiere las posibles bases de diferencia en su mecanismo de acción o éxito en el establecimiento de una infección susceptible. Entre éstas destacarían la interacción diferencial con componentes de la estructura y dinámica del citoesqueleto, que podrían permitir el transporte de la p25 de T36 en relación a la de T318A, la interacción con componentes nucleares relacionados con la regulación de la transcripción, inactivación con mayor éxito de rutas de defensa de la planta relacionadas con el silenciamiento mediado por metilación, ruta del jasmónico o señalización por ROS o la activación exacerbada de una respuesta de estrés a través de proteínas relacionadas con la patogénesis o de fenómenos de apoptosis en el caso de la p25 de T318A.

En cualquier caso, los resultados que se muestran en este capítulo son un punto de inicio muy interesante para comprobar mediante un sistema de doble híbrido en levadura o BiFC algunas

de las interacciones clave detectadas como diferenciales entre ambas p25.

Hasta ahora no se había dispuesto de una información tan vasta y al mismo tiempo tan detallada que analizase la respuesta diferencial primaria entre proteínas de dos aislados patogénicamente diferentes de CTV en su huésped, sin incluir otros factores que afectan dichas interacciones como ocurre utilizando huéspedes cítricos (que quedan más sesgados y complejos al intervenir también factores tan complejos como la variedad, la combinación variedad/patrón, etc.).

CAPÍTULO IV

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, numerosas enfermedades causadas por virus emergentes han resultado devastadoras. La mayoría de ellas están inducidas por virus de RNA como el retrovirus del sida (HIV-1/AIDS), el coronavirus SARS o los nuevos virus recombinantes de la gripe, *Influenza A virus* (IAV) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Peiris *et al.*, 2003; Trombetta *et al.*, 2015). En plantas, la emergencia continua de nuevos virus o aislados, algunos de los cuales sobrepasan las resistencias utilizadas en muchos cultivares, conllevan costes económicos muy elevados (Navas-Castillo *et al.*, 2011; Roossinck, 2008).

La capacidad de los virus de RNA de evolucionar rápidamente es consecuencia de sus altas tasas de mutación y recombinación (Chare y Holmes, 2004; Nagy, 2008). Además, sus genomas altamente compactos y de tamaño reducido, con secuencias intergénicas muy pequeñas o incluso inexistentes debido al solapamiento de genes (Lynch, 2006; Belshaw *et al.*, 2007), permite aumentar el número de proteínas que el virus codifica sin modificar prácticamente su tamaño (Scherbakov y Garber, 2000; Lillo y Krakauer, 2007; Chung *et al.*, 2008). Como consecuencia la mayoría de estas proteínas son multifuncionales y muestran constricciones evolutivas para el cambio en muchos de sus dominios funcionales.

Parámetros genéticos poblacionales, como la tasa de mutación, modelan este tipo de genomas (Lynch, 2006). De hecho, existe una correlación negativa entre la tasa de mutación y el tamaño del genoma (Drake *et al.*, 1998), de manera que a menor tamaño del genoma, más elevada es la tasa de mutación (Drake *et al.*, 1998; Gago *et al.*, 2009) (Fig. 1).

Esta propiedad evita, en gran medida, que se acumulen mutaciones deletéreas. Como ejemplo, los virus de dsRNA son mucho más grandes debido a su lenta replicación y a su menor tasa de mutación (Holmes, 2003) (Fig. 1)

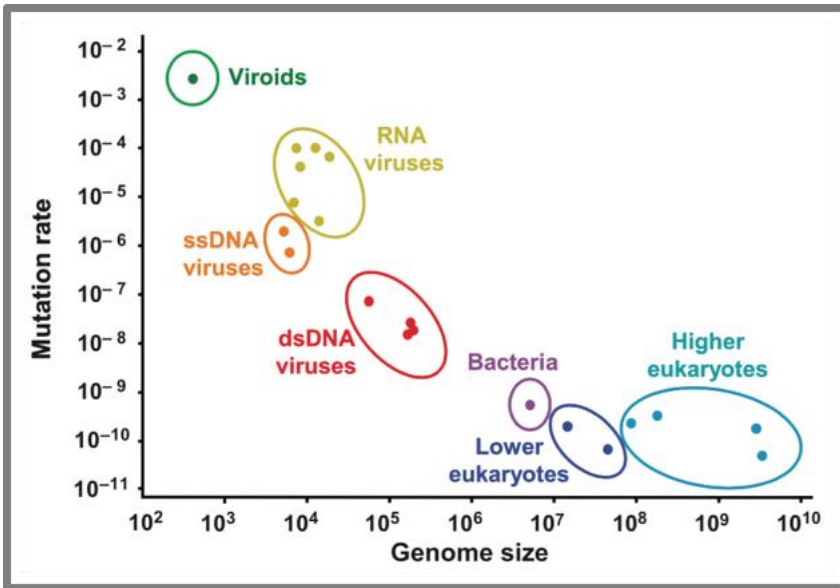


Fig. 1. Gráfico que muestra la relación entre el tamaño del genoma de distintos organismos o entidades biológicas y su tasa de mutación (Gago *et al.*, 2009).

La primera tasa de mutación calculada para un virus de plantas fue la del virus del mosaico del tabaco (TMV) que se estableció en 1.8×10^{-5} sustituciones por nucleótido y ronda de replicación (Malpica *et al.*, 2002). Posteriormente, se calculó esta tasa para otros virus como el del grabado del tabaco (TEV), con valores que van desde 2.96×10^{-5} hasta 4.75×10^{-5} (Sanjuán *et al.*, 2009; Tromas y Elena, 2010), y del virus del mosaico del nabo (TuVM), con una tasa de mutación de 2.64×10^{-6} (de la Iglesia *et al.*, 2012).

La evolución de los virus de RNA es el resultado de la interacción entre éstos, sus huéspedes y el ambiente. Estos virus pueden evolucionar más rápidamente que los de DNA debido a que las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) implicadas en su replicación, tienen tasas de error mayores que las DNA polimerasas dependientes de DNA (Fig. 1), consecuencia de su baja o nula actividad correctora de errores (Domingo y Holland, 1997; García-Arenal y Fraile, 2011). Esta capacidad de evolución les permite infectar un gran número de huéspedes y adaptarse a condiciones cambiantes del medio, capacidad que se ve adicionalmente

favorecida por el elevado tamaño de las poblaciones y por los cortos tiempos de generación (Domingo, 2000; Elena y Sanjuán 2007; Holmes, 2009).

Los genomas de RNA no existen como una secuencia única de nucleótidos, sino que las poblaciones virales son dinámicas y contienen un gran número de variantes de secuencia (espectro de mutantes).

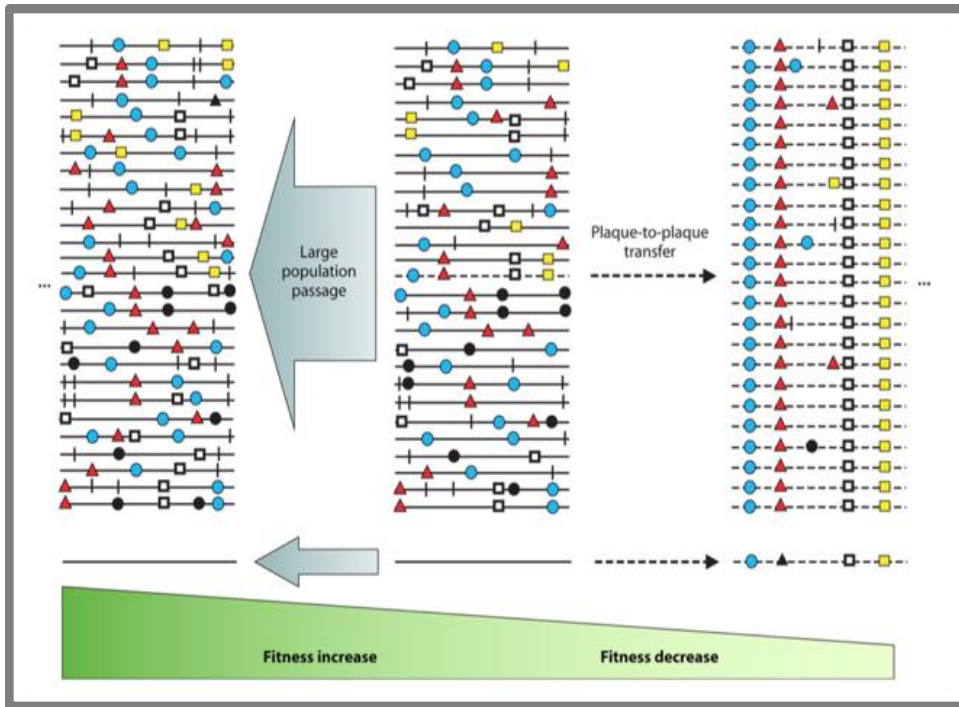


Fig. 2. Estructura y dinámica de las cuasispecies virales. Efecto del tamaño poblacional sobre la eficacia viral. Las líneas horizontales con símbolos de colores representan la distribución de mutantes o variantes de secuencia de la cuasispecie. Se observa un aumento en la eficacia biológica cuando se realizan pases con tamaños de población grandes, mientras que esta eficacia disminuye cuando se producen cuellos de botella poblacionales (Domingo *et al.*, 2012).

Esta estructura poblacional dinámica, formada por un número elevado de variantes de secuencia diferentes en una o pocas posiciones nucleotídicas (Fig. 2) y relacionadas filogenéticamente entre sí, se denomina cuasispecie (Eigen y Schuster, 1977, 1981),

y dota a la población de una gran flexibilidad frente a cambios en el ambiente. La distribución de estas variantes suele centrarse en torno a una secuencia principal o mayoritaria, que es la de mayor eficacia biológica, aunque no siempre es así. Dicha secuencia puede permanecer estable durante largos períodos de tiempo, cuando las cuasiespecies están bien adaptadas, o bien ser sustituida por otra cuando hay perturbaciones en el medio que hacen que nuevas secuencias mutantes tengan mayor probabilidad de adaptarse al nuevo ambiente (Domingo *et al.*, 1978; Steinhauer *et al.*, 1989; Domingo y Holland, 1997) (Fig.2).

Los cambios drásticos en los tamaños poblacionales de las cuasiespecies tienen efectos muy importantes en su variabilidad y eficacia biológica, así por ejemplo, pases seriados en placa utilizando tamaños poblacionales grandes en un ambiente controlado suelen producir un aumento de eficacia (Escarmís *et al.*, 1999; Lorenzo-Redondo *et al.*, 2011), mientras que cuellos de botella poblacionales que causan disminuciones drásticas en el tamaño de las poblaciones producen el efecto contrario (Duarte *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993; Li y Roossinck, 2004; de la Iglesia y Elena, 2007; Escarmís *et al.*, 2009) (Fig. 2). Este último fenómeno está asociado al concepto del trinquete de Müller (Müller, 1964). Dichos cambios poblacionales se reflejan en la estructura de las cuasiespecies, más o menos complejas, y en la secuencia consenso de las mismas (Fig.2).

Fuentes de variación genética en los virus de RNA

La principal fuente de variación genética en los virus es la **mutación**, es decir la incorporación en la nueva cadena sintetizada durante la replicación de nucleótidos ausentes en la cadena molde (Roossinck, 2003; Moya, 2004). Este fenómeno es el resultado de la prácticamente nula actividad correctora de las RdRp y puede conllevar: transiciones (una base púrica o pirimidínica es sustituida por otra del mismo tipo) y transversiones (una base púrica es sustituida por una pirimidínica, o viceversa), aunque bioquímicamente son más fáciles de producir las primeras. Además, las mutaciones en regiones codificantes pueden ser sinónimas (no producen cambio de aminoácido) o no sinónimas (producen cambios de aminoácido). La tasa de mutación estimada en virus de RNA es

mucho más elevada que en los de DNA y oscila entre 10^{-6} y 10^{-4} (Sanjuán *et al.*, 2010) (Fig. 1), lo que equivaldría a una mutación por genoma y ronda de replicación. No obstante, existe mucha variación en las tasas de mutación estimadas según el virus estudiado, por ejemplo entre los virus de RNA de plantas hay géneros como el de *Tobamovirus* que son muy estables (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991), mientras que otros como *Cucumovirus* son más variables (Roossinck, 1997).

La mayor parte de las mutaciones que aparecen en las poblaciones virales son deletéreas o letales (Sanjuán, 2010), lo que puede conllevar un efecto negativo sobre la eficacia del virus. Sin embargo se ha observado que este efecto negativo suele ser pequeño sobre la población viral a pesar de que haya muchas moléculas susceptibles de sufrir mutaciones (Elena, 2012).

Por otro lado, la **recombinación** también genera diversidad genética al intercambiar durante la replicación fragmentos genómicos entre las diferentes variantes de secuencia (o entre aislados distintos del mismo virus), y es una fuente de variación importante para la evolución de algunos géneros de virus de RNA de plantas (Roossinck, 1997; García-Arenal *et al.*, 2001; Chare y Holmes, 2006). La recombinación es capaz de modificar las propiedades biológicas de los virus, generando como consecuencia nuevas cepas con potencial para infectar nuevos huéspedes (Fernández-Cuartero *et al.*, 1994). Además, en géneros virales como *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus* y *Begomovirus* se han detectado eventos de recombinación (Sanz *et al.*, 1999, 2000; Navas-Castillo *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2005; García-Andrés *et al.*, 2006; Escriu *et al.*, 2007). En closterovirus como CTV, la recombinación es responsable de la aparición de nuevos aislados con propiedades biológicas diferentes y de una población muy diversa de RNAs defectivos con distintos tamaños (Moreno *et al.*, 2008).

La **selección** es un fenómeno direccional por el que las variantes de secuencia o genotipos que confieren una ventaja adaptativa en un ambiente determinado sobre el conjunto del resto de la población, aumentan su frecuencia en la misma (selección positiva). Por el contrario, las variantes o genotipos peor adaptadas que reducen su eficacia frente al resto disminuyen su frecuencia (selección negativa), y en la mayoría de los casos desaparecen

(Freeman y Herron, 2002). En los virus de plantas, el análisis de sus secuencias revela una selección contra los cambios de aminoácido, de modo que los cambios sinónimos son más probables que los no sinónimos (García-Arenal *et al.*, 2001). La eliminación o purga de estas mutaciones deletéreas en las poblaciones virales actúa como una selección purificadora o negativa, que es la que se observa más habitualmente.

Por contra, la **deriva genética** habitualmente ocurre cuando el tamaño poblacional es pequeño, de modo que no todas las variantes son capaces de replicarse y dar lugar a una nueva generación, reduciendo así la variabilidad genética y la eficacia biológica (Duarte *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993; Novella, 2004; Li y Roossinck, 2004; de la Iglesia y Elena, 2007; Escarmís *et al.*, 2009). Esta alteración en la transmisión de los rasgos genéticos a nuevas generaciones es totalmente al azar. Los cuellos de botella suelen ser frecuentes en el ciclo infeccioso de los virus durante su transmisión horizontal o vertical entre huéspedes (Zwart *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 2014) o por vectores, al colonizar nuevas áreas geográficas o durante la colonización de nuevos tejidos de la planta en el proceso de infección (Tromas *et al.*, 2014). En el caso de CTV se producen habitualmente en las transmisiones por injerto o pulgón a nuevas plantas o huéspedes cítricos (Moreno *et al.*, 2008).

Por último, la migración o **flujo genético** consiste en el movimiento de alelos entre poblaciones. Este proceso ha sido poco estudiado en poblaciones virales, pero se ha observado por ejemplo en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Miralles *et al.*, 1999; Frost *et al.*, 2001; Cuevas *et al.*, 2003). Además, debido al tráfico de material propagativo de cítricos entre regiones lejanas, las estructuras poblacionales de CTV y otros virus de cítricos distantes geográficamente, son muy similares (Rubio *et al.*, 2001, 2013; Martín *et al.*, 2006).

La **robustez genética** hace referencia a la capacidad de mantener un fenotipo estable frente a perturbaciones en el ambiente o el genotipo. Los virus de RNA pueden resistir frente a estas perturbaciones gracias a sus elevados tamaños poblacionales, a la recombinación, al reordenamiento génico y a la complementación en el caso de co-infecciones con otros virus (Elena *et al.*, 2006; Elena, 2012; Lalic y Elena, 2012; Lauring *et al.*, 2013; Cervera *et al.*, 2016).

Además, según el modelo de cuasiespecies, la selección aumenta la robustez genética debido a que las tasas de mutación hacen que las poblaciones virales se desplacen en el paisaje adaptativo hacia picos más anchos donde el efecto de las mutaciones es neutral (Wilke y Ronnewinkel, 2001). Este fenómeno se conoce como “supervivencia del mediocre” (*survival of the flattest*, en inglés) (Schuster y Swetina, 1988) y se ha observado experimentalmente en virus y viroides (Codoñer *et al.*, 2006) cuando los genotipos más robustos (pe. las mutaciones son neutrales), a pesar de tener tasas de replicación más bajas, producen fenotipos igualmente eficaces y que compiten mejor con los menos robustos (Codoñer *et al.*, 2006; Sanjuán *et al.*, 2007).

Variabilidad genética y evolución de virus de RNA de plantas: CTV

En CTV se ha observado que la secuencia nucleotídica de su proteína de cubierta p25 (Silva *et al.*, 2012) muestra una tasa de evolución muy baja, equivalente a la de los virus de RNA con menor valor para esta variable. A pesar de considerarse un virus de evolución lenta, CTV ha sufrido a lo largo del tiempo eventos de recombinación homóloga en distintos genes (Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999, 2005; Rubio *et al.*, 2001, 2013; Sambade *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2009) que podrían explicar la alta variación biológica y molecular existente entre los diversos aislados caracterizados (Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2009). Asimismo, la frecuente formación de RNAs defectivos también se ve favorecida por eventos de recombinación heteróloga (Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995, 2000; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999; Che *et al.*, 2002, 2003). Estos datos sugieren que la recombinación sería un mecanismo importante en la evolución de las poblaciones de CTV.

El estudio de la variabilidad genética y evolución de los virus de plantas es importante para el desarrollo de estrategias de control adecuadas, ya que en muchos casos las medidas adoptadas no son eficaces debido a la rápida capacidad de evolución y a la diversidad genética de las poblaciones virales (García-Arenal y McDonald, 2003).

Además, los virus representan un excelente modelo para el estudio de la evolución experimental debido a la sencillez de sus genomas y a su fácil manejo, gracias a lo cual pueden conocerse en mayor profundidad las bases moleculares del proceso adaptativo (Domingo, 2006; Elena *et al.*, 2007; Buckling *et al.*, 2009). Una de las técnicas que permiten este tipo de estudios es la evolución experimental de virus mediante pases seriados en plantas. Estos ensayos se han utilizado en los últimos años para abordar numerosos estudios sobre algunos de los principios fundamentales responsables de la evolución de estos patógenos. Se ha conseguido así información muy relevante sobre las tasas de transmisión, mutación y recombinación, las características de las poblaciones de mutantes y su dinámica, los procesos de selección implicados, el papel de la deriva genética, la adaptación a ambientes o huéspedes distintos, el potencial evolutivo, la virulencia y las eficacias biológicas, y los efectos de la epistasia y pleiotropía en dicha eficacia (Elena, 2016).

De manera más específica, se han analizado las tasas de transmisión, los niveles de acumulación, los efectos sobre el crecimiento de la planta y la virulencia para el virus del mosaico del pepino (CMV) en *Arabidopsis thaliana* (Pagán *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha examinado la relación entre la evolución del TMV y mutantes del citoesqueleto de plantas de *A. thaliana*, experimentos en los que se ha mostrado que estos mutantes inducen cambios genéticos en el virus correlacionados con una mayor eficiencia en la propagación de la infección (Peña *et al.*, 2014) (Fig. 3).

Otros experimentos se han llevado a cabo en *Nicotiana tabacum*, donde se han estudiado diversos aspectos de la evolución mediante pases seriados, del TEV. En ellos se ha observado la pérdida de un gen foráneo como el de la GFP, que el virus expresaba de forma heteróloga, a lo largo del tiempo detectándose sucesos de evolución convergente (Zwart *et al.*, 2014). En otro estudio, en el que se evolucionaron 10 linajes independientes de TEV en cuatro huéspedes distintos, los resultados revelaron una adaptación local: el virus aumentó su infectividad (Fig. 4) y virulencia en el huésped donde se había inoculado y la disminuyó en el resto. Analizando la secuencia consenso de los genomas evolucionados se determinó que este efecto se debía a la existencia de mutaciones beneficiosas específicas de huésped (Bedhomme *et al.*, 2012).

Recientemente, utilizando poblaciones evolucionadas del TEV, se ha abordado la robustez, la exploración del paisaje adaptativo y el efecto del huésped en los cambios de eficacia en dicho paisaje (Cervera *et al.*, 2016).

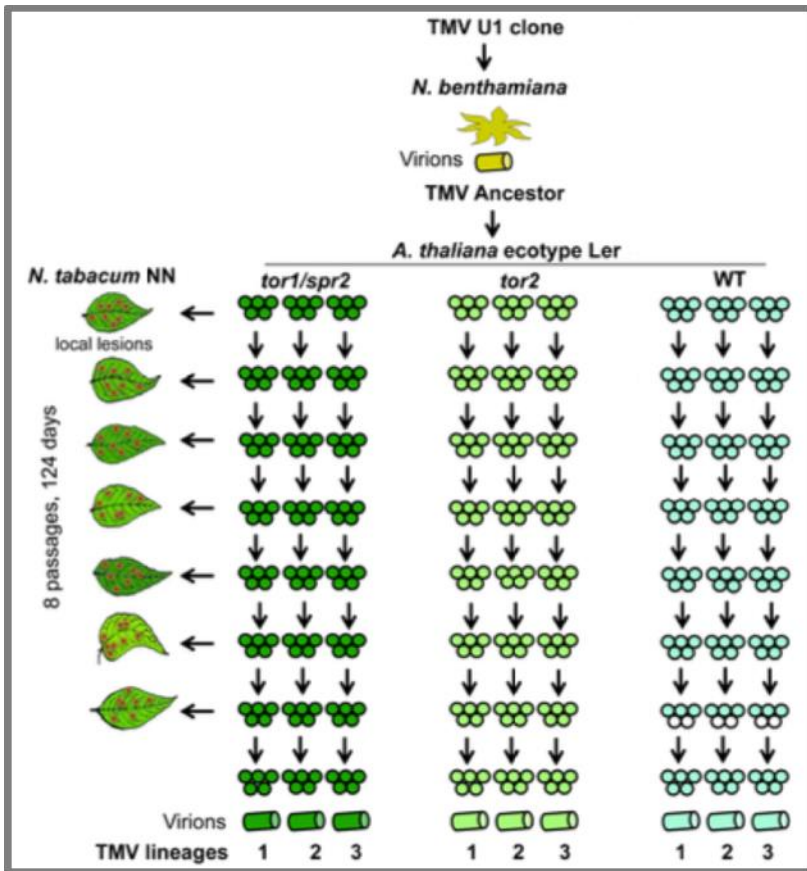


Fig. 3. Ejemplo de experimento de evolución experimental del virus del mosaico del tabaco (TMV) en plantas de *A. thaliana* mediante pases seriados. Tomado de Peña *et al.*, 2014.

Con la obtención del clon completo del aislado T36 de CTV, en nuestro laboratorio también se llevaron a cabo los primeros experimentos de pases seriados en cítricos para estudiar su variabilidad y evolución partiendo de una población clonal de CTV (P. Moya, tesis doctoral, 2010).

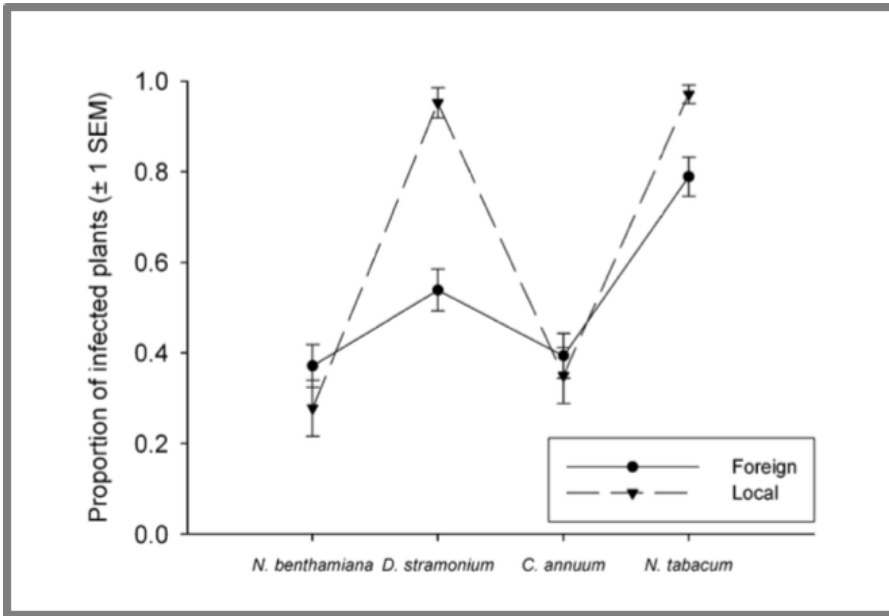


Fig. 4. Adaptación local al huésped mediante evolución experimental. El gráfico representa la infectividad local (triángulos) y externa (círculos) de TEV en las cuatro plantas huésped. Tomado de Bedhomme *et al.*, 2012.

Estos experimentos consistieron en pases sucesivos mediante el injerto de un aislado clonal de T36 en cítricos (procedente de la infección con un clon infeccioso), desde plantas de lima Mexicana a plantas sanas de diversos huéspedes susceptibles y de un huésped parcialmente resistente. Los resultados de la evolución mostraron una gran estabilidad de las poblaciones de CTV en los huéspedes sensibles a lo largo de los pases durante cuatro años, mientras que en naranjo amargo (el huésped resistente) se detectaron cambios muy importantes en la población viral. Desde el primer pase, se detectaron en los dos genes analizados variantes de secuencia muy divergentes de las de T36 y relacionadas filogenéticamente con las secuencias consenso de aislados agresivos y suaves del virus, que son muy dispares respecto al aislado T36. Y este fenómeno ocurrió en réplicas biológicas del mismo pase así como a lo largo de los pases seriados. Sin embargo, a lo largo de la evolución (4-5 años), la secuencia consenso del aislado de partida T36 volvió a observarse como mayoritaria en la

mayoría de las poblaciones. A pesar de ello, en éstas se mantuvieron variantes de secuencia divergentes a T36, que convergieron con las de los aislados suaves y agresivos o se encontraban en el tránsito de evolución entre ellas. Todos estos datos sugieren por una parte, que en un huésped cítrico resistente, los tamaños efectivos de población más pequeños pueden actuar como cuellos de botella forzando la evolución rápida de este virus (o de algunos de sus genes). Y por otra, que la evolución de CTV seguiría el modelo de evolución de paisajes adaptativos de Wright, en el que los genotipos mencionados representarían picos de eficiencia biológica separados por profundos valles.

En cualquier caso, los estudios de evolución experimental de CTV en su huésped natural, los cítricos, son muy costosos y difíciles de llevar a cabo, no permiten el manejo de un número importante de réplicas biológicas por pase y se ven muy afectadas por la compleja biología de los cítricos y su longevidad.

Teniendo en cuenta estos datos preliminares, en el presente capítulo se abordó el estudio de la evolución y posible adaptación de CTV al huésped no-natural *N. benthamiana* mediante pases seriados, utilizando como aislado de CTV, el procedente de la agroinfección sistémica con el clon CTV-T36 (con o sin el gen GFP). Para ello, se tuvo que optimizar un procedimiento eficiente de transmisión por injerto de *N. benthamiana* infectada por CTV a *N. benthamiana* sana. A partir de estas plantas hubo que realizar pases seriados del virus y analizar los cambios poblacionales y la eficacia viral. Además, también se llevó a cabo la caracterización biológica y genética de las poblaciones virales evolucionadas en *N. benthamiana* una vez transmitidas de nuevo a cítricos, su huésped natural.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Transmisión eficiente de CTV a plantas de *N. benthamiana* sanas mediante injerto.

Se infectaron sistémicamente plantas de *N. benthamiana* con los clones agroinfecciosos de cDNA CTV-T36 (Satyanarayana *et al.*, 2001) y CTV-T36-GFP siguiendo el protocolo desarrollado (Ambrós

et al., 2011). Partiendo de estos dos linajes, se optimizó un sistema de inoculación mediante injerto de inflorescencias y peciolos de *N. benthamiana* infectada a *N. benthamiana* sana. Se utilizaron plantas receptoras sanas de ~5 semanas y ~20 cm de altura pre-tratadas 3 días antes (mediante agroinfiltración de las hojas basales) con el supresor de silenciamiento p19 (utilizando el plásmido pBIN-p19 cedido por el Dr. Leandro Peña, IBMCP, Valencia) a una DO_{600} de 0.2 siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro grupo (Ambrós *et al.*, 2013 y Fig. 5) y descrito en el apartado 2.8 del Capítulo 1.

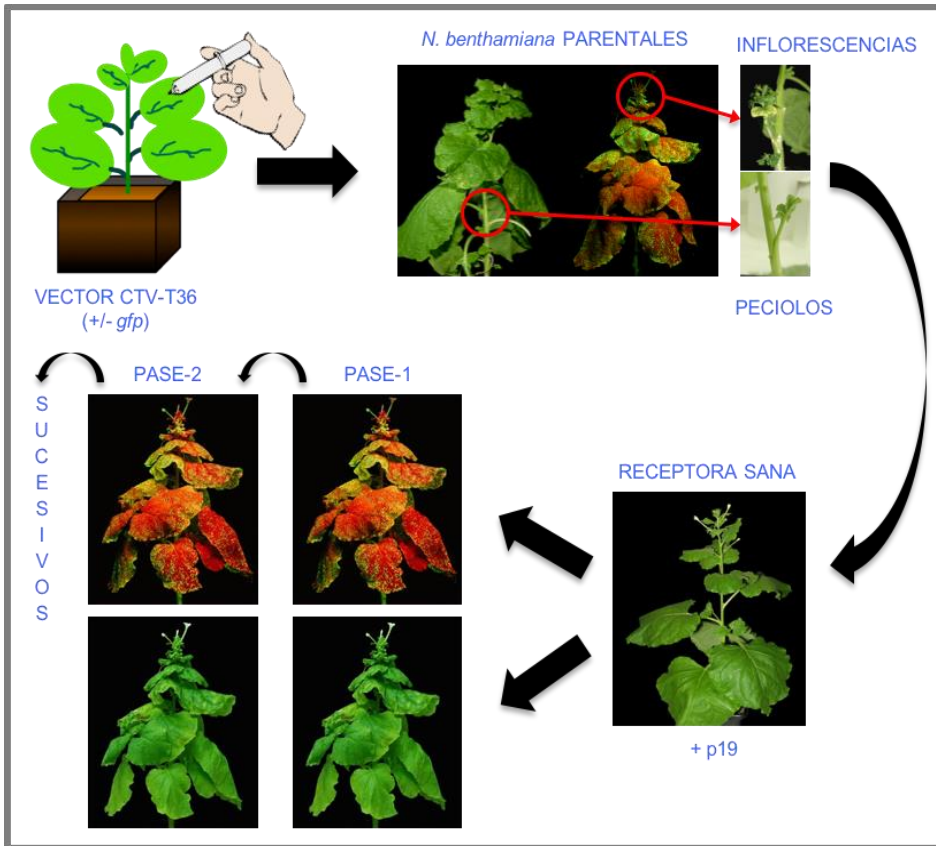


Fig. 5. Diseño experimental para realizar la evolución por pases seriados de los linajes CTV-T36 (FL) y CTV-T36-GFP (FLG) en *N. benthamiana* por inoculación mediante injerto de inflorescencias y tallos infectados sistémicamente.

Los injertos se prendieron en el tallo de las plantas receptoras practicando hendiduras en forma de bisel y cerrándolos con parafilm, que se eliminó a las 2 semanas post-injerto. Para aumentar la supervivencia de los injertos, las plantas se embolsaron y aclimataron mediante apertura progresiva de las bolsas, dejando primero las bolsas cerradas por completo durante 7 días y abriéndolas poco a poco cada 2 días hasta retirarlas. Las plantas se crecieron en cámaras climáticas en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (16h luz, 23°C).

A lo largo del experimento de evolución, se utilizó alternativamente, material infectado de diversos pases de ambos linajes, para comparar las tasas de infectividad (inoculación por injerto) en plantas receptoras sanas de *N. benthamiana* sin pre-tratar con el supresor de silenciamiento p19. Salvo esta condición, el procedimiento fue como el descrito en el párrafo anterior.

En cada pase del bioensayo de evolución se analizaron las tasas de infectividad (número de plantas infectadas respecto al total de injertadas) y de supervivencia de injertos al cabo de 1 mpi, así como los tiempos de aparición de síntomas. También se tomó material de todas las plantas infectadas (hojas, peciolo y tallo) y se realizaron fotos de los síntomas y de la expresión de GFP en plantas completas con una cámara digital Canon G11, iluminando con una lámpara UV de mano y utilizando un filtro amarillo para GFP.

2.2. Seguimiento de la infección sistémica de plantas de *N. benthamiana* mediante inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA-DASI).

Para verificar la infección de las plantas de *N. benthamiana* por el genotipo CTV-T36, denominado a partir de ahora CTV-NB FL o **FL**, se procedió a realizar un ELISA indirecto (Cambra *et al.*, 1990). Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos (Nunc) con un anticuerpo policlonal anti-CTV diluido 1:500 en tampón carbonato 0.1 M, pH 9.6. Las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron 3 veces con tampón lavador AFT 1X (0.14 M NaCl, 2.6 mM NaH₂PO₄·2H₂O y 7.5 mM Na₂HPO₄·12H₂O) con 0.05% Tween 20. Las muestras vegetales se prepararon homogeneizando 0.5-1 g de un "pool" de hojas de cada planta en 20 volúmenes de tampón de extracción (AFT 1X y 1% polivinilpirrolidona), se añadieron 190 µl de

extracto por pocillo (con sus correspondientes réplicas y controles) y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados, las placas se incubaron a 37°C durante 2 h con la mezcla de anticuerpos monoclonales específicos de CTV 3DF1 y 3CA5 (Ingenasa) diluidos en AFT 1X a una concentración de 0.25 µg/ml cada uno. Tras lavar 3 veces, las placas se incubaron durante 90 min a 37°C con una dilución 1:20000 de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma) en AFT 1X, se lavaron nuevamente y se revelaron utilizando como sustrato 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en tampón de detección (10% dietanolamina en H₂O destilada, pH 9.8). Se utilizó un lector de placas (Labsystems Multiskan Ascent) para medir la densidad óptica a 405 nm cada 30 min.

2.3. Seguimiento de la infección de CTV-NB FLG en plantas de *N. benthamiana* mediante lámpara UV.

La visualización de la fluorescencia verde de la GFP procedente de la expresión e infección sistémica del linaje CTV-T36-GFP, denominado a partir de ahora CTV-NB FLG o **FLG**, se realizó iluminando las plantas de *N. benthamiana* con una lámpara de luz ultravioleta (Blak-Ray B-100AP) con una longitud de onda de 365 nm y una potencia de 100 W. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Canon G11 y un filtro amarillo.

2.4. Inmunoimpresión ELISA (IP-ELISA) de material de cítricos inoculados con CTV-NB.

Las improntas de tejido vegetal se realizaron a partir de peciolo y tallos tiernos de cítricos (Garnsey *et al.*, 1993), efectuando un corte transversal y aplicando la sección fresca sobre una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con tampón TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.3% Tween 20) con BSA 0.1%, y posteriormente se incubaron con los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 conjugados con fosfatasa alcalina (Plant Print), a una concentración de 2 µg/ml, en tampón TBST diluido 1:10 durante 30 min a 37°C. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 min con tampón TBST a temperatura ambiente, se equilibró la membrana con tampón sustrato (Tris-HCl 0.1 M, pH 9.6) durante 2

min y se reveló con NBT (Roche) y BCIP (Roche) a 10 mg/ml en tampón sustrato. Las plantas infectadas se detectan por la formación de un precipitado púrpura alrededor de los tejidos floemáticos de los vasos en los cortes transversales de las improntas y se visualizan a simple vista o con una lupa.

2.5. Extracción de RNAt a partir de material vegetal de *N. benthamiana*.

Procedimiento descrito en el apartado 2.4 del Capítulo 2.

2.6. Fraccionamiento de los extractos de RNAt.

Procedimiento descrito en el apartado 2.7 del Capítulo 2.

2.7. Extracción de RNAt a partir de material vegetal de cítricos.

La extracción de RNAt se realizó a partir de 2-4 g de material fresco (corteza de plantas infectadas) triturado en un recipiente de molienda (50 ml) con N₂ líquido y una bola de acero de 20 mm de diámetro en un molino mezclador (Retsch MM 400). Este material se homogeneizó con 5 ml de TCES (0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.2 M NaCl y 2% SDS), se añadieron 5 ml de fenol saturado con agua y 25 µl de β-mercaptoetanol, y se incubó 10 min a 50°C. El extracto se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min para precipitar el material insoluble, y la fase acuosa se extrajo con 4 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El RNA se precipitó con 0.5 volúmenes de LiCl 12 M durante toda la noche a 4°C. El precipitado obtenido tras una centrifugación a 6000 rpm durante 15 min se lavó con etanol 70% y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente, el RNAt se resuspendió en agua libre de RNAsas y una alícuota se trató con DNAsa libre de RNAsas (Turbo DNA-free, Ambion). La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) con 1.5 µl de los extractos diluidos.

2.8. Retrotranscripción y amplificación de los genomas CTV-NB FL y FLG.

El genoma completo de CTV se amplificó realizando tres reacciones de retrotranscripción (RT) largas para obtener fragmentos solapantes de cDNA de gran tamaño utilizando cebadores específicos que cubrían en su totalidad el gRNA del virus (Fig. 6). Para ello, 1-2 µg de RNA_t se desnaturalizaron con hidróxido de metilmercurio 0.1 M a temperatura ambiente durante 10 min y, a continuación, se incubaron en hielo con β-mercaptoetanol 1.4 M. Después, se añadió la mezcla de reacción (Tris-acetato 50 mM pH 8.4, 75 mM acetato de potasio, 8 mM acetato de magnesio, 5 mM DTT, 1 mM dNTPs y 1 µM del cebador), 40 U de RNaseOUT y 15 U de transcriptasa inversa ThermoScript (Invitrogen). Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo de 75 min a 60°C para sintetizar el cDNA y otro de 15 min a 85°C para inactivar la enzima. Las reacciones fueron tratadas posteriormente con 2 U de RNasa H (Invitrogen) a 37°C durante 20 min para eliminar el RNA complementario al cDNA. De este modo, se sintetizaron tres cDNAs diferentes de gran tamaño: cDNA 2 procedente de la RT-2, cDNA 3 de la RT-3 y cDNA 4 de la RT-4 (Fig 6).

La RT-2 se realizó utilizando el cebador PM-312R (Tabla 1) y comprende desde la posición genómica 6.4 Kb hasta el extremo 5' UTR. Para la RT-3 se empleó el cebador PM-307R (Tabla 1), solapa una región de 1023 pb con el cDNA obtenido mediante la RT anterior y se extiende desde la posición 5.4 a las 12.4 Kb. La RT-4 se generó con el cebador PM-2/37R que anilla en el extremo 3' UTR del gRNA (Tabla 1), se extiende desde la posición 12.2 Kb hasta el extremo 3' UTR y solapa con el cDNA anterior un fragmento de 548 pb.

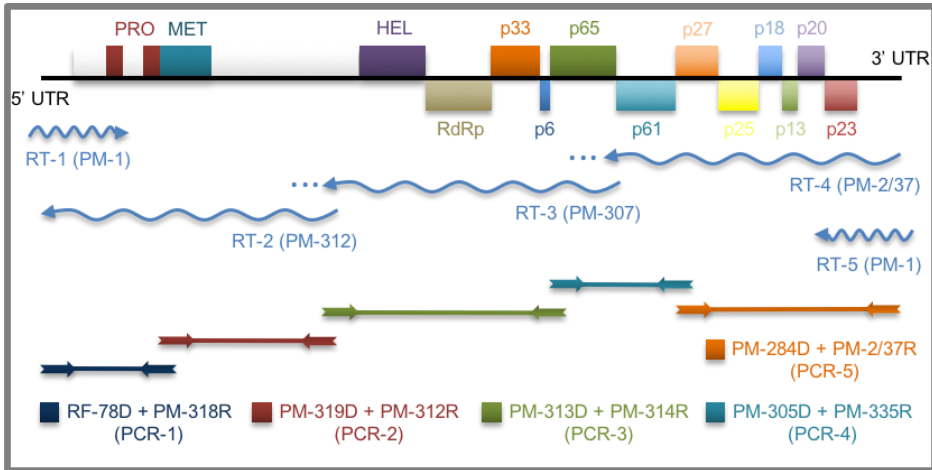


Fig. 6. Esquema de la estrategia seguida para amplificar el gRNA completo de CTV-NB FL y FLG mediante RT-PCR larga. Las líneas onduladas representan los 5 cDNAs solapantes obtenidos mediante retrotranscripción del gRNA viral (RT-1 a RT-5), mientras que las líneas rectas con flechas representan las reacciones de PCR individuales para generar los 5 fragmentos solapantes (PCR-1 a PCR-5). Las cajas representan pautas de lectura abierta (ORFs) y junto a ellas se indican los productos proteicos potencialmente codificados.

Utilizando 1 μ l de las reacciones RT-2, RT-3 y RT-4 se sintetizaron 5 productos solapantes de PCR que cubrían el gRNA completo de CTV-T36. Para ello, se utilizaron los cebadores específicos indicados en la Fig. 2, diseñados en regiones genómicas conservadas, y el protocolo descrito en el apartado 2.2 del Capítulo 1. El amplicón de la PCR-1 (3.02 Kb) se extiende desde la posición genómica 3 Kb al extremo 5' UTR y se obtuvo con los cebadores RF-78D y PM-318R (Tabla 1) y tiempos de extensión de 2 min en la reacción de amplificación; el producto de la PCR-2 (3.6 Kb) se sintetizó con los cebadores PM-319D y PM-312R (Tabla 1) utilizando 2.5 min de elongación y cubre las posiciones genómicas 2.9 a 6.5 Kb; el producto de la PCR-3 (5.8 Kb) se extiende de la posición genómica 6.3 a 12.1 Kb y se sintetizó con los cebadores PM-313D y PM-314R (Tabla 1) y 3 min de extensión; la PCR-4 (3.5 Kb) se obtuvo con los cebadores PM-305D y PM-335R (Tabla 1) con 2 min de extensión y cubre las posiciones genómicas 12 a 15.5 Kb; y la PCR-5 (3.9 Kb) se sintetizó con los cebadores PM-284D y PM-2/37R

(Tabla 1) utilizando 2 min de elongación y se extiende desde la posición genómica 15.3 Kb al extremo 3' UTR.

Tabla 1. Cebadores empleados para la retrotranscripción, amplificación y secuenciación del genoma de CTV-NB FL y FLG.

NOMBRE	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIÓN GENÓMICA¹
PM-1	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGC(T) ₁₇ V	-
RF-78D	AATTTCAAAATTCAACCTGTTCCGCCAG	1-29
RF-137R	CCGTARAGGGACKATCGGC	266-284
PM-580D	ATCACTTTTGAACCATGCCTGC	768-790
PM-579R	CTGCGGCTTCAGAGTGGAACAC	800-822
PM-60D	CGCCGACCTTCCGTG	1361-1376
PM-581R	TTCGCGAACAAGATAAGCCTTTA	1414-1436
PM-82D	ACACGTGTTTGTAAGCGTGG	2021-2041
PM-578R	TACTGATTCTCATACCTGACCGC	2070-2092
PM-112D	TCGCGTGCATTGAACCTGTGGAATC	2611-2635
PM-319D	CGTTTTCGAAGTGCAACACCGTCTTGA	2879-2905
PM-318R	GGGAGTTATCTTCACCACCCATCTTATG	3024-3051
PM-118D	GTGTTATCATGCATCGGAGGCG	3584-3605
PM-110R	GGTGTAAACCATGGTCATATAACACACGG	3676-3703
PM-555D	GCTGGCGTGAAGGGTAGGCCAAAACGCG	4272-4298
PM-117R	GGATATAGCAAACCCCACTAACTC	4347-4370
PM-317D	CCCAAGTTATACGCTGGTTGTAAGGAC	5064-5090
PM-310R	AAAAGTTCGATCCCCTTCCATAGCGAG	5340-5367
PM-315D	TCTCTGGAGCGGTGTAAGGAAGCGTG	5631-5656
PM-311R	TGCCCGTACAAGGACTTAGCACCCT	5745-5770
PM-313D	TCAGAACTTTGCTGCATCGGTTGAGG	6385-6410
PM-312R	ATCCTACCCCGACATTCAATAAAAGTGATAT	6470-6502
PM-333D	AGTTGTTACGCAACCTATTTCGATGCTAGAA	7018-7047
PM-573R	CAAGACTAAAGACCAGACGACAC	7115-7137
PM-334D	GACTTTAATCGGAAATTGTTGGTGGGGAGA	7807-7836
PM-574R	GAATTCGCGGCAACAAAAGACGT	8154-8176
PM-576D	AAATCAATGGGTGCGATGACGTA	8788-8810
PM-575R	TACACAATGTACTTCGCCGCCTT	8820-8842
PM-288D	GCGTTCGGCGTAGTAAGGTC	9400-9419
PM-577R	CGTTCGGTCTTGATAAAGTTATA	9484-9506
PM-289R	CTAACCCAGCGTTCGTCAT	9907-9925
PM-290D	TTGGGGAAGTGATTTCAGTAAGTT	9971-9995
PM-291D	GACATGACGCAGGACTTTGG	10504-10523
PM-304D	GGAACTCACTAATTTGATCTGTGAACGTGT	10709-10739
PM-287R	AAAGAAATACAATGAGAAATAATCGGC	11056-11082
PM-310'D	ACGAATTTTCTGTTGCGACTGATG	11447-11470
PM-311'R	TTCCACATCATCAGTCGCAACAGAAAA	11452-11478

NOMBRE	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3'	POSICIÓN GENÓMICA ¹
PM-305D	CCCTTACGGCACTCACGCGACTGTCTAAGC	12016-12045
PM-314R	ACTAACTCTGAAGGTGTAGCCATAGCCAC	12091-12109
PM-307R	AACCAGCAGGTACCGAACATATAACTCCAGTGC	12479-12511
PM-64D	GTGTACATTATTAACGAACC	12571-12590
PM-292D	CGGTGGAAGACGCAAGAAC	13103-13121
PM-293R	ACAGCGTTCCTTGCGTCTTCC	13107-13127
PM-316D	TTTGCGAACATTATTTGACACTTTACTAGC	13659-13688
PM-30D	CCGTTGACCCGCACGAAGTCG	14063-14084
PM-31R	TAAAAGTAGAGTAATACACC	14479-14499
PM-104D	GATCTACGCGTTGGTCTGCGTTGGG	14774-14798
PM-284D	CGGGTTTAATTTACCTTATCAT	15319-15340
PM-335R	CAAGTGTTCAACAGTAAACTTTTCAGTGG	15513-15542
PM-294D	GTTACGAGGAGGCGACCGAGC	16006-16026
PM-285R	AGTATAATGTTACCGTCCCAAA	16066-16088
C3-up ²	GGAGTTGTCCCAATTCTTGTTG	-
C3-2low ²	TCCGTATGTAGCATCACCTTACC	-
C3-low ²	CTCATCCATGCCATGTGTAATCCC	-
C3-2up ²	GGCAGACAAACAAAAGAATGG	-
PM-130D	AAATTGAAGAACAACAAAACAAGGAAA	16173-16197
PM-68D	ATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCA	16792-16815
PM-286R	CGGGAATCGGAACGCAACAG	16828-16847
PM-47R	AGACTCTAGTTATCGCAAGGT	17674-17694
PM-48D	ATGCGAGCTTACTTTAGTGTTA	17765-17786
PM-49R	TAATGTCAAACGACCGC	18270-18287
PM-50D	ACTAACTTTAATTCGAACA	18348-18366
PM-175D	GCAGTCTCAGAACGAGGTGGC	18664-18684
PM-2/37R	TGGACCTATGTTGGCCCCCATAGGGACAGTGCG	19263-19296

D indica sentido directo y R reverso

¹ Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T36 depositada en la base de datos (GenBank nº de acceso U16304)

² Cebadores empleados para la secuenciación de la región del gen *gfp* del clon CTV-T36-GFP

V: adenina, guanina o citosina; R: adenina o guanina; K: timina o guanina

2.9. Retrotranscripción y amplificación de los extremos 5' y 3' UTR de CTV-NB FL y FLG.

Para retrotranscribir y amplificar los extremos 5' y 3' UTR del gRNA de CTV, 4 µg de RNAt se desnaturalizaron con hidróxido de metilmercurio como se ha indicado en el apartado anterior. A

continuación, se poliadenilaron con la Poly (A) polimerasa de levadura (USB Corp.) siguiendo el protocolo descrito (López *et al.*, 1998). Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 30 min y, posteriormente, se fenolizaron, precipitaron y resuspendieron en agua libre de RNAsas. El cDNA 1 (Fig. 6) se sintetizó mediante retrotranscripción utilizando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen), el RNA poliadenilado previamente, 1 µM del cebador PM-1 (Tabla 1) que contiene (dT)₁₇ en su extremo 3', la mezcla de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT y 1 mM dNTPs), 40 U de RNaseOUT y 200 U de SuperScript II. Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo de 60 min a 42°C para sintetizar el cDNA y otro de 15 min a 70°C para inactivar la enzima. El cDNA 5 (Fig. 6) se sintetizó del mismo modo. Por último, utilizando las RT-1 y RT-5 se amplificaron los extremos 5' UTR y 3' UTR, respectivamente, usando los cebadores PM-1 y RF-137R (Tabla 1) o los cebadores PM-1 y PM-175D (Tabla 1) para conseguir los fragmentos 5' UTR de 324 pb y 3' UTR de 672 pb, respectivamente. Ambas reacciones se llevaron a cabo con la DNA polimerasa iProof (Bio-Rad) de alta fidelidad de copia, utilizando como molde 1 µl de las RTs anteriores y el protocolo descrito en el apartado 2.2 del Capítulo 1 con 15 s en la reacción de extensión.

2.10. Visualización y purificación de los fragmentos de RT-PCR amplificados.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, pH 8.3, y EDTA 1 mM). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (GeneChoice, 0.5 µg/ml) y los productos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los fragmentos amplificados se purificaron con el kit GeneClean Turbo for PCR (MP Biomedicals) y se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, Valencia) para secuenciar por ambas direcciones.

2.11. Análisis de secuencias.

Las secuencias obtenidas se convirtieron a formato FASTA mediante el programa Chromas Lite v2.01 (Technelysium) y se analizaron con el paquete bioinformático Vector NTI Suite 8 (Life Technologies; Lu y Moriyama, 2004) para realizar el ensamblaje de la secuencia completa del gRNA mediante contigs. Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas AlignX y ContigExpress incluidos en el paquete, y para deducir la secuencia aminoacídica el portal ExpASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

Se realizaron alineamientos múltiples con el programa ENMA (CLUSTAL W interface) o el MUSCLE, y análisis filogenéticos con el paquete MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) empleando el modelo de selección (ML) que mejor se ajustaba a los datos analizados y el método estadístico de máxima probabilidad. A partir de éstos se obtuvieron las matrices de sustitución nucleotídica, las tasas de transición (Ts) y transversión (Tv) empleando el modelo Tamura-Nei (Tamura *et al.*, 2004, 2013) o el Kimura-2 parámetros (con una distribución gamma) y los valores de diversidad nucleotídica media (π) intra e inter-poblacional. Los árboles filogenéticos correspondientes se generaron con el método Neighbor-Joining utilizando los modelos de sustitución de nucleótidos obtenidos como más probables. La robustez estadística de los árboles construidos se asignó utilizando 1000 réplicas *bootstrap*.

Para determinar la presencia de sitios sometidos a selección positiva o negativa en las regiones genómicas analizadas, se llevó a cabo un análisis de selección por codón con el programa HYPHY implementado a través del paquete MEGA 6.0 y el modelo de selección que mejor se ajustaba a los datos. También se utilizó el paquete MEGA para identificar las tasas de sustitución no-sinónimas (dN) y sinónimas (dS) para cada región génica estudiada y determinar las diferencias $dN-dS$ que pudieran evidenciar una selección positiva, ($dN-dS < 0$) o la acción de la selección negativa (Kosakovsky *et al.*, 2005).

2.12. Cuantificación del gRNA de CTV-NB FL y FLG mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

Para estimar el número absoluto de copias de gRNA de CTV-NB FL o FLG presente en los tejidos infectados de las plantas de *N. benthamiana* a lo largo del experimento de evolución, se realizó una qRT-PCR con los cebadores generales PM197F (5'-CGCCAATTTGATCTGTGAACG-3') y PM198R (5'-GCGAAAGCAAACATCTCGACTC-3') siguiendo el protocolo desarrollado previamente en nuestro grupo (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Todas las muestras se analizaron por duplicado (réplicas técnicas) en al menos dos experimentos independientes (réplicas biológicas).

El número de copias de gRNA viral se estimó interpolando los valores del ciclo umbral de fluorescencia (Ct) de cada muestra, proporcionados por el programa LightCycler Software 4, en una recta patrón obtenida para el aislado T36 (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009).

2.13. Purificación e inoculación mecánica de viriones de CTV-NB FL y FLG, procedentes de linajes evolucionados de *N. benthamiana*, a plantas de cítricos.

Los viriones de CTV-NB FL y FLG se purificaron a partir de hojas y peciolo de plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente con estos linajes, a lo largo de diversos pases, utilizando un gradiente de sacarosa y el protocolo descrito previamente (Satyanarayana *et al.*, 2001). Para ello, se pulverizó 3-5 g de material vegetal con N₂ líquido en un molino mezclador y se incubó con 10 ml de tampón de extracción (tampón fosfato 40 mM, pH 8.2) durante 30 min en hielo, agitando suave y frecuentemente. El homogeneizado se centrifugó durante 12 min a 12.000 rpm y el clarificado se pasó a un tubo de gradiente en el que previamente se añadió un colchón de 1 ml de sacarosa al 70% (preparada con el tampón de extracción). El sobrenadante se ultracentrifugó a 38.000 rpm durante 75 min y, finalmente, se descartaron los primeros 400 µl del gradiente para obtener la fracción de 200 µl restantes enriquecida en viriones de CTV. Éstos se inocularon mecánicamente en la corteza joven de plantas de *C. macrophylla* de 6 meses a 1 año de edad (un total de 4 plantas inoculadas con 50 µl de extracto distribuidos en 4 parches). Estas plantas se mantuvieron en una

cámara climática con condiciones de humedad y temperatura controladas en un invernadero de seguridad biológica tipo P2. Este lote de plantas constituyeron el reservorio madre de cada pase a partir de las cuales se obtuvo el material infectado necesario para realizar la caracterización biológica en otros huéspedes cítricos indicadores mediante inoculación por parches de injerto de corteza.

2.14. Inoculación mecánica de plantas de *N. benthamiana* sanas con extracto crudo viral de CTV-NB procedente de linajes evolucionados en *N. benthamiana*.

Los viriones de CTV-NB FL o FLG se purificaron a partir de hojas y peciolo de plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente, con cada uno de estos aislados, en diferentes PASES seriados del experimento de evolución. El tejido infectado se pulverizó con N₂ líquido en un molino mezclador y se homogeneizó a razón de 1:10 (peso/volumen) en tampón de inoculación (50 mM tampón fosfato sódico, pH 7.0, 2% polivinilpirrolidona y 0.1% β-mercaptoetanol). El extracto obtenido se inoculó directamente (utilizando bastoncillos de algodón estériles previamente humedecidos en tampón de inoculación) sobre el haz de 2-3 hojas de plantas de *N. benthamiana*, previamente espolvoreadas con carborundum y agroinfiltradas (o no) tres días antes con el supresor de silenciamiento p19 a una DO₆₀₀ de 0.2, según el protocolo del apartado 2.8 del Capítulo 1. Se realizaron, al menos, 2 réplicas de cada ensayo inoculando lotes de 15-20 plantas.

2.15. Caracterización biológica de los linajes CTV-NB FL y FLG, evolucionados en *N. benthamiana*, en diferentes huéspedes cítricos

Utilizando parches de las plantas madre de *C. macrophylla* infectadas sistémicamente con los linajes CTV-NB FL y FLG procedentes de diferentes PASES seriados (8 plantas de cada uno de ellos), se inocularon mediante injerto cuatro especies de cítricos indicadores de 1 año de edad: 3 limas mexicanas (LM), 8 naranjos dulces (ND), 3 pomelos Duncan (POM) y 3 naranjos amargos sevillanos (AM) (Fig. 7). Como control de inoculación del experimento se utilizó el aislado salvaje original de cítricos CTV-T36

(amablemente cedido por el Dr. W.O. Dawson, CREC, Florida, USA) y el aislado clonal CTV-T36-GFP, mantenidos ambos en plantas de *C. macrophylla* en un invernadero de cítricos con malla antipulgón. Se analizó la capacidad infectiva (número de plantas infectadas respecto al total de plantas inoculadas) y la acumulación y distribución viral (mediante IP-ELISA y visualización de cortes longitudinales y transversales de tallos y peciolo utilizando una lupa con luz UV; ver siguiente apartado). Por último, se determinó la intensidad y tipo de síntomas específicos inducidos por el aislado salvaje T36 de cítricos en comparación con los aislados CTV-NB FL y FLG evolucionados en *N. benthamiana*. La evaluación se realizó desde el primer mes tras la inoculación y a lo largo de tres años, y los síntomas evaluados fueron: aclaramiento de venas (VC, “vein clearing”), acopamiento de hojas (LC, leaf cupping) y enanismo en lima mexicana, naranjo amargo y pomelo, aclaramiento de hojas en *C. macrophylla*, amarilleamiento de hojas o *seedling yellows* en pomelo, naranjo amargo y lima mexicana, cuando fue posible acanaladuras en la madera en naranjo dulce, pomelo y *C. macrophylla*.

2.16. Visualización de material vegetal de cítricos infectados con CTV-NB FLG mediante lupa UV.

La acumulación y distribución de CTV-NB FLG (linajes marcados con GFP) se analizó realizando cortes longitudinales y transversales de tallos y peciolo de los diferentes cítricos y PASES examinándolos con una lupa Leica MZ16 utilizando un filtro para GFP. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Leica DFC490 usando el programa informático Leica IM50 v4.0.

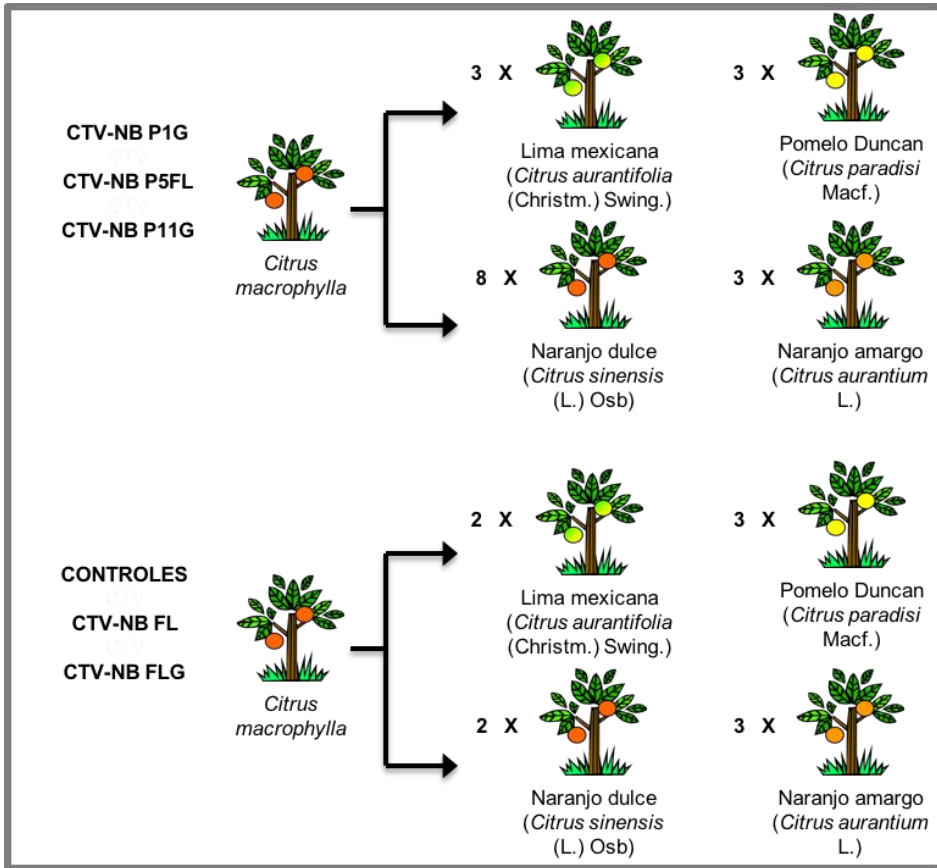


Fig. 7. Esquema de las inoculaciones por injerto realizadas en diferentes cítricos indicadores para llevar a cabo la caracterización biológica de CTV-NB FL y FLG tras el experimento de evolución seriada en *N. benthamiana*. Los pases empleados para este experimento se indican como PxFL o PxG, donde la x representa el número de pase, y FL y G el linaje sin o con GFP. Los controles CTV-NB FL o FLG indican el clon original de CTV-T36 utilizado en cada caso.

2.17. Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina para realizar hibridaciones moleculares.

Procedimiento descrito en el apartado 2.5 del Capítulo 2. Las sondas sintetizadas para las hibridaciones llevadas a cabo en este capítulo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Sondas de RNA marcadas con digoxigenina sintetizadas para las hibridaciones moleculares de CTV.

SONDA	POLARIDAD	POLIMERASA	DETECCIÓN
p23-T36	(-)	T7	Gen de la p23 de CTV
3'UTR-T36	(-)	SP6	Extremo p23-3'UTR de CTV

UTR: región no traducible

T7: RNA polimerasa DNA dependiente que reconoce el promotor del bacteriófago T7

SP6: RNA polimerasa DNA dependiente que reconoce el promotor del bacteriófago SP6

2.18. Detección y cuantificación del gRNA y sgRNAs de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot.

Procedimiento descrito en el apartado 2.6 del Capítulo 2.

2.19. Detección de siRNAs derivados de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot.

Procedimiento descrito en el apartado 2.8 del Capítulo 2.

2.20. Crecimiento y mantenimiento de plantas de *N. benthamiana* y *C. macrophylla*.

Procedimientos descritos en los apartados 2.1 y 2.9 del Capítulo 1.

3. RESULTADOS

3.1. Desarrollo previo de un procedimiento eficiente de transmisión de CTV por injerto de *N. benthamiana* infectada a *N. benthamiana* sana

Para determinar si la replicación e invasión sistémica de CTV en *N. benthamiana* podía producir acumulación de mutaciones y/o modificar sus características biológicas con el tiempo, se diseñó un experimento de pases seriados con el fin de analizar su evolución. Hasta el momento, CTV solo se había podido transmitir experimentalmente a plantas del género *Passiflora* (Müller *et al.*, 1974; Cambra y Moreno, 2000), por lo que en el laboratorio se optimizó una técnica para transmitir el virus de forma eficiente entre plantas infectadas y sanas de la especie herbácea *N. benthamiana*.

A partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente utilizando los clones agroinfecciosos de CTV-T36 (linaje FL PARENTAL) (Satyanarayana *et al.*, 2001) y CTV-T36-GFP (linaje FLG PARENTAL) (Ambrós *et al.*, 2011), se desarrolló un sistema de inoculación del virus mediante injerto de inflorescencias, tallos y/o peciolas de plantas infectadas (CTV-NB) a plantas sanas. En la Tabla 3 se muestra cómo los diferentes tipos de transmisión por injerto ensayados inicialmente, en los que las plantas receptoras no fueron tratadas previamente, resultaron infructuosos. También se intentó la transmisión mecánica del virus ensayando como inóculo extracto crudo o viriones semipurificados (por gradiente de sacarosa) de CTV-NB procedentes de plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente, así como viriones semipurificados procedentes de cítricos infectados (CTV-C). El virus nunca se logró transmitir entre plantas de *N. benthamiana* por injerto o mecánicamente sin un tratamiento previo (Tabla 3).

Sin embargo, el pretratamiento de las plantas receptoras con dos supresores del silenciamiento génico, p19 de TBSV o p23 de CTV, mediante agroinfiltración de las hojas inferiores tres (D3) o seis (D6) días antes de realizar los injertos, permitió la transmisión por injerto con tasas de infectividad entre el 11 y el 44% (Tabla 3).

Tabla 3. Tasas de infectividad (porcentaje, %) conseguidas con las técnicas de transmisión de CTV puestas a punto. Se compara también el tipo de inóculo de partida y el supresor empleado a diferentes días pre-inoculación (tres y seis días, D3 y D6, respectivamente). NB y C indica la procedencia de los viriones purificados, ya sea de *N. benthamiana* o de cítricos infectados sistémicamente, respectivamente.

TIPO TRANSMISIÓN	INÓCULO PARTIDA	SUPRESOR	INFECTIVIDAD	
Injertos	Peciolos		0 (0/17)	
	Tallos	Ninguno	0 (0/13)	
	Inflorescencias		0 (0/21)	
	Inflorescencias y peciolos		p19 – D3	44 (8/18)
			p19 – D6	28 (5/18)
			p23 – D3	11 (2/18)
			p23 – D6	17 (3/18)
Mecánica	Extracto crudo		0 (0/6)	
	Viriones CTV-NB	Ninguno	0 (0/12)	
	Viriones CTV-C		0 (0/6)	
	Extracto crudo		0 (0/20)	
	Viriones CTV-NB	p19	31 (4/13)	
	Viriones CTV-C		30 (3/10)	

Es de destacar que, el pretratamiento de las plantas con el supresor de silenciamiento p19, tres días antes de injertar, permitió obtener mayores tasas de infectividad, que resultaron significativamente mayores que las obtenidas con el supresor p23 (44 % vs 11% a D3, respectivamente) (Fig. 8).

En estas plantas infectadas por injerto, se observó un retraso importante en la aparición de la infección sistémica (2-4 mpi). Siguiendo la misma metodología se consiguió también transmitir mecánicamente CTV por primera vez a *N. benthamiana* sanas utilizando extractos semipurificados de viriones procedentes de cítricos infectados CTV-C (28%), o de plantas de *N. benthamiana* infectadas con CTV-NB (31%) (Tabla 3). Sin embargo, la inoculación de extractos sin fraccionar (*sap*) en estas condiciones nunca tuvo éxito. En las plantas infectadas mediante inoculación mecánica también se observó un retraso importante en la aparición de la infección sistémica, que no se detectó hasta los 2-6 mpi (Tabla 3).

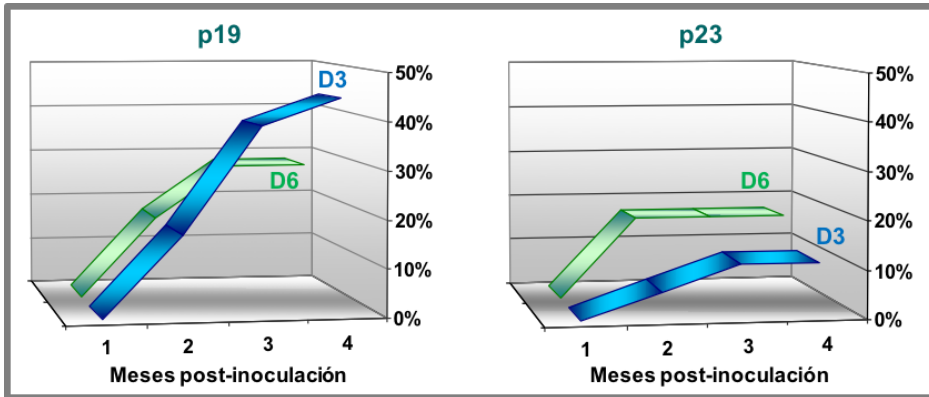


Fig. 8. Porcentaje de infectividad a lo largo del tiempo conseguido en plantas de *N. benthamiana* sanas, previamente tratadas con el supresor de silenciamiento p19 o p23, e injertadas tres o seis días después (D3 o D6, respectivamente) con inflorescencias procedentes de plantas infectadas sistémicamente con CTV-NB.

Estos resultados formaron parte de un trabajo más amplio del grupo (Ambrós *et al.*, 2013) y a partir de ellos, se optimizó el procedimiento de transmisión a lo largo de este trabajo. Las plantas se embolsaron y aclimataron las plantas como se muestra en la Figura 2, abriendo las bolsas de forma progresiva con el tiempo para aumentar la supervivencia de los injertos. Siguiendo la estrategia de transmisión de CTV mediante injerto con pretratamiento de las plantas receptoras a D3 con p19 (Fig. 9), se llevaron a cabo 11 pases sucesivos de evolución experimental empleando en paralelo los linajes independientes FL y FLG.

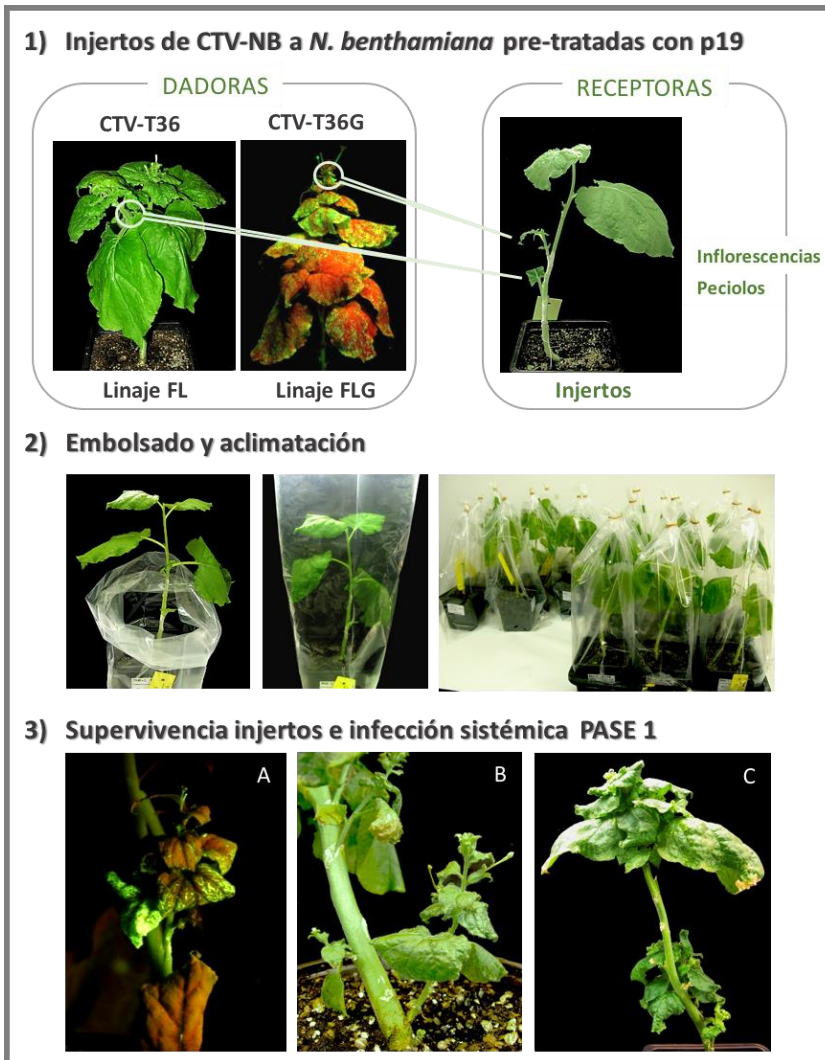


Fig. 9. Descripción gráfica del procedimiento empleado en la transmisión de CTV por injerto de *N. benthamiana*s infectadas sistémicamente a sanas: 1) Pre-tratamiento mediante agroinfiltración de hojas inferiores de las plantas receptoras sanas con el supresor p19, y posterior injerto con inflorescencias y peciolas procedentes de plantas infectadas sistémicamente, 2) Embolsado de las plantas injertadas y apertura progresiva de bolsas para asegurar la supervivencia de los injertos, y 3) Detalles de la supervivencia de los injertos en plantas de los linajes FLG (A, visualización con lupa de GFP) y FL (B), cuyos injertos muestran los síntomas típicos de infección (epinastia, clorosis y arrugamiento) y plantas de *N. benthamiana* del PASE 1 infectadas sistémicamente con injertos vivos de CTV-NB (C).

3.2. Evolución y posible adaptación de CTV en *N. benthamiana*, una especie no-natural.

3.2.1. Infectividad y acumulación viral a lo largo de pases seriados en *N. benthamiana*.

Los síntomas principales producidos por una infección sistémica de CTV en *N. benthamiana* consisten en arrugamiento y necrosis de las hojas superiores, aclaramiento de las nerviaduras, epinastia y retraso en el crecimiento (Ambrós *et al.*, 2011). Estos síntomas suelen aparecer alrededor de las 4 wpi, pero durante el transcurso de este experimento de pases seriados se observó un adelanto en su inducción, apareciendo a las 3 wpi desde el P7.

En el transcurso del ensayo se analizó la tasa de prendimiento de los injertos y la infectividad de las plantas de *N. benthamiana* a lo largo de los pases, calculada como el número de plantas infectadas respecto al total de inoculadas. Mientras las tasas de prendimiento en el P1 fueron bajas y oscilaron entre el 20-30% aproximadamente, éstas aumentaron con el transcurso de los pases alcanzando el 100% a partir del P7 y manteniéndose así hasta el final del experimento (Tabla 4).

Los valores de infectividad tras 1 mpi, fueron muy bajos en los primeros pases y se mantuvieron inferiores al 40% hasta el P4, si bien podían aumentar significativamente en estas plantas a lo largo de los 3 mpi, en los que se alcanzaron valores de hasta el 60% (Tabla 4). Es de destacar que, en pases más avanzados al P7, los niveles máximos de infectividad se consiguieron más tempranamente, alcanzando a los 2 mpi el 60-80% en muchos casos, existiendo pocas diferencias a los 3 o 4 mpi para ese lote de plantas (Tabla 4). Este resultado coincide con el máximo del 100% de las tasas de prendimiento de injertos observadas a partir de este P7 (marcadas en amarillo en la Tabla 4). En general, las tasas de infectividad fueron superiores para el linaje FLG respecto del FL, salvo en los últimos pases en los que los valores se igualaban a partir de los 2 mpi.

Capítulo IV

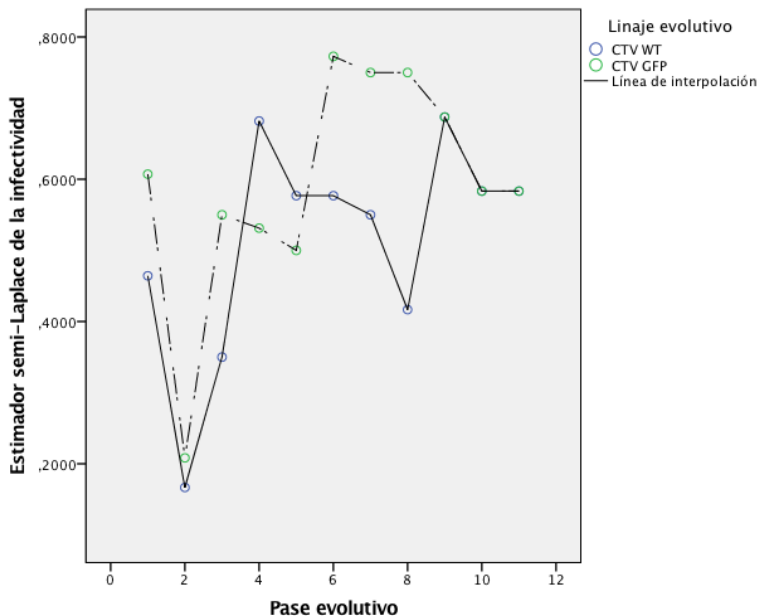
Nº PASE Y LINEAJE	Fecha	1 MPI			1.5 MPI			2 MPI			2.5 MPI		3 MPI			3.5 MPI		4 MPI		
	Supervivencia Injertos	1 WPI	2 WPI	3 WPI	4 WPI	%	5 WPI	6 WPI	%	7 WPI	8 WPI	%	9 WPI	10 WPI	11 WPI	12 WPI	%	13 WPI	14 WPI	16 WPI
PASE 1	jul-08	INFECT.	INFECT.	INFECT.	INFECT.		INFECT.	INFECT.		INFECT.	INFECT.		INFECT.	INFECT.	INFECT.	INFECT.		INFECT.	INFECT.	INFECT.
FL	19%				1/13	8					5/13	38		5/13		6/13	46			
FLG	31%			3/13	3/13	23				7/13	54		8/13		8/13	61				
PASE 2	sep-08																			
FL					0/14	14	2/14	2/14	14	2/14	2/14	14	2/14	2/14	2/14	2/14	14			
FLG					2/11	18	2/11	2/11	18	2/11	2/11	18	2/11	2/11	2/11	18				
PASE 3	oct-08																			
FL	66%				0/9	0	2/9	2/9	22	3/9	33		3/9		3/9	33				
FLG	66%			2/9	4/9	44	4/9	4/9	44	4/9	44		4/9		5/9	56				
PASE 4	dic-08																			
FL	40%			2/10	2/10	20		4/10	40	4/10	40		5/10		5/10	60	6/10		7/10	
FLG	14%				5/15	33		8/15	53	8/15	53		8/15		8/15	53	8/15			
PASE 5	feb-09																			
FL	81%			6/12	6/12	50	7/12	7/12	58	7/12	58			7/12	7/12	58				
FLG	75%				5/12	42	5/12	5/12	42	5/12	42			6/12	6/12	50				
PASE 6	abr-09																			
FL	83%				7/12	58		7/12	58	7/12	58				7/12	58				
FLG	80%			4/10	4/10	40		4/10	40	8/10	80				8/10	80				
PASE 7	jun-09																			
FL	100%				4/9	44	5/9	5/9	55	5/9	55				5/9	55				
FLG	100%		0/9	3/9	5/9	56	7/9	7/9	77	7/9	77				7/9	77				
PASE 8	jul-09																			
FL	100%			1/5	1/5	20	1/5	1/5	20	2/5	40		2/5		2/5	40				
FLG	100%			3/5	3/5	60	4/5	4/5	80	4/5	80		4/5		4/5	80				
PASE 9	sep-09																			
FL	100%			3/7	3/7	43	4/7	4/7	57	4/7	57			4/7	4/7	57	4/7		5/7	
FLG	100%			2/7	2/7	29	5/7	5/7	71	5/7	71			5/7	5/7	71	5/7		5/7	
PASE 10	oct-09																			
FL	100%				1/5	20		1/5	20	2/5	40		2/5		3/5	60	3/5	3/5		
FLG	100%		0/5		2/5	40		2/5	40	2/5	40		2/5		3/5	60	3/5	3/5		
PASE 11	dic-09																			
FL	100%				1/5	20		1/5	20	2/5	40		3/5	3/5	3/5	60		3/5	3/5	
FLG	100%				1/5	20		3/5	60	3/5	60		3/5	3/5	3/5	60		3/5	3/5	

Tabla 4. Tasas de prendimiento de injertos e infectividad correspondiente a cada pase de CTV-NB y su linaje. La tasa de infectividad (%) es el número de plantas infectadas respecto al total de injertadas a distintos tiempos post-inoculación (wpi o mpi), mientras que la tasa de supervivencia de injertos es el número de injertos vivos de cada lote respecto al total injertados, analizada a los 15 dpi.

Los datos de infectividad máximos observados al final del experimento se utilizaron para realizar un análisis de regresión logística tipo GLM (Modelo Lineal Generalizado, *Generalized Linear Model*) utilizando un modelo lineal (BIC=-12,187) en función *Logit*, con “linaje” y “pase” como factores con los siguientes resultados:

	χ^2	gl	P
(Intersección)	48,474	1	,000
linaje	,626	1	,429
pase	7,369	1	,007
linaje * pase	,015	1	,902

Para ambos linajes se demostró un aumento significativo de la infectividad neta con el número de pases en *N. benthamiana*, y la existencia de una interacción pase-linaje en la que cada linaje respondió de una manera distinta. En la siguiente figura se muestra la correlación positiva (líneas de tendencia) existente entre la tasa de infectividad y el número de pases evolutivos (correlación parcial $r = 0,501$, $gl\ 19$, $P = 0,021$).



A

PASE	CUANTIFICACIÓN (X ± S.E.)
Parental FL	5.17 x 10 ³ ± 395
Parental FLG	6.12 x 10 ³ ± 179
P1 FL	7.5 x 10 ³ ± 128
P1 FLG	1.5 x 10 ⁴ ± 157
P2 FL	2.5 x 10 ⁴ ± 204
P2 FLG	2.09 x 10 ⁴ ± 222
P3 FL	1.13 x 10 ⁴ ± 198
P3 FLG	1.24 x 10 ⁴ ± 172
P4 FL	1.65 x 10 ⁴ ± 323
P4 FLG	1.32 x 10 ⁴ ± 122
P5 FL	7.66 x 10 ³ ± 93
P5 FLG	1.16 x 10 ⁴ ± 158
P6 FL	1.69 x 10 ⁴ ± 173
P6 FLG	1.93 x 10 ⁴ ± 105
P7 FL	1.54 x 10 ⁴ ± 167
P7 FLG	3.76 x 10 ⁴ ± 574
P8 FL	3.12 x 10 ⁴ ± 1382
P8 FLG	5.99 x 10 ⁴ ± 1938
P9 FL	9.21 x 10 ⁴ ± 1362
P9 FLG	5.38 x 10 ⁴ ± 1109
P10 FL	4.61 x 10 ⁴ ± 1797
P10 FLG	4.79 x 10 ⁴ ± 1337
P11 FL	1.30 x 10 ⁴ ± 213
P11 FLG	1.37 x 10 ⁴ ± 1182

B

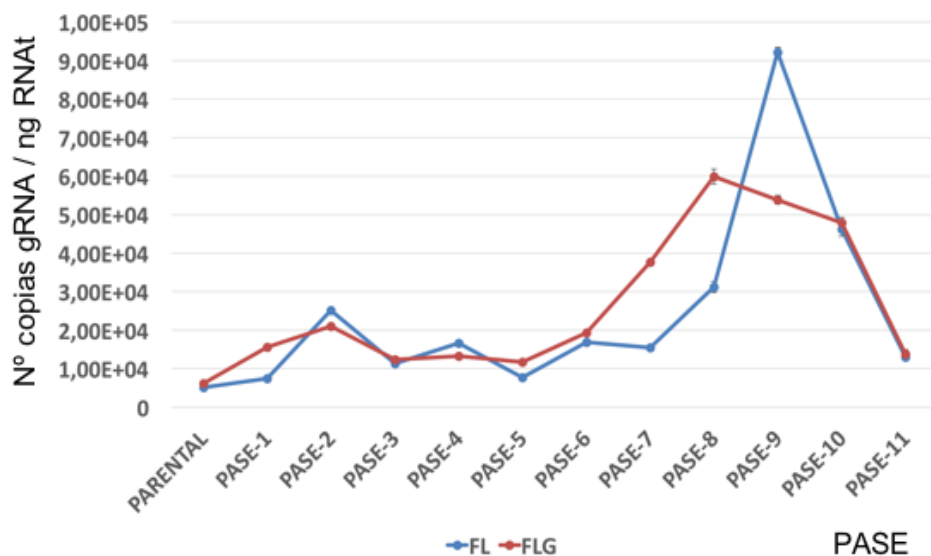


Fig. 10. (Página opuesta). A) Cuantificación absoluta del número de copias de gRNA (X: media) por ng de RNAt, evaluada mediante qRT-PCR, y error estándar (S.E.). B) Cinética de acumulación viral (número absoluto de genomas de CTV) para ambos linajes a lo largo de los pases de evolución en *N. benthamiana*. La línea de color azul corresponde al linaje FL, mientras que la roja al FLG.

La carga viral de las poblaciones de CTV en cada pase, medida como número total de genomas completos por ng de RNAt, se evaluó mediante qRT-PCR siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

La cinética de acumulación de CTV con el tiempo de evolución en *N. benthamiana* reveló, para ambos linajes, un aumento de la acumulación viral durante el transcurso de los primeros 10 pases (Fig. 10), que también podría correlacionarse con el adelanto en la aparición de los síntomas de la infección sistémica descrito anteriormente. Durante los primeros 6 pases la cinética de ambos linajes fue similar, no superando las $\sim 2 \times 10^4$ copias/ng RNAt (unas 4 veces superior a la tasa observada en las plantas parentales), mientras que a partir de este pase el título del linaje FLG aumentó más rápidamente que el de FL alcanzando su máximo en P8 con $\sim 6 \times 10^4$ copias (es decir 3 veces más que en P6) (Fig. 10, panel A). Sin embargo, el linaje FL a pesar de ir un poco más lento y alcanzar su máximo en P9 (Fig. 10, panel B), se acumuló bastante más que el anterior ($\sim 9 \times 10^4$ copias, es decir casi 20 veces más que el parental de origen). En el P11, el título viral detectado por qRT-PCR disminuyó, siendo menor de lo esperado (Fig. 10) a consecuencia de condiciones externas al propio bioensayo (estado de las plantas y fallos en los extractos de RNAt).

En este caso los datos también se ajustaron a un análisis GLM con un modelo lineal utilizando “linaje” y “pase” como variables y “réplica biológica” vinculada con linaje y pase para estudiar el efecto de los distintos factores en la variación observada con los siguientes resultados:

	χ^2	<i>gl</i>	<i>P</i>
Intersección	69562941,672	1	< 0.001
Linaje	2237,158	1	< 0.001
Pase	647627,433	11	< 0.001
LinajexPase	53832,323	11	< 0.001
Réplica(LinajexPase)	875946	24	< 0.001

Los análisis muestran diferencias significativas entre los linajes (hay efecto linaje) y los pases (efecto del pase), siendo éste último el componente más importante de la varianza (datos no mostrados). La correlación de la carga viral con el número de pases fue significativamente positiva: parcial $r=0.560$, 93 *gl*, $P < 0.001$

Preparaciones de RNA_t obtenidas a partir de las plantas infectadas de ambos linajes a lo largo de los pases se analizaron mediante *Northern blot* utilizando una sonda específica del extremo 3' del genoma de CTV-T36 (3'UTR-T36). En la Figura 11 se muestra que para el linaje FL, donde el incremento en el título viral determinado por qRT-PCR se correlaciona con el aumento en la acumulación del gRNA y de los sgRNAs derivados de la expresión de CTV a medida que transcurren los pases evolutivos (Fig. 11). La acumulación en P1 es ligeramente superior a la de la planta parental, va aumentando en P3 y ya se detecta una mayor acumulación de gRNA (y sgRNAs también) en P5 y sobre todo en P11, donde la cantidad de gRNA, y particularmente de todos los sgRNAs, es mucho mayor. Para ambos linajes los resultados fueron similares.

En resumen, los datos biológicos y moleculares obtenidos muestran una adaptación de CTV-FL y CTV-FLG a *N. benthamiana* a lo largo de los pases evolutivos dado que: i) aumenta la tasa de prendimiento de los injertos conforme el virus se acumula mejor en las plantas receptoras, ii) existe un adelanto en la inducción de los síntomas de la infección sistémica, iii) ello va unido a un aumento en las tasas de infectividad en el nuevo huésped, y iv) se observa un incremento importante en las tasas de acumulación viral a lo largo de los pases. Dicho proceso de adaptación se ha producido de forma independiente pero convergente para ambos linajes.

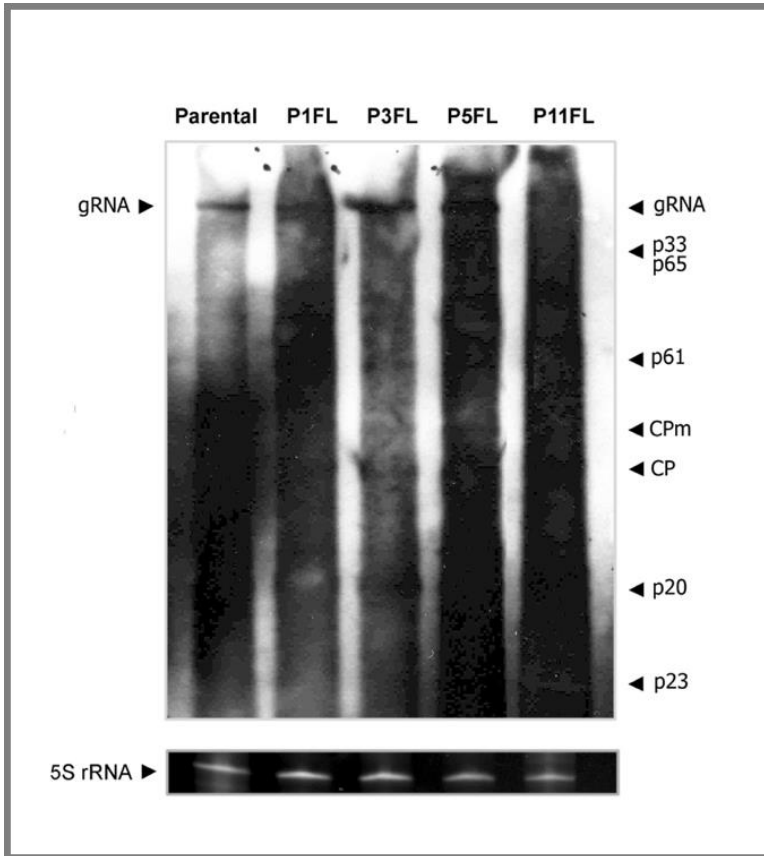


Fig. 11. Análisis *Northern blot* de las preparaciones de RNAt de plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente con CTV-NB procedente de la planta Parental del linaje FL o de los pases P1, P3, P5 o P11 de este linaje. En el panel superior se muestran las posiciones del RNA genómico (gRNA) y algunos de los sgRNAs de CTV marcados con una flecha. El panel inferior muestra el control de carga del rRNA 5S analizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5% teñido con BrEt. En la hibridación molecular se utilizó la ribosonda 3'UTR-T36, que comprende el gen *p23* y el extremo 3'-UTR de CTV-T36.

3.2.2. Los virus CTV-FL y CTV-FLG evolucionados en *N. benthamiana* correspondientes a los Pases P7, P9 y P11 infectan plantas sanas de este huésped por inoculación mecánica.

Viriones de los linajes FL y FLG, evolucionados en plantas de *N. benthamiana* y procedentes del inóculo parental y de los pases Parental, P7, P9 y P11, se inocularon mecánicamente en plantas sanas de la misma especie sin pre-tratar con el supresor del silenciamiento p19 (Fig. 12). Con este fin, un extracto sin fraccionar de plantas infectadas sistémicamente (*sap*) se inoculó en plantas sanas de *N. benthamiana* realizando, al menos, dos bioensayos independientes utilizando 15-20 plantas en cada uno (Fig. 12).

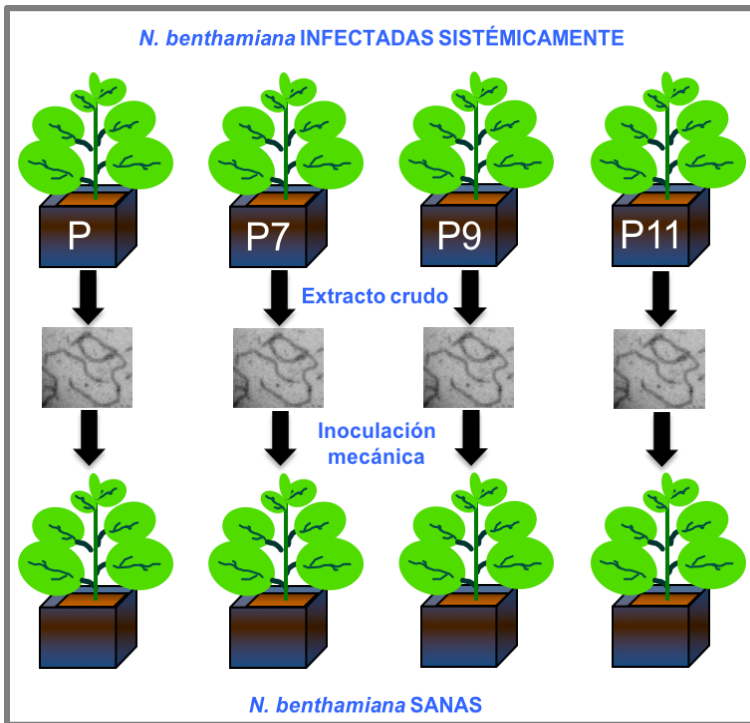


Fig. 12. Diseño experimental de la inoculación mecánica de plantas de *N. benthamiana* sanas con virus (*sap*) evolucionados procedentes de plantas infectadas sistémicamente por los parentales CTV-FL/CTV-FLG (P) o por los pases P7, P9 o P11.

Para determinar si las plantas estaban infectadas local o sistémicamente, las del linaje FL se analizaron mediante ELISA y qRT-PCR a 1 y 2 mpi, mientras que la infección de las del linaje FLG, al expresar la proteína GFP, se evaluó mediante una lámpara de luz UV.

A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las tasas de infectividad (plantas infectadas local o sistémicamente respecto al total de plantas inoculadas) para cada pase y linaje (Tabla 5). En todos los pases se consiguió infectar localmente las hojas inoculadas de *N. benthamiana*, aunque con porcentajes variables (Tabla 5). Sorprendentemente, los virus evolucionados de P7 (ambos linajes) y P11 (FLG) indujeron infecciones sistémicas en ~10-20% de las plantas inoculadas, en las que alcanzaron cargas virales importantes (datos no mostrados y Fig. 13). La ausencia de infección sistémica utilizando el inóculo de P9 probablemente se debió a que el material de partida no estaba en buenas condiciones y el título viral era menor al del resto, de ahí que el número de plantas infectadas localmente fuese inferior al del resto de bioensayos.

Tabla 5. Tasas de infectividad obtenidas a los 2 mpi en los bioensayos de inoculación mecánica, sin tratamiento previo de las plantas, utilizando como inóculo los linajes FL y FLG previamente evolucionados en *N. benthamiana*.

PASE	LINAJE	% INFECTIVIDAD	
		LOCAL	SISTÉMICA
Parental	FL	40 (8/20)	0 (0/20)
	FLG	80 (12/15)	0 (0/15)
P7	FL	27 (3/11)	9 (1/11)
	FLG	45 (5/11)	18 (2/11)
P9	FL	6 (1/15)	0 (0/15)
	FLG	20 (3/15)	0 (0/15)
P11	FLG	100 (28/28)	14 (4/28)

Un análisis GLM (función *Logit*) de estos datos, utilizando una distribución binomial por genotipos virales y como variable continua las semanas post-inoculación (spi) (con una media de 7,46 y desviación típica de 3,257), mostró los siguientes resultados de infectividad local y sistémica:

SÍNTOMAS LOCALES	χ^2	<i>gl</i>	<i>P</i>
spi	16,715	1	< 0.001
Genotipo viral	13,752	4	0.008
Genotipo viral x spi	25,165	4	< 0.001
SÍNTOMAS SISTÉMICOS	χ^2	<i>gl</i>	<i>P</i>
spi	0	1	1
Genotipo viral	13614,257	4	< 0.001
Genotipo viral x spi	0	3	1

Así, la infectividad local se correlacionó significativamente con el tiempo tras la inoculación y con el genotipo viral comparado, existiendo una velocidad diferencial entre los genotipos para establecer la infección. Para el mismo linaje, la infectividad local de los virus más evolucionados de P11G es significativamente mayor que la de las poblaciones menos evolucionadas de P7G (*t* de Student, 37 *gl*, *P* < 0.001). De igual modo, las infecciones sistémicas también se correlacionan significativamente con el genotipo viral analizado y así, los virus evolucionados de P11G tienen mayor eficacia en establecer infecciones sistémicas que los de P7G (*t* de Student, 37 *gl*, *P* < 0.001).

Los resultados sugieren que la evolución de CTV, tras un cierto número de pases en *N. benthamiana*, permite la adaptación de sus poblaciones a esta planta, de modo que los virus evolucionados se acumulan más, infectan mejor y son capaces de causar infección sistémica por inoculación mecánica sin tratamiento previo de este huésped, algo inviable utilizando los virus de las plantas parentales en las mismas condiciones.

3.2.3. La acumulación en *N. benthamiana* de siRNAs derivados de CTV aumenta en correlación con los pases seriados.

En el apartado 3.2.1 se estudió la acumulación viral mediante el análisis *Northern blot* de extractos de RNAt de distintos pases, observándose un incremento en la acumulación del gRNA y sgRNAs de CTV a medida que evolucionaban las poblaciones del mismo en *N. benthamiana* y se adaptaban a este huésped. Empleando estos mismos extractos de RNAt y otros preparados a partir de cítricos

sanos e infectados sistémicamente (susceptibles o resistentes) por los aislados T36 y T318A de CTV, se analizó la expresión de siRNAs derivados de la infección causada por CTV.

En condiciones naturales, CTV alcanza títulos muy bajos y tiene un movimiento muy limitado en cítricos parcialmente resistentes a la infección, como el naranja amargo (AM) (Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Gómez-Muñoz *et al.*, 2016). En estas plantas la acumulación de siRNAs derivados de CTV es extremadamente baja (Fig. 13, panel izquierdo), al contrario de lo que ocurre en huéspedes cítricos sensibles en los que el virus se acumula y mueve a larga distancia sin problemas como CM o ND. En estos últimos, la acumulación predominante es la de siRNAs de 21 nt (Fig. 13) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011).

En nuestro experimento de evolución de CTV en *N. benthamiana*, ambos linajes mostraron una mayor acumulación de siRNAs a medida que avanzaban los pases de evolución en este huésped, siendo muy difíciles de detectar en el primer pase, pero observándose su aumento a partir del P4G (Fig 13, panel izquierdo, comparar P1 con P11). El perfil de siRNAs observado también varió a lo largo del experimento, de modo que en los primeros pases los siRNAs predominantes eran los de mayor tamaño (como los de 24 nt), mientras que a partir del P4G también se acumulaban los de menor tamaño incluyendo los de 22-21 nt e inferiores (Fig. 13), y en P11 éstos últimos fueron predominantes a pesar de que el patrón observado era mucho más complejo que el de cítricos infectados. Por lo tanto, la acumulación progresiva de los siRNAs de CTV con los pases evolutivos en *N. benthamiana* también reflejó la transición de la replicación de CTV en un huésped resistente a otro sensible en el que las poblaciones virales se han adaptado. Esta conclusión se confirmó por la acumulación muy elevada de siRNAs en las plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente por inoculación mecánica con virus evolucionados procedentes del P7 (apartado 3.2.2), ya que los mismos infectaron directamente esta especie sin pre-tratamiento supresor previo y alcanzaron cargas virales elevadas como en un huésped susceptible.

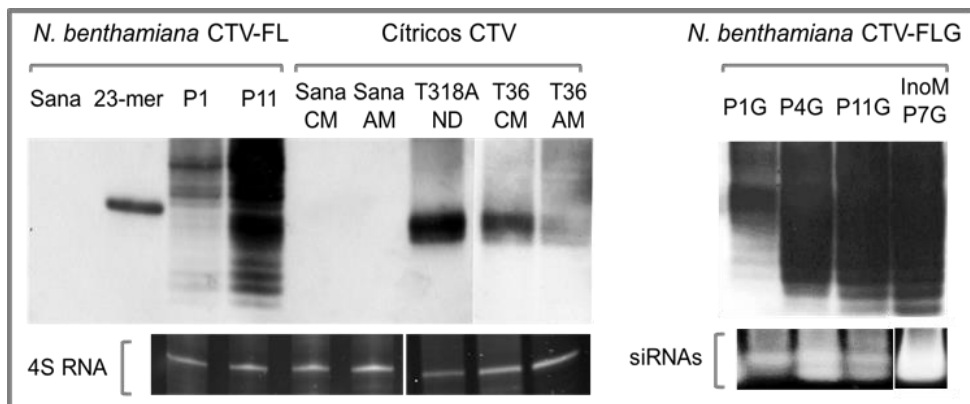


Fig. 13. Análisis *Northern blot* de extractos de RNAt de plantas de *N. benthamiana* sanas e infectadas sistémicamente con virus evolucionados de ambos linajes, procedentes de inoculación mecánica (InoM P7G) o de cítricos sanos e infectados por los aislados T36 y T318A. En los paneles superiores se muestra la acumulación de siRNAs derivados de la expresión de CTV examinados por PAGE al 17% con urea 8M, y en los inferiores los controles de carga de los rRNA (izquierda, PAGE 5% nativa) o siRNAs (derecha, agarosa 1%) teñidos con BrEt. En la hibridación molecular se utilizó la ribosonda 3'UTR-T36. 23-mer: marcador RNA de 23 nucleótidos; CM: *Citrus macrophylla*; AM: naranjo amargo; ND: naranjo dulce. G indica el linaje FLG.

Por otra parte, el cambio en el perfil de los siRNAs, en el que los de 21 nt (y 22 nt) se empezaron a acumular más respecto al resto conforme el virus fue evolucionando, reflejó un patrón más similar al observado en cítricos sensibles (Fig. 13), lo que sugiere una expresión de CTV similar en ambos huéspedes. De igual modo, también indica su mejor adaptación a la supresión de los sistemas de defensa basados en silenciamiento de RNA en esta planta.

3.3. Estabilidad genética de los virus CTV-NB en el primer pase en *N. benthamiana*.

Para estudiar la evolución y posible adaptación de CTV a lo largo de los pases en *N. benthamiana*, se determinó la secuencia consenso de la población viral mediante secuenciación completa de los linajes FL y FLG. Para ello, se utilizaron como molde los extractos de RNAt de cada pase y se amplificó el genoma de CTV mediante RT-PCR con los cebadores PM-2/37, PM-307 y PM-312,

obteniéndose fragmentos largos solapantes que cubrían la totalidad del gRNA del virus. Para amplificar los extremos 5' y 3'-UTR, éstos se poliadenilaron y se amplificaron empleando el cebador PM-1. Una vez obtenidos los cinco cDNAs, se sintetizaron siete productos solapantes de PCR que cubrían el gRNA completo de CTV y finalmente, se purificaron y secuenciaron.

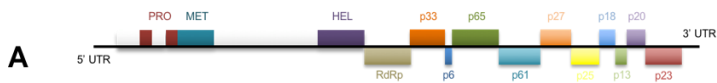
La secuencia consenso de la población viral de las plantas Parentales de ambos linajes no mostró ningún cambio respecto a los clones originales, observándose por tanto estabilidad genética. El gen de la GFP del linaje FLG, también se mantuvo estable y sin cambios en este primer pase de plantas agroinfiltradas.

3.4. Análisis de la variabilidad genética de los linajes CTV-NB en pases sucesivos en *N. benthamiana*.

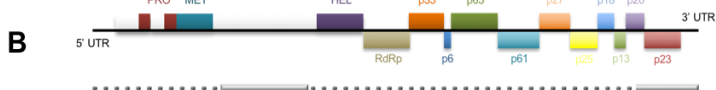
El análisis de las poblaciones virales de los linajes FL y FLG a lo largo de los pases se llevó a cabo mediante la secuenciación total o parcial del genoma de CTV (ver Material y Métodos). Las poblaciones virales secuenciadas completamente fueron las del parental y de los pases P4, P5 y P11 (para ambos linajes), mientras que la secuenciación de las poblaciones del resto de pases se centró en las regiones donde, tras los análisis genéticos previos, se habían detectaron la mayor parte de mutaciones (Tabla 6, Fig. 14).

Como se ha descrito anteriormente, la secuencia consenso de la población de CTV de las plantas parentales no reveló ningún cambio respecto a la secuencia de los clones agroinfiltrados en las plantas de *N. benthamiana*, ni tampoco la de los dos primeros pases (P1 y P2) (Tabla 6 paneles A y B). Por otra parte, la secuenciación completa del P4 sólo mostró una mutación en la p23 del linaje FL (Tabla 6, 7 y Fig. 14). Aunque dicha sustitución induce un cambio aminoacídico en la región del dedo de Zn, la estructura de éste no se vio alterada, y dicha mutación ya se observó en la secuencia consenso de p23 del pase anterior (P3FL, Tabla 6, panel B), aunque no volvió a detectarse en ningún otro pase evolutivo (Tabla 7).

Tabla 6. Resumen de las mutaciones detectadas en cada pase y linaje en la evolución de CTV en *N. benthamiana*. Los números indican el número de pase, G el linaje que expresa la proteína GFP y la P el clon de T36 ancestral (parental). Junto a cada tabla se representa un esquema del genoma de CTV con una línea gris que indica las regiones secuenciadas. A) Pases secuenciados por completo y mutaciones detectadas. B) Pases en los que se secuenció la región entre las 4 y 7 kb, el gen *p23*, y algunas regiones intermedias entre las anteriores (y patrón de mutaciones en estas regiones).



TIPO MUTACIÓN	PASE										
	P	PG	1	1G	4	4G	5	5G	11	11G	
TRANSICIONES	0	0	0	0	1	0	4	1	10	13	
TRANSVERSIONES	0	0	0	0	0	0	8	1	7	5	
SINÓNIMAS	0	0	0	0	0	0	6	0	9	4	
NO SINÓNIMAS	0	0	0	0	1	0	6	2	8	14	
UTR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
TOTAL	0	0	0	0	1	0	12	2	17	18	



TIPO MUTACIÓN	PASE																							
	P	PG	1	1G	2	2G	3	3G	4	4G	5	5G	6	6G	7	7G	8	8G	9	9G	10	10G	11	11G
TRANSICIONES	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	4	4	4	3	6	5	6	5	8	7	9
TRANSVERSIONES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	2	2	2	2	3	5	5
SINÓNIMAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	5	2
NO SINÓNIMAS	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	4	4	5	3	6	5	6	5	9	7	12
UTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	5	5	6	4	8	7	8	7	11	12	14

Tabla 7. Mutaciones detectadas en la secuenciación de los pases FL y FLG. Se indica la posición genómica, el gen o región implicada, los cambios de nucleótido y aminoácido, el dominio génico afectado y el pase donde se han encontrado. El color de las mutaciones está directamente relacionado con el que se observa en la Fig. 10. En todo el trabajo, se ha utilizado el convenio de referenciar las mutaciones con respecto a la secuencia del cDNA en lugar del gRNA viral (T en lugar de U).

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
3	18623	p23	G → A	G → E	Dedo Zn
4	18623	p23	G → A	G → E	Dedo Zn
5	282	Poliproteína	C → A		
5	1129	Poliproteína	G → C	R → P	
5	1226	Poliproteína	G → C		
5	1227	Poliproteína	T → G	Y → D	
5	1553	Poliproteína	T → C		
5	1574	Poliproteína	C → T		
5	1641	Poliproteína	G → T	V → F	
5	1653	Poliproteína	A → T	N → Y	
5	2477	Poliproteína	G → T	E → D	
5	2478	Poliproteína	C → A	R → S	
5	3737	Poliproteína	G → A		MET
5	3854	Poliproteína	T → C		MET
5G	1176	Poliproteína	T → A	L → I	
5G	1524	Poliproteína	G → A	V → I	
6	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
6	18740	p23	C → T	S → F	
6G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
6G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
6G	18740	p23	C → T	S → F	
6G	18838	p23	C → T	R → C	
6G	19017	p23	C → T		
7	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
7	18740	p23	C → T	S → F	
7	18838	p23	C → T	R → C	
7	18956	p23	C → T	S → L	
7	19017	p23	C → T		
7G	4752	Poliproteína	T → G	L → V	
7G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
7G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
7G	18740	p23	C → T	S → F	

Capítulo IV

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
7G	18838	p23	C → T	R → C	
7G	19017	p23	C → T		
8	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
8	18740	p23	C → T	S → F	
8	18956	p23	C → T	S → L	
8	19017	p23	C → T		
8G	4752	Poliproteína	T → G	L → V	
8G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
8G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
8G	18740	p23	C → T	S → F	
8G	18838	p23	C → T	R → C	
8G	18956	p23	C → T	S → L	
8G	18976	p23	C → T		
8G	19017	p23	C → T		
9	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
9	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
9	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
9	18838	p23	C → T	R → C	
9	18956	p23	C → T	S → L	
9	18976	p23	C → T		
9	19017	p23	C → T		
9G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
9G	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
9G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
9G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
9G	18838	p23	C → T	R → C	
9G	18956	p23	C → T	S → L	
9G	18976	p23	C → T		
9G	19017	p23	C → T		
10	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
10	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
10	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
10	18740	p23	C → T	S → F	
10	18956	p23	C → T	S → L	
10	18976	p23	C → T		
10	19017	p23	C → T		
10G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
10G	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
10G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
10G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
10G	18740	p23	C → T	S → F	
10G	18838	p23	C → T	R → C	
10G	18953	p23	C → A	T → N	
10G	18956	p23	C → T	S → L	
10G	18959	p23	C → T	S → L	
10G	18976	p23	C → T		
10G	19017	p23	C → T		
11	106	5'-UTR	C → T		
11	131	Poliproteína	C → A	F → L	
11	396	Poliproteína	G → A		
11	1129	Poliproteína	G → C	R → P	
11	2627	Poliproteína	T → C		
11	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
11	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
11	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
11	11208	p33	A → G		
11	15148	p61	C → G		
11	17049	p18	A → T	K → N	
11	17888	p20	C → T	S → L	
11	18559	p23	G → C	G → R	Dedo Zn
11	18596	p23	T → C	V → A	Dedo Zn
11	18768	p23	G → A		
11	18976	p23	C → T		
11	19017	p23	C → T		
11G	106	5'-UTR	C → T		
11G	726	Poliproteína	G → A	E → K	
11G	3577	Poliproteína	A → G	E → G	MET
11G	4356	Poliproteína	T → G	F → V	
11G	4752	Poliproteína	T → G	L → V	
11G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
11G	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
11G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
11G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
11G	10537	RdRp	A → G	K → E	
11G	16945	p18	G → A	A → T	

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
11G	18740	p23	C → T	S → F	
11G	18838	p23	C → T	R → C	
11G	18953	p23	C → A	T → N	
11G	18976	p23	C → T		
11G	18997	p23	C → T	L → F	
11G	19017	p23	C → T		
11G	19151	3'-UTR	G → A		

Las poblaciones de CTV del P5 (secuenciación completa) presentaban dos (FLG) y 12 sustituciones nucleotídicas (FL) (Tabla 6, panel A y Tabla 7), que originaron dos cambios aminoacídicos en la poliproteína del linaje FLG y seis en el FL (Tabla 7 y Fig. 14). Estas sustituciones están presentes en la región de las primeras 4 kb de la poliproteína, aunque ninguna de ellas afecta los dominios conservados de las papain-like proteasas y de la metiltransferasa. Es de destacar que una de las mutaciones, presente en la posición 1129 del genoma del linaje FL, se mantuvo hasta el P11 (Tabla 7, Fig. 14).

La secuencia consenso de la población viral del P11 mostró un total de 17 cambios nucleotídicos en el linaje FL (ocho cambios aminoacídicos) y 18 en el FLG (14 cambios aminoacídicos). La distribución de éstos a lo largo del genoma fue muy desigual, acumulándose en la poliproteína y entre los genes RdRp, p33, p61, p18, p20 y/o p23 (Tabla 6, 7 y Fig. 14). Más concretamente, se detectó una gran variabilidad genética en determinadas regiones genómicas que afectan a la poliproteína y al gen *p23*. Éstas son puntos calientes o “hot spots” de acumulación y fijación de mutaciones a lo largo de los pases evolutivos y se producen de forma convergente en ambos linajes. Cinco de estos cambios, presentes en el gen de la poliproteína y correspondientes a las posiciones 106, 4771, 6115, 6222 y 6244, fueron comunes en ambos linajes (Tabla 6, 7 y Fig. 14).

Es importante destacar que en las secuencias consenso completas de ambos linajes de CTV en los P1, P4, P5 y P11, se encuentran mutaciones puntuales, pero no inserciones o deleciones (Tabla 6), lo que manifiesta la estabilidad de los genotipos virales en este nuevo huésped a lo largo de los pases seriados. Las

transiciones (Ts) son más frecuentes que las transversiones (Tv) en ambos linajes, de acuerdo con el principio bioquímico de que las primeras son más fáciles de aparecer que las segundas, así como que, cuando actúa la selección negativa o purificadora, la tasa se desvía hacia las transiciones porque éstas resultan más frecuentemente en mutaciones silenciosas. En este sentido, las tasas Ts/Tv oscilaron entre 1.43 (linaje FL) y 2.6 (linaje FLG) y se detectó una diferencia importante en el tipo de mutaciones sinónimas frente a no-sinónimas según el linaje, ya que en el FL se mantuvieron equilibradas (9/8) mientras que en el FLG predominaron las últimas (4/14).

Al observar que la mayor parte de los cambios en la región de la poliproteína comprendida entre las 4 y las 7 kb y en el gen *p23*, la secuenciación parcial del resto de pases se centró en estas regiones (aunque en P9 y P10 la secuenciación se extendió a algunos otros genes en los que se detectaron previamente mutaciones en el P11) con el fin de analizar la dinámica de aparición de las mismas. Al examinar las secuencias consenso obtenidas para todos los pases y linajes en estas dos regiones parciales, los resultados del espectro de mutaciones detectadas fueron similares al obtenido para las secuencias completas (Tabla 6, comparar paneles A y B). En este caso, las tasas Ts/Tv de ambos linajes fueron más similares, de 1.4 vs 1.8 (FL y FLG, respectivamente), mientras que el predominio de mutaciones no sinónimas fue más desequilibrado en el linaje FLG (2/12 vs 5/7). La variación del espectro de mutaciones con los pases, mostró un aumento importante en el número de éstas en general, y en las de tipo no sinónimo en particular, a partir del P7 (Tabla 6, panel B).

Con respecto a su aparición, se encontró que las mutaciones de las posiciones 4771 y 6222 de la poliproteína aparecieron y se mantuvieron en las poblaciones virales desde el P6 (Fig. 14), y que nuevas sustituciones en esta región aumentando en número y fijándose con los pases de ambos linajes hasta llegar al P11 (Tabla 6 y rombos de colores en la Fig. 14). Un resultado muy similar se obtuvo con el gen *p23*, donde el número de mutaciones aumentó considerablemente en ambos linajes desde el P6-P7. Es de resaltar que una gran parte de estas sustituciones fueron convergentes para ambos linajes y se fijaron en sus poblaciones con el tiempo, concretamente las cinco de las posiciones 18740, 18838, 18956,

18976, 19017 (Tabla 6 y rombos de colores en la región p23 de la Fig. 14). Al mismo tiempo, aparecieron y se fijaron nuevas mutaciones desde P8 a P10, y muchas de ellas se mantuvieron hasta el P10 y P11G. Por otra parte, el gen de la GFP, presente en el linaje FLG, no sufrió cambios nucleotídicos y se mantuvo estable y funcional a lo largo de los pases.

Por último, al analizar los cambios nucleotídicos detectados a lo largo de la evolución experimental se observó, en general, una predominancia de las transiciones C→T (24 en el linaje FL y 36 en el FLG, ver Tabla 7). Para comparar con detalle el patrón de sustituciones nucleotídicas, se analizaron a continuación dos regiones, la de gen *p23* y la de la poliproteína, ya que se disponía de las secuencias consenso de todas las poblaciones de ambos linajes y pases.

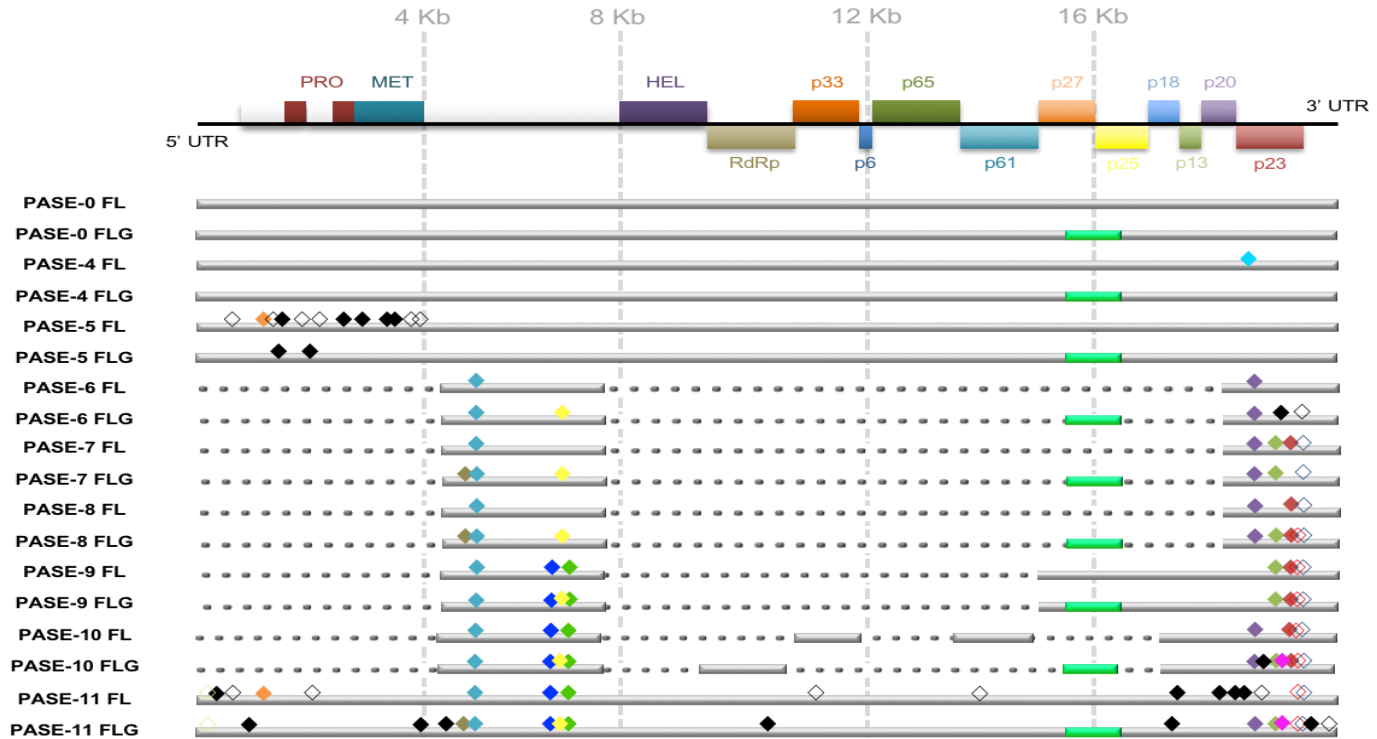


Fig. 14. Distribución de las mutaciones encontradas en el gRNA de CTV a lo largo de los distintos pases de evolución en *N. benthamiana*. Las barras de color gris indican los fragmentos del genoma secuenciadas y las verdes el gen de la GFP presente en el linaje FLG. A su vez, los rombos vacíos indican mutaciones sinónimas, mientras que sólidos las no-sinónimas; los rombos de color indican que la mutación está presente en varios pases, mientras que los negros que las mutaciones solo aparecen una única vez durante la evolución.

3.4.1. Variabilidad genética y evolución de una región de la poliproteína de CTV-NB en pases seriados de linajes independientes: convergencia adaptativa.

Como ya se ha comentado, la mayor parte de mutaciones en la secuencia consenso del gen de la poliproteína de CTV se localizó en la región comprendida entre las 4 y las 7 kb. La mutación C4771G apareció en P6 y se fijó en ambos linajes hasta el final del experimento. Lo mismo sucedió con el cambio C6222T, si bien éste sólo se fijó en el linaje FLG. Más tarde, en P9, se encontraron dos nuevas mutaciones (T6115A y C6244T) que también se fijaron en ambos linajes hasta el P11 (Fig. 15). Por el contrario, la mutación T4752G apareció de forma intermitente en P7, P8 y P11 del linaje FLG (Fig. 15). Ninguna de estas cinco mutaciones afectó a dominios de la proteína, pero todas ellas provocaron cambio de aminoácido en la proteína sintetizada.

Además de estas cinco mutaciones, en la secuencia completa de P5 y P11 también se encontraron cambios en la primera región del gen (hasta las 4 kb), algunas de ellas sinónimas y otras no sinónimas, y una común en el linaje FL de P5 y P11, G1129C (Fig. 14, Tabla 7). Ninguna de éstas afectó a dominios funcionales de la poliproteína.

Tres de los cambios encontrados en la poliproteína con los pases sí se encontraron en la región que codifica la metiltransferasa (MET) (Tabla 7), aunque solamente uno, el A3577G aparecido en P11G, se localizó en uno de los seis dominios funcionales conservados (MTR I a MTR IV). No obstante, el cambio producido no afectó ninguno de los aminoácidos clave descritos.

Por otra parte, las frecuencias de sustitución nucleotídica observadas en esta región de la poliproteína a lo largo de la evolución experimental, difirieron del 25% (valor medio esperado si no existe sesgo en el tipo de base sustituida), siendo del 21.64% (A), 32.22% (T/U), 18.50% (C) y 27.64% (G) (Tabla 8). A su vez, las tasas T_s/T_v fueron mucho más elevadas para las pirimidinas (k_2) que para las purinas (k_1) ($k_2= 2.936$ vs $k_1=0.278$). La Tabla 8 muestra la predominancia clara de las T_s de tipo $C \rightarrow T$) seguidas de las T_v $A \rightarrow T$ y $G \rightarrow T$.

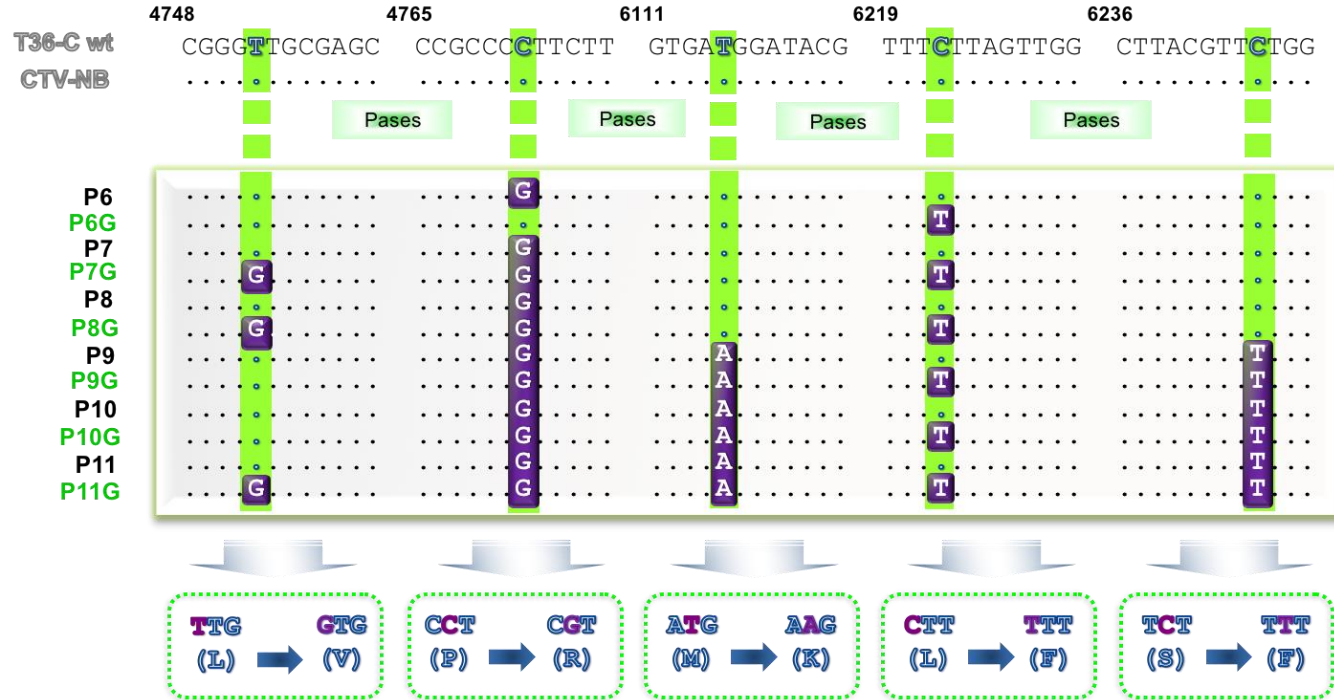


Tabla 8. Matriz de sustitución nucleotídica de la región estudiada de la poliproteína de CTV para los linajes evolucionados en *N. benthamiana* a lo largo de 11 pases (método estadístico de máxima probabilidad y modelo de Tamura-Nei).

	A	T	C	G
A*	-	8.89	5.1	2.12
T	5.97	-	14.98	7.62
C	5.97	26.09	-	7.62
G	1.66	8.89	5.1	-

*Cada valor de la tabla es la probabilidad de sustitución nucleotídica de un tipo de base (fila) por otro (columna). La suma de los valores se iguala a 100. Los valores de las tasas de sustitución transicional (**Ts**) se muestran en negrita, mientras que los de sustitución transversal (*Tv*) en cursiva. Tamura *et al.*, 2004; 2013.

El análisis filogenético de las secuencias consenso de ambos linajes y de todos los pases en *N. benthamiana*, junto con las secuencias parentales de ambos y la ancestral del aislado T36, se realizó con el modelo de selección de Tamura-Nei+G (distribución gamma), el método estadístico de máxima probabilidad (maximum likelihood) y un árbol Neighbor-Joining con 1000 réplicas de remuestreo (bootstrap) (Fig. 16). Los valores de diversidad nucleotídica media (π) para la población completa fueron muy bajos, de tan sólo 0.0006 ± 0.0003 ($\chi \pm SE$) e idénticos a los de la propia diversidad intralínea.

En el árbol se puede comprobar como los pases P1 a P5 de ambos linajes están emparentados y más próximos al gen salvaje, a pesar de que el linaje P5 se distancia de los demás debido a la acumulación de mutaciones únicas que se pierden a lo largo de su evolución posterior (de hecho en este pase se detectan más *Tv* que *Ts*, al contrario de lo que se observa en el pase final P11). A partir de P6FL se observan dos ramas filogenéticas distintas, la más próxima al gen salvaje agrupa los pases P6 a P8 del linaje FL, mientras que la más alejada agrupa del P9 a P11 del mismo linaje, de modo que la filogenia refleja la evolución experimental llevada a cabo. Lo mismo sucede con el linaje FLG, pero en este caso quedan agrupados, por un lado P6G, P7G y P8G, y por otro P9G, P10G y P11G. La secuencia de P11G sería la más evolucionada respecto al

gen ancestral (Fig. 16). Es importante destacar que, la intercalación de las secuencias de ambos linajes a lo largo de diversas ramas del árbol, refleja la convergencia evolutiva de las secuencias de ambos linajes independientes.

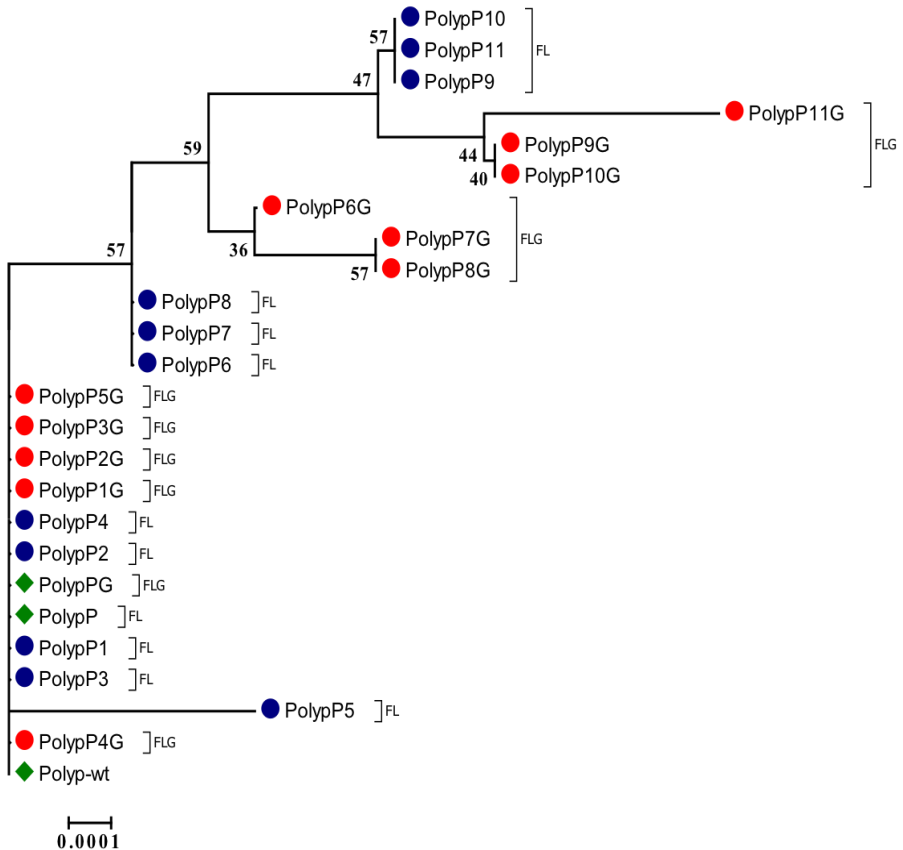


Fig. 16. Árbol filogenético enraizado con la secuencia ancestral del aislado T36 (Polyp-wt en rombo verde) utilizando las secuencias de la región 4-7 Kb del gen de la poliproteína de todos los países y ambos linajes. Obtenido con el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas de remuestreo (bootstrap) y el modelo de selección nucleotídica de Tamura Nei con una distribución gamma. Las secuencias consenso del linaje FL aparecen con círculos azules y las del linaje FLG en rojo; las secuencias parentales de ambos linajes se representan con rombos verdes.

Con el fin de determinar la dirección e intensidad de la presión selectiva sobre esta región, se estimaron los valores medios de la tasa de sustitución nucleotídica en sitios sinónimos ($d_S=0.0003\pm 0.0002$) y no-sinónimos ($d_N=0.0007\pm 0.0003$) utilizando el programa MEGA 6.0. La diferencia d_N-d_S (0.0004 ± 0.0005) aunque positiva es un valor muy cercano a 0, lo que sugiere que muchas de las mutaciones observadas en la población serían selectivamente neutras. Por ello, para determinar si existen sitios sometidos a selección positiva o negativa en la secuencia de la poliproteína analizada, se llevó a cabo un análisis de selección por codón con el programa HYPHY y el modelo de selección HKY implementado en el paquete MEGA. Los resultados significativos se muestran en la tabla siguiente:

Codon	Syn (s)	Non-syn (n)	Syn sites (S)	Non-syn sites (N)	dS	dN	dN-dS	P-value	Normalized dN-dS
112	1	0	0,4232	2,2789	2,3628	0	-2,362	1	-815,8840
229	1	0	0,5763	2,2376	1,7349	0	-1,734	1	-599,0747

Syn (s): sustituciones sinónimas, Non-syn (n): sustituciones no-sinónimas, Syn sites (S)= proporción de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo, Non-syn sites (N): proporción de sustituciones no-sinónimas por sitio no-sinónimo, dS= tasa de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo, dN= tasa de sustituciones no-sinónimas por sitio no-sinónimo.

Los resultados indican que existen dos codones (112 y 229 de la secuencia comparada) con valores negativos de dN-dS que se encuentran sometidos significativamente (P-value=1) a selección negativa (posiciones de aminoácido 1212 y 1251 en la poliproteína y posiciones genómicas 3737 y 3854). Ambos sitios se encuentran en la región génica que codifica para la metiltransferasa, aunque fuera de los 6 dominios conservados descritos, pero hay que destacar que sí son posiciones invariables en todas las secuencias completas de CTV depositadas en las bases de datos. Estos valores negativos podrían observarse por efecto de fenómenos de arrastre selectivo y selección de fondo, generando una disminución de la variabilidad

genética por fijación de mutaciones ventajosas o eliminación de deletéreas, y observar mutantes de frecuencias muy bajas. En este caso, parece existir una presión selectiva para eliminar variación en esas posiciones sinónimas 112 y 229 que no es tolerable para la poliproteína viral.

3.4.1. Variabilidad genética del gen *p23* en los linajes evolucionados de CTV-NB: fijación de mutaciones, selección y convergencias evolutivas.

En la secuencia consenso del gen de la proteína *p23* se encontraron 3 sustituciones no-sinónimas en el dominio de unión a RNA (Fig. 17, panel A). Una de ellas estaba presente en los P3 y P4 del linaje FL, y causaba un cambio de aminoácido G→E en el dedo de Zn, mientras que las otras dos aparecieron en el P11 del mismo linaje, provocando los cambios de aminoácido G→R y V→A también en el dedo de Zn (Fig. 17, panel A). No obstante, estas mutaciones no afectaban los aminoácidos clave que preservan la estructura del dominio de unión a RNA y su potencial funcionalidad (Fig. 17, panel B).

Además de éstas, se encontraron cinco sustituciones más, comunes en ambos linajes, tres de ellas con cambio aminoacídico, fuera de la región de unión a RNA (Fig. 18). Estas mutaciones, C18740T, C18838T, C18956T, C18976T y C19017T, aparecieron durante los primeros pases y se fijaron a lo largo del experimento (Tabla 7 y Fig. 14). El resto de mutaciones encontradas aparecieron en P10 y P11, también fuera del dominio del dedo de Zn, y no afectaron a la funcionalidad de la proteína. En P10G aparecieron las sustituciones C18953A (ésta también en P11G) y C18959T, ambas no sinónimas, mientras que en P11 se encontró el cambio G18768A y en P11G la mutación C18997T, la primera de ellas sinónima y la última con cambio de aminoácido (Tabla 7 y Fig. 14).

En cuanto al patrón de sustitución nucleotídica observado para *p23*, tal como ocurría con la poliproteína, las frecuencias nucleotídicas difirieron mucho del 25% para las A (29.80%) y C (19.10%), pero fueron equilibradas para las T/U (25.19%) y G (25.92%). De nuevo, las tasas Ts/Tv eran extremadamente más elevadas para las pirimidinas que para las purinas, con una gran

frente a una π interlinaje que tan sólo representaba el 0.0008 ± 0.0008 (modelo de selección nucleotídico Kimura-2 parámetros con distribución gamma, K2P+G).

Tabla 9. Matriz de sustitución nucleotídica del gen *p23* de CTV para los linajes evolucionados en *N. benthamiana* a lo largo de los 11 pases (método estadístico de máxima probabilidad y modelo de Tamura-Nei).

	A	T	C	G
A	-	0.2	0.15	4.08
T	0.24	-	38.65	0.21
C	0.24	50.97	-	0.21
G	4.69	0.2	0.15	-

* Los valores de las tasas de sustitución transicional (**Ts**) se muestran en negrita, mientras que los de sustitución transversional (*Tv*) en cursiva. Resto como Tabla 8.

En el árbol filogenético obtenido, teniendo en cuenta todas las poblaciones, se comprueba como los pases P1, P2 y P5 del linaje FL son los más emparentados con el gen *p23* salvaje, mientras que los pases P3 y P4 del mismo linaje, debido a las mutaciones únicas aparecidas en el dominio del dedo de Zn, se mantienen un poco distanciadas. Un poco más alejado del gen salvaje se encuentra P6, y a continuación aparecen varias ramas filogenéticas que agrupan P7 y P8 por un lado, P9 y P10 por otro, y finalmente P11 como el más alejado y, por tanto, más evolucionado. Por otra parte, el linaje FLG agrupa, por un lado, los cinco primeros pases junto con su parental. Este grupo aparece distanciado del gen *p23* salvaje debido a una mutación sinónima del clon (A18726G) que se introdujo a la hora de clonar el gen de la GFP. Esta mutación no se ha tenido en cuenta a la hora de realizar el resto de análisis. Por otro lado, el resto de pases de este linaje quedan agrupados en dos clusters, el primero de ellos incluye los pases P6G, P7G y P11G, y el segundo incluye los pases P8G, P9G y P10G (Fig. 19).

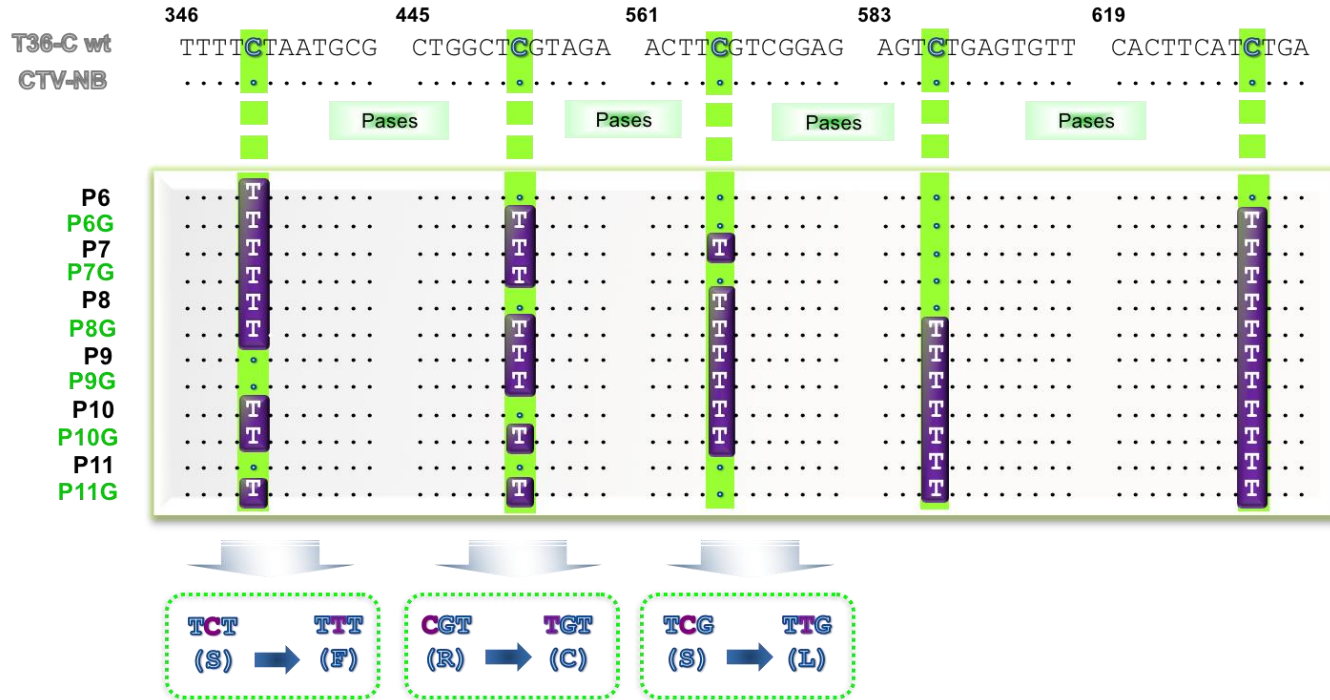


Fig. 18. Alineamiento parcial de las secuencias consenso del gen *p23* a lo largo de los pases de evolución en *N. benthamiana*. En la parte superior, primera línea, se muestra la secuencia parcial del gen *p23* ancestral del aislado de origen de cítricos T36 wt (T36-C wt) y en la segunda la secuencia parental de *N. benthamiana* (CTV-NB). Los puntos indican identidades de secuencia, los números encima de las bases indican la posición en la secuencia del gen. En el panel recuadrado se muestran las mutaciones encontradas en la secuencia del gen y el Pase correspondiente. Las 5 sustituciones comunes en ambos linajes están marcadas con letras blancas sobre fondo morado, y los 3 cambios de aminoácido que generan se muestran en la parte inferior de la figura.

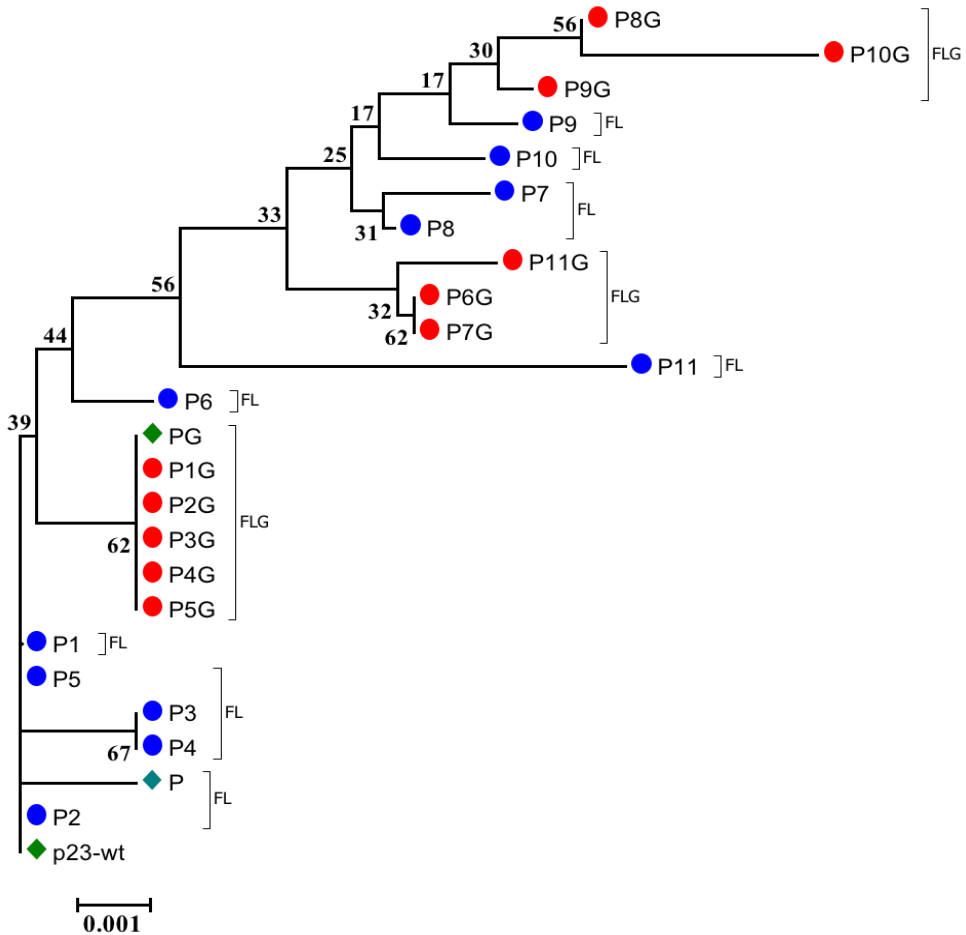


Fig. 19. Árbol filogenético enraizado con la secuencia de p23 ancestral (T36 wt) utilizando las secuencias del gen *p23* de todos los paises y ambos linajes. Obtenido con el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap, modelo de selección K2P+G. Resto como en Fig. 15.

Por otra parte, los valores medios estimados de las tasas de sustitución nucleotídica para p23 fueron muy diferentes a los anteriores, arrojando un valor $d_S=0.0121\pm 0.0068$, un $d_N=0.0038\pm 0.0016$, y una diferencia d_N-d_S negativa de -0.0083 ± 0.0084 . Un valor negativo sugiere una mayor presencia en la

población de polimorfismos de baja frecuencia por acción de la selección purificadora.

Para determinar si existían sitios específicos sometidos a selección positiva o negativa en el gen *p23*, se llevó a cabo un análisis de selección por codón del mismo modo que en el apartado anterior (con el modelo de selección K2P+G en este caso). Los resultados significativos fueron los siguientes:

Codon	Syn (s)	Non-syn (n)	Syn sites (S)	Non-syn sites (N)	dS	dN	dN-dS	P-value	Normalized dN-dS
112	3	0	0,7373	2,1373	4,0686	0	-4,0686	1	-101,8746
126	1	0	1,6299	1,3195	0,6135	0	-0,6135	1	-15,3614
196	3	0	1,7646	1,2142	2,2666	0	-2,2666	1	-56,7551
209	1	0	0,9515	2,0484	1,0509	0	-1,0509	1	-26,3142

Los codones 112, 126, 196 y 209 de *p23* (posiciones genómicas 18726, 18768, 18976 y 19017, respectivamente) con valores negativos de dN-dS, se encuentran sometidos a selección negativa de forma significativa (P-value=1). Ninguno de estos sitios afecta al dominio del dedo de Zn. La mutación en la posición 18726, como se ha comentado anteriormente, no se ha tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Estos datos indican una presión selectiva con un fuerte efecto de las mutaciones sinónimas, que eliminan variación en estas 4 posiciones de la proteína, al no resultar ésta tolerable para el virus.

La observación con detalle de la acumulación de mutaciones en la secuencia consenso del gen *p23* en los últimos pases evolutivos revela un salto importante del P9 al P11, sobre todo en el linaje FLG. Con el fin de analizar la población de variantes de secuencia individuales y la retención de determinadas de ellas en la población viral a distintas frecuencias (y procedentes de pases anteriores), se clonaron los amplicones de RT-PCR obtenidos de los pases P9G y P11G (y utilizados previamente para determinar la secuencia consenso). Se secuenciaron un número de ~20 clones por población, y el análisis filogenético de estas variantes junto al resto evolucionadas en *N. benthamiana* reveló que, la mayor parte

de secuencias individuales de P9G presentan pocos cambios y están directamente emparentadas con la secuencia salvaje de p23, siendo la diversidad genética de la población de 0.0022 ± 0.0012 ($\chi \pm SE$). De hecho, cerca de la mitad de las secuencias (11) correspondían a la parental de p23. Algunas de las secuencias formaban “clusters” por parejas que se alejaban poco a poco de la secuencia parental, así como el clon 14 que sería idéntico a la secuencia consenso de P9G (Fig. 20). En cambio, la diversidad genética (π) de la población de variantes de P11G fue más elevada ($\chi \pm SE$ de 0.041 ± 0.0017), de modo que sólo tres de los clones eran idénticos a la secuencia salvaje de p23, otros tres eran iguales a la secuencia ancestral de los pases P6G y P7G (evolutivamente anteriores al linaje P11G), y el resto formaba un grupo independiente mayormente diversificado y alejado de la secuencia consenso de P11G (Fig. 21).

La presencia en las poblaciones de P11G y P9G de una proporción de ~7-50% de variantes con la secuencia parental de p23, indica que dicha secuencia, al menos en este gen, no es desplazada por completo en este nuevo huésped y permanece como reservorio latente en la cuasiespecie viral en distintas proporciones. Este fenómeno enlaza con el concepto de “memoria de las cuasiespecies” y “memoria molecular” (para un review Briones y Domingo, 2008), que hace referencia a la persistencia de genomas minoritarios en las cuasiespecies virales cuya fluctuación en el espectro de mutantes, por cambios en el ambiente, es muy importante para la adaptación, supervivencia y patogenicidad de los virus. Estas situaciones son responsables del fracaso de las estrategias terapéuticas en enfermedades causadas por importantes virus patógenos de animales y humanos (Ruiz-Jarabo et al., 2000; Briones et al., 2003; Briones y Domingo, 2008), consecuencia de la presencia de “genomas memoria minoritarios” en sus cuasiespecies resistentes a un fármaco o grupo de fármacos concretos. Estos genomas minoritarios tienen al menos una mutación respecto del genoma mayoritario en una cuasiespecie concreta, proporcionan información sobre la historia evolutiva de ésta, y se encuentran en una proporción inferior al 50%. En nuestro caso, esta situación se correlaciona claramente con la que observamos para la cuasiespecie de P11G, con una presencia del 7% de genomas

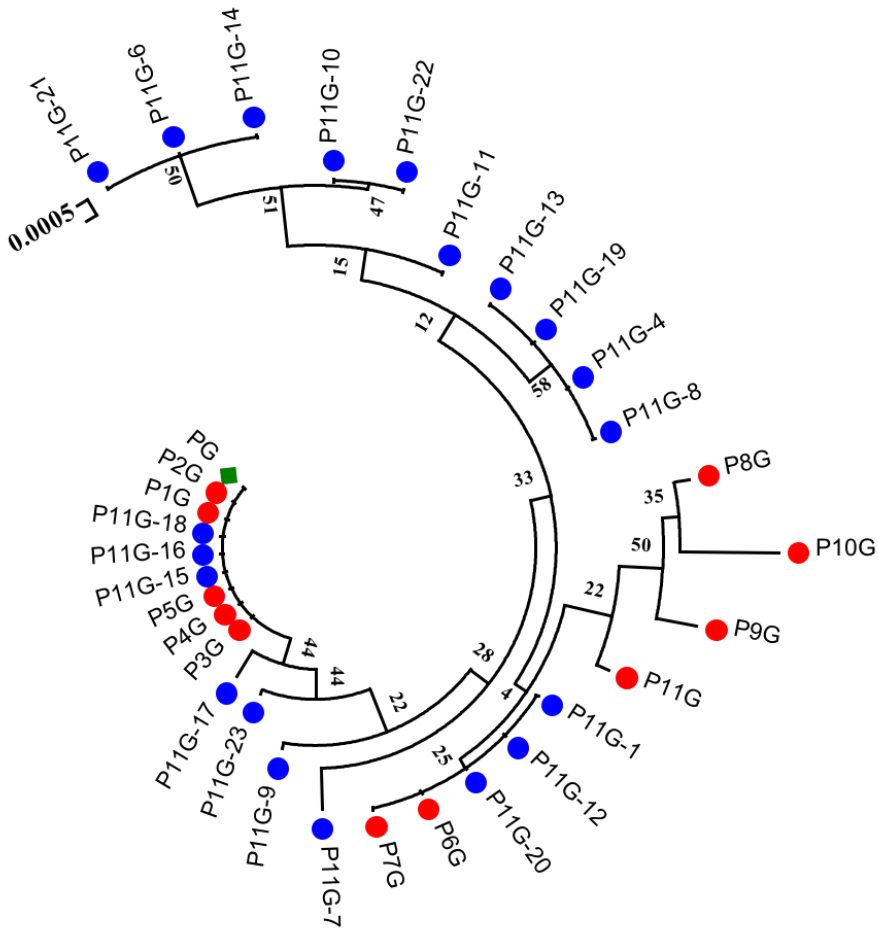


Fig. 21. Árbol filogenético enraizado con la secuencia parental de PG (rombo verde) obtenido a partir de las secuencias del gen *p23* de los pases correspondientes al linaje FLG (en azul) junto con secuencias individuales clonadas de P11G (en verde claro). Obtenido con el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

3.5. Caracterización biológica y genética de los virus evolucionados CTV-NB en su huésped natural: pases a cítricos

En los apartados anteriores se han caracterizado molecularmente las poblaciones CTV-NB evolucionadas por pases

seriados en el huésped *N. benthamiana*. El estudio ha reflejado la existencia de convergencias evolutivas en linajes genéticos independientes del virus, la adaptación del virus al nuevo huésped con un aumento significativo de las tasas de infectividad y acumulación viral, y la aparición y fijación de cambios de secuencia potencialmente adaptativos. Por ello, nos planteamos analizar la capacidad infectiva y patogénica de estos virus evolucionados de regreso a su huésped ancestral, cítricos, y determinar: i) si existen cambios en la infectividad en cítricos en función de los pases realizados en *N. benthamiana*, en función del genotipo del virus (FL vs FLG) o del tipo de inoculación realizada (mecánica vs injerto), ii) si hay diferencias de patogenicidad de los virus CTV-NB en diversos huéspedes cítricos en comparación con el aislado salvaje de cítricos y, iii) si los cambios de secuencia detectados en el espectro de mutantes de las poblaciones evolucionadas de CTV-NB, se mantienen, compensan o revierten una vez de regreso a cítricos.

Para evaluar la capacidad de los virus evolucionados de inducir los síntomas característicos del aislado original T36 en cítricos, se realizó su caracterización biológica en cítricos sensibles y resistentes a la infección por CTV. Primero, se inocularon mecánicamente plantas de *C. macrophylla* con viriones purificados de pases CTV-NB seleccionados del experimento de evolución. Una vez establecida la infección sistémica en estas plantas, se inocularon por injerto cítricos indicadores (lima mexicana, naranjo dulce, pomelo y naranjo amargo) y se observó la inducción de síntomas.

3.5.1. Inoculaciones mecánicas de viriones procedentes de los Pases CTV-NB 1, 4, 5 y 11 en plantas de *Citrus macrophylla*: infectividad y acumulación viral.

La infectividad de los linajes evolucionados CTV-NB de los Pases 1, 4 y 11 del linaje FLG, y P5 del linaje FL se evaluó en plantas de *C. macrophylla* mediante inoculación mecánica (en 4 y 8 plantas) de los viriones semipurificados. La infección se siguió mediante IP-ELISA de hojas y tallos o por visualización de cortes transversales de tallos y peciolo con una lupa UV en el caso del linaje GFP (ver Fig. 23, 24 y 25).

Tabla 10. Tasas de infectividad de los virus evolucionados CTV-NB inoculados mecánicamente en plantas de CM madre (CM*), y de las variedades de cítricos indicadores injertados a partir de estas plantas. La tasa de infectividad (%) es el número de plantas infectadas respecto al total de inoculadas/injertadas a distintos tiempos post-inoculación (wpi o mpi). CM: *Citrus macrophylla*; ND: naranjo dulce; LM: lima mexicana; AM: naranjo amargo; POM: pomelo.

	1 MPI		1,5 MPI		2 MPI		3 MPI									
	1 WPI	2 WPI	3 WPI	4 WPI	5 WPI	6 WPI	7 WPI	8 WPI	9 WPI	10 WPI	11 WPI	12 WPI				
PARENTALES FLG	INFECT.	INFECT.	INFECT.	INFECT.	%	INFECT.	INFECT.	%	INFECT.	INFECT.	%	INFECT.	INFECT.	INFECT.	INFECT.	%
CM* (Ino-M)						4/4	100			100			4/4		100	
CM (Injerto de CM*)				4/4	100	4/4	100		4/4	100			4/4		100	
PASE 1 FLG																
CM* (Ino-M)				4/8	50	7/8	88			88			8/8		100	
CM (Injerto de CM*)				4/8	50	5/8	75		5/8	75			5/8		75	
ND (Injerto CM*)				3/8	38	8/8	100		8/8	100			8/8		100	
LM (Injerto CM*)				5/6	83	5/6	83		5/6	83			5/6		83	
AM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100					100	
POM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100					100	
PASE 4 FLG																
CM* (Ino-M)						3/5	60		5/5	100					100	
CM (Injerto de CM*)						4/5	80		5/5	100					100	
PASE 5 FL																
CM* (Ino-M)						4/8	50		8/8	100					100	
CM (Injerto de CM*)				3/8	38	4/8	50		4/8	50			4/8		50	
ND (Injerto CM*)				4/8	50	8/8	100		8/8	100			8/8		100	
LM (Injerto CM*)				5/6	83	5/6	83		5/6	83			5/6		83	
AM (Injerto CM*)				2/3	67		67		3/3	67					67	
POM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100					100	
PASE 11 FLG																
CM* (Ino-M)				1/4	25	4/4	100			100					100	
CM (Injerto de CM*)				6/6	100		100		6/6	100				6/6	100	
ND (Injerto CM*)				5/5	100		100		5/5	100				5/5	100	
LM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100				3/3	100	
AM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100				3/3	100	
POM (Injerto CM*)				3/3	100		100		3/3	100				3/3	100	

Durante el primer mpi, se observó un retraso en la infección de las plantas de CM inoculadas mecánicamente con los viriones evolucionados: alrededor del 50% se infectaron con los pases P1G y P5FL, el 38% con el P4G, y tan sólo el 25% con el P11G, frente al 100% de cítricos infectados en ese mismo período de tiempo con la población parental de T36 (Tabla 10). Sin embargo, estos porcentajes de infectividad aumentaron a los 2 mpi en todos los casos alcanzando el 88-100%. Un análisis GLM mostró que las diferencias entre genotipos virales con respecto a la infectividad de CTV-NB de regreso a cítricos (CM) era significativa ($\chi^2 = 522,263$, gl 3, $P < 0.001$).

A

PASE Y AÑO	CUANTIFICACIÓN ($\bar{X} \pm S.E.$)
P1G Año 1	$7.98 \times 10^3 \pm 304$
P1G Año 2	$6.35 \times 10^3 \pm 105$
P1G Año 3	$1.03 \times 10^4 \pm 177$
P5FL Año 1	$4.16 \times 10^3 \pm 227$
P5FL Año 2	$3.83 \times 10^3 \pm 76$
P5FL Año 3	$3.63 \times 10^3 \pm 152$
P11G Año 1	$6.04 \times 10^3 \pm 193$
P11G Año 2	$9.01 \times 10^3 \pm 646$
P11G Año 3	$1.09 \times 10^4 \pm 339$

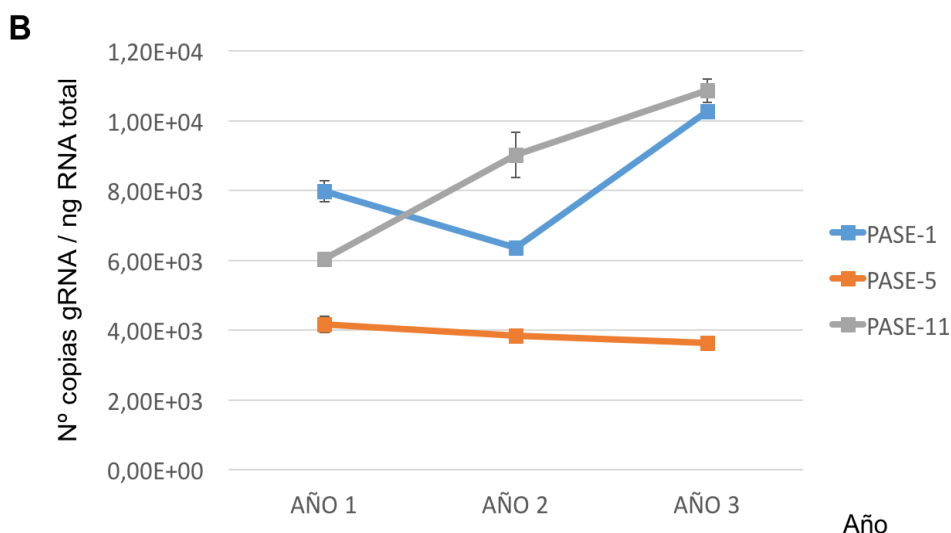


Fig. 22. (Página opuesta). A) Cuantificación absoluta del número de copias de gRNA (X: media) por ng de RNAt, evaluada mediante qRT-PCR, y error estándar (S.E.). B) Cinética de acumulación viral durante los tres años consecutivos del experimento en plantas de *C. Macrophylla* madre. La línea de color azul corresponde a P1G, la naranja a P5FL y la gris a P11G.

Una vez las infecciones eran estables (3-6 mpi) en estas plantas CM iniciales, se evaluó la carga viral durante tres años consecutivos por qRT-PCR, (apartado 3.2.1). La cinética de acumulación de CTV con el tiempo reveló tasas de acumulación bajas en el año 1, oscilando entre 4 y 8×10^3 según el pase, siendo significativamente inferiores para los linajes P5FL y P11G con respecto al parental (*t* Student, *gl* 4, $P < 0.001$). Durante el segundo año la tendencia difirió según el pase, ya que mientras en P1G y P5FL se observó una ligera disminución, las plantas infectadas a partir del P11G aumentaron 1/3 su carga viral durante este período. Las cuantificaciones del tercer año mostraron, en general, la misma tendencia de acumulación para P5FL, quedándose en algo menos de 4×10^3 copias/ng RNAt. Sin embargo, las cargas virales de P1G y P11G fueron significativamente superiores que las estimadas para estas mismas poblaciones durante el año 1 (*t* Student, *gl* 4, $P < 0.001$) (Fig. 22), y ambos linajes se acumularon por igual al final del ensayo.

Estas plantas de CM madre infectadas con cada uno de los pases CTV-NB, se emplearon como reservorio para inocular por injerto cítricos indicadores con los que realizar la caracterización biológica.

3.5.2. Caracterización biológica en cítricos indicadores de las poblaciones virales de CTV-NB evolucionadas en *N. benthamiana*.

Utilizando como material dador de injertos las plantas CM madre P1G, P5FL y P11G del apartado anterior, se inocularon tres huéspedes indicadores sensibles: CM, naranjo dulce (ND) y lima mexicana (LM), en los que el virus se replica, acumula y mueve bien, y dos cítricos parcialmente resistentes: pomelo (POM) y naranjo amargo (AM), en los que CTV se replica y acumula poco (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Gómez-Muñoz *et al.*, 2016). En particular CTV tiene un

movimiento muy limitado a larga distancia en el huésped AM (Folimonova *et al.*, 2008; Gómez-Muñoz *et al.*, 2016).

En estos cítricos inoculados se evaluaron las tasas de infectividad a lo largo de 3 mpi mediante IP-ELISA, se detectó la acumulación y localización de CTV mediante lupa GFP (en los linajes FLG), se observó la inducción de síntomas específicos y su evolución, y cuando fue posible se evaluó la inducción de SP. La evaluación biológica fue compleja debido a diversos problemas técnicos en las cabinas de crecimiento del invernadero P2 (cítricos considerados como OMGs que no pudieron ser crecidos en el invernadero común de cítricos).

Las tasas de infectividad mostraron que, tras el primer mpi, independientemente del pase injertado, el 100% de los huéspedes resistentes (AM y POM) se infectaron sistémicamente (salvo AM de P5FL), mientras que sólo el 38-83% de los sensibles (ND y LM) se infectaron con los injertos de las CM de P1G y P5FL, siendo los valores más inferiores los observados para las plantas de ND. Este fenómeno sólo se observó al comienzo de la infección para el ND, ya que la infectividad aumentó con el tiempo hasta el 100% (al cabo de 1,5-2 mpi) o el 83% en LM en esos mismos periodos de tiempo (Tabla 10). Cabe destacar que el 100% de los cítricos sensibles o resistentes injertados a partir de las CM de P11G se infectaron sistémicamente durante el primer mpi, pese a que las inoculaciones mecánicas iniciales en las CM parentales madre fueron las menos exitosas (25%) de inicio.

El patrón de acumulación de los viriones CTV-NB de todos los linajes, pases o años, determinado por IP-ELISA de improntas de tallos y brotes jóvenes o de peciolas de hojas adultas de todas las plantas de cada lote (Fig. 23), mostró la localización del virus limitada al floema, tal como se había descrito previamente para el pase Parental (Ambrós *et al.*, 2013). Los niveles de detección fueron similares a los de las CM madre infectadas con el aislado de origen (Fig. 23, panel de control). En general, los niveles de expresión de CTV-NB en cítricos fueron similares a lo largo de los tres años, aunque con algunas diferencias. Mientras los niveles de acumulación de P1G resultaron muy parecidos a los de las plantas Parental y T36 salvaje (Fig. 23) a lo largo del tiempo, las del P5FL no variaron mucho con el tiempo y fueron menores. En cambio, y en concordancia con los resultados observados por qRT-PCR, el pase

P11G se acumuló ligeramente peor que los pases anteriores durante el primer año de infección (improntas realizadas a los 1-2 mpi), aunque dos años más tarde sus niveles eran superiores. Estos resultados sugieren que conforme el virus evoluciona y se adapta al nuevo huésped *N. benthamiana*, ve algo limitada su infección de regreso a cítricos, y se acumula peor en las fases iniciales en comparación con el virus control no evolucionado, como se observa para P11G durante el primer año. Por el contrario, la re-adaptación de las poblaciones virales a su huésped natural, permitiría su estabilización a lo largo del tiempo en cítricos, alcanzando niveles de acumulación similares a los de origen.

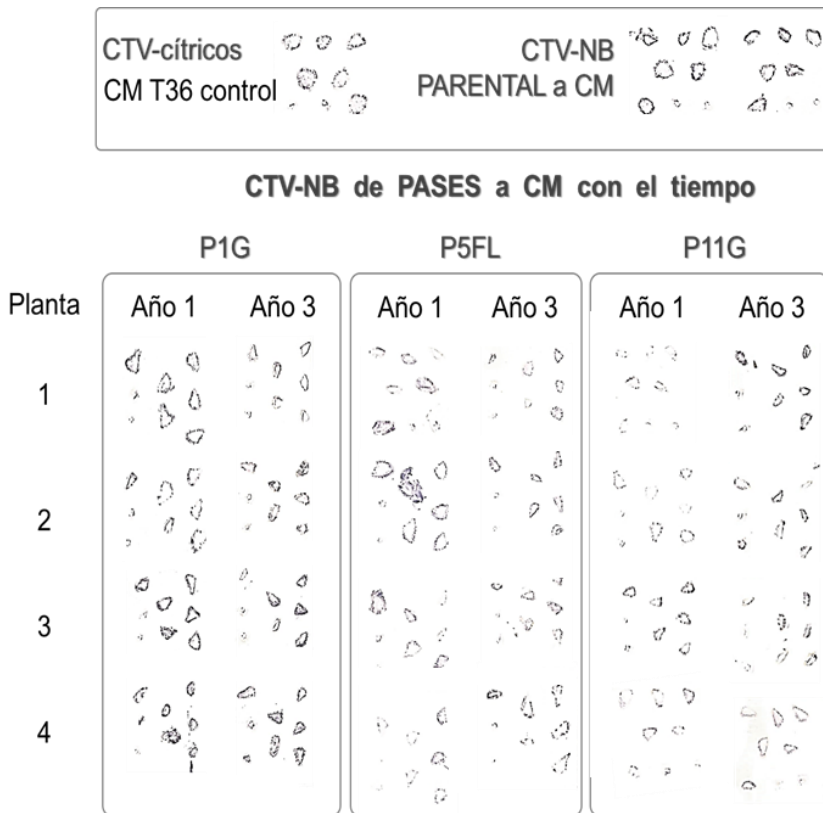


Fig. 23. IP-ELISA de tallos y peciolas de todas las plantas de cada lote de *C. macrophylla* (CM) madre infectadas sistémicamente con CTV-NB P1G, P5FL y P11G en comparación con las infectadas con CTV-NB parental y con el aislado de cítricos T36 salvaje. Se comparan los años 1 y 3 de cada pase. Las improntas correspondientes a cada planta (unas 7-8) se encuentran separadas por lotes.

Las plantas de LM inoculadas por injerto a partir de las CM madre de los virus CTV-NB, mostraron niveles de acumulación mucho más inferiores para P5FL y P11G que el de P1G, y la de éste fue ligeramente inferior al parental (Fig. 24).

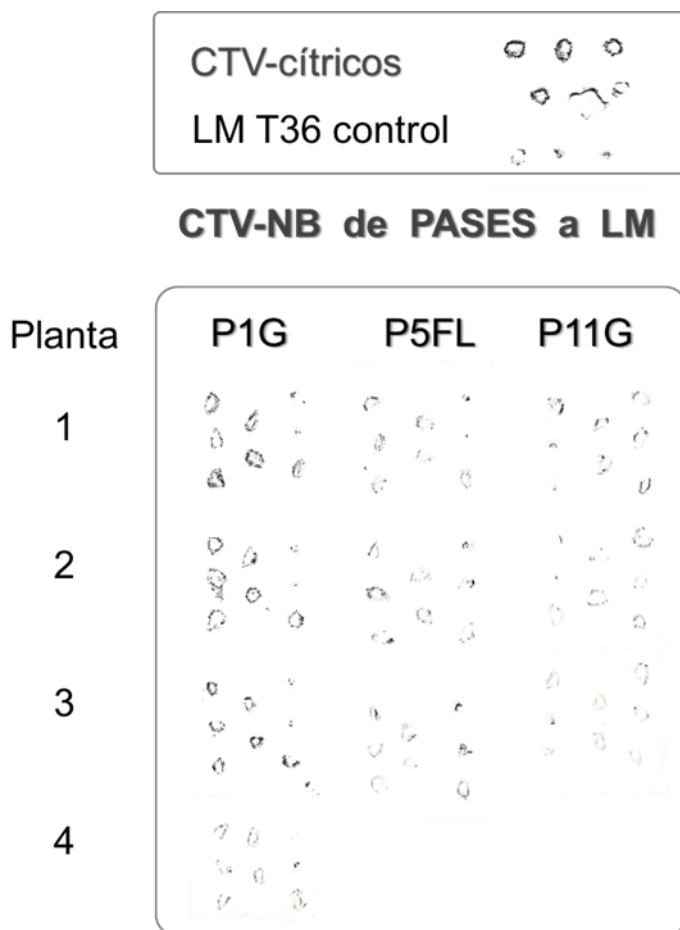


Fig. 24. IP-ELISA de tallos y peciolo de las plantas de cada lote de lima mexicana (LM) infectadas sistémicamente con viriones CTV-NB P1G, P5FL y P11G (Año 1) en comparación con plantas CM infectadas con el aislado de cítricos T36 salvaje. Resto como Fig. 23.

La expresión/localización del virus visualizada con lupa GFP (cortes de tallos y peciolo de material infectado con los pases del linaje FLG durante años consecutivos) también mostró la infección

limitada exclusivamente al floema en todos los huéspedes. En las plantas CM madre de P1G se observó mayor expresión de GFP en el floema de brotes jóvenes y en la corteza de tallos durante los años analizados, similar al aislado CTV-NB parental (Ambrós *et al.*, 2013). Sin embargo, en las infectadas con P11G se observó menor acumulación en los primeros dos años (Fig. 25) (especialmente el primero), que se podía correlacionar con la reducida infectividad (25%) observada en estas CM durante el primer mpi (Tabla 10).

En las plantas de CM infectadas por injerto a partir de las CM madre, se observó un resultado similar. La expresión comparada de P1G y P11G en los diferentes huéspedes indicadores, en los que las tasas de infectividad fueron elevadas (ver Tabla 10), mostró que P1G se acumulaba mejor en los cítricos sensibles CM y LM que P11G, mientras que las diferencias observadas en los huéspedes parcialmente resistentes eran mucho menores (Fig. 25). Se detectó una acumulación especialmente baja en el huésped ND de todos los virus CTV-NB (analizados en este trabajo) procedentes de la inoculación por injerto. A pesar de las tasas de infectividad elevadas obtenidas para este huésped (Tabla 10), los niveles de expresión de GFP recuerdan al comportamiento de CTV en un huésped resistente como AM o POM, en el que el virus se encuentra localizado en pequeños acúmulos dispersos a lo largo de la corteza o el tallo con un movimiento poco eficiente.

Finalmente, con el panel de cítricos indicadores de estos bioensayos, se analizó la capacidad de los virus evolucionados de P1G, P5FL y P11G para inducir los síntomas característicos del aislado T36 wt. Estos síntomas incluyen: clorosis nervial “vein clearing” (VC) en LM y CM, acopamiento de las hojas “leaf cupping” (LC) en LM, CM, POM y AM, y enanismo y amarilleo en plantas de semilla de AM y POM. T36 es un aislado inductor típico del síndrome de SY asociado a su diagnóstico en invernadero, éste implica una clorosis generalizada en las nuevas brotaciones unido a una detención del crecimiento. CTV-T36 sólo induce ocasionalmente acanaladuras suaves en la madera (SP) de CM, ND y AM, aunque no es un aislado típico de SP como lo es T318A (y no induce SP en POM).

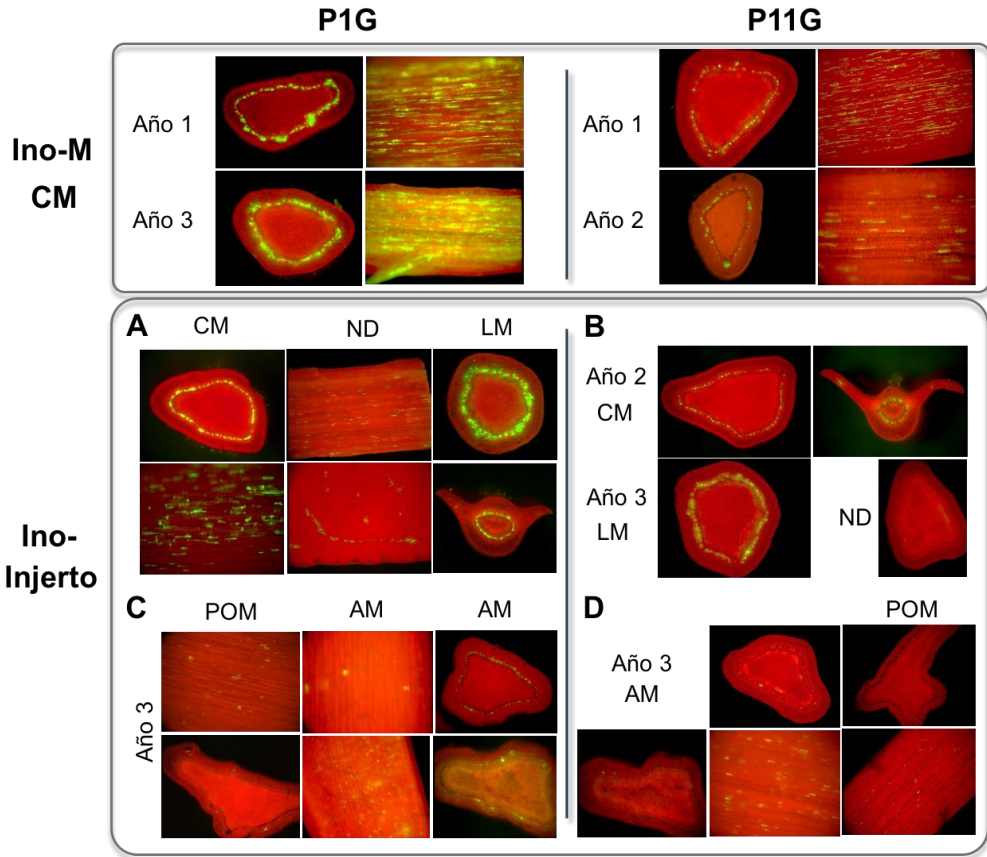


Fig. 25. Expresión y localización celular de los virus CTV-NB P1G y P11G en cortes transversales de tallos y peciolo de CM (*C. macrophylla*), ND (naranja dulce), LM (lima mexicana) y POM (pomelo) visualizados con lupa GFP. En el panel superior se comparan las plantas de CM madre inoculadas mecánicamente con viriones de los países procedentes de *N. benthamiana*, mientras que en el inferior se comparan los cítricos injertados con material infectado procedente de las CM madre. A) Comparativa de expresión de P1G en CM, ND y LM en el primer año, frente a la de P11G en el segundo y tercer año en los mismos huéspedes (B). C) Patrón de expresión de P1G en los huéspedes parcialmente resistentes POM y AM en los años 2 y 3 comparado con el de P11G del año 3 en los mismos huéspedes (D).

AM T36 wt vs control Detalle SY



CTV-NB AM

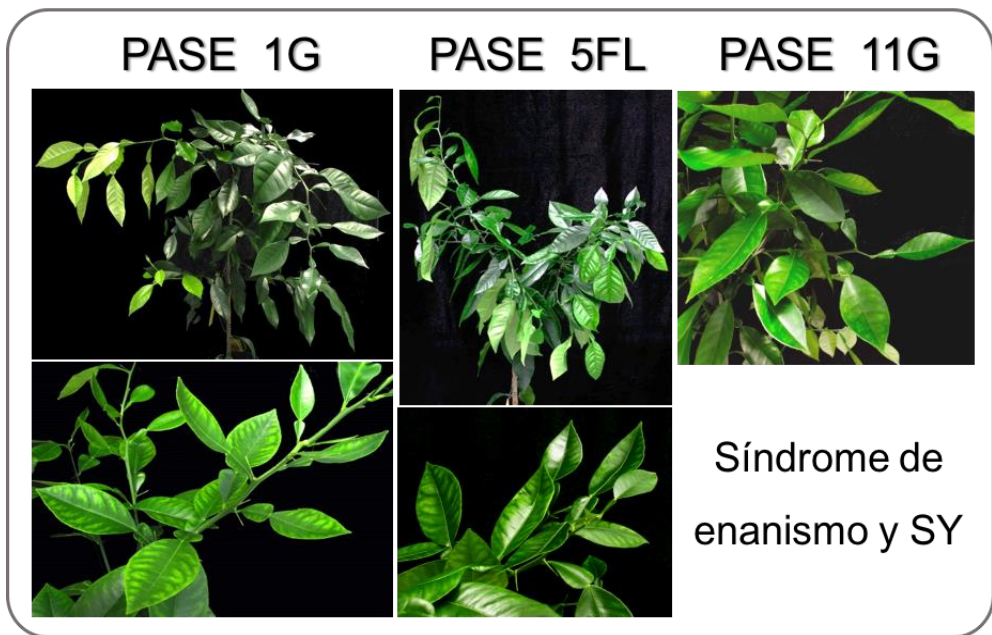


Fig. 26. Síntomas característicos inducidos en plantas de naranjo amargo (AM) indicadoras injertadas con material infectado de los pases CTV-NB P1G, P5FL y P11G. SY: *seedling yellows*. T36 wt: aislado T36 original de cítricos; control: planta sana.

POM T36 wt vs control



CTV-NB POM

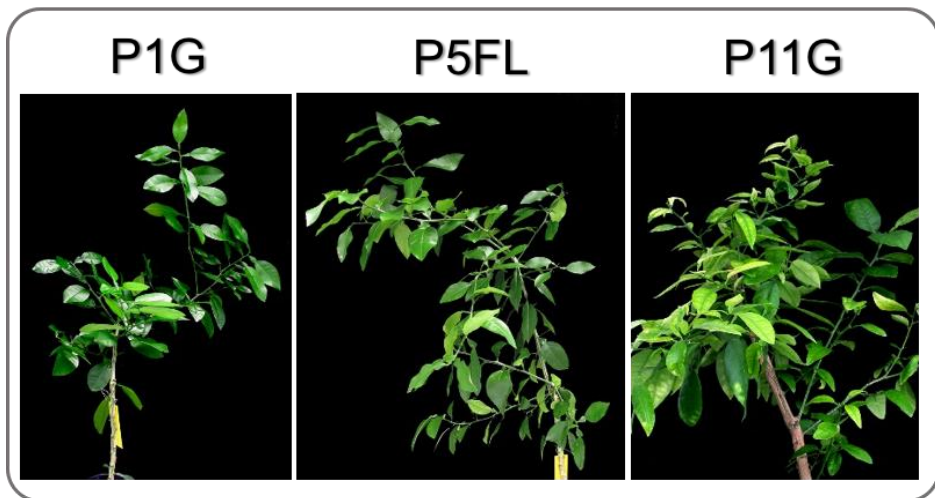


Fig. 27. Enanismo y SY (*seedling yellows*) inducidos en plantas de pomelo (POM) injertadas con material infectado de los pases CTV-NB P1G, P5FL y P11G. T36 wt: aislado T36 original de cítricos; control: planta sana.

Así pues, en las plantas de AM infectadas con los diferentes pases se pudo observar el síndrome de SY y una detención del crecimiento (enanismo), independientemente del pase evaluado (Fig. 26), si bien las plantas infectadas con P1G y P5FL se vieron más afectadas por SY, LC y enanismo fuerte, presentando una altura media de 83 cm y 70 cm respectivamente (valor tomado a los 5 mpi), en comparación con el control sano (105 cm) o el infectado con el aislado ancestral T36 wt (87 cm). Por el contrario, el valor medio de altura observado para las plantas infectadas por el P11G fue de 91 cm.

Con respecto a las plantas de POM injertadas del mismo modo, también se manifestaron los síntomas de SY independientemente del pase utilizado (Fig. 27), aunque éstos fueron más moderados, y de nuevo los síntomas de enanismo fueron más intensos en las plantas infectadas los P1G y P5FL (cuyos valores de crecimiento medio fueron de 70 y 80 cm respectivamente, frente a 82 cm del control positivo, 101 cm del negativo y 91 cm de los POM inoculados con P11G).

Por último, también se observó aclaramiento de venas (“vein clearing”) en algunas plantas de LM y CM injertadas con P5FL y en una gran parte de las inoculadas con P11G (Fig. 28).

Con respecto a los datos de evaluación del SP, aunque éstos fueron relativos a los observados sólo en las plantas de CM injertadas, resultaron de leves a moderados en las plantas injertadas con P1G, y suaves en el resto.

En resumen, los virus evolucionados en *N. benthamiana* infectan e inducen, en líneas generales, la mayoría de los síntomas característicos del aislado T36 ancestral de cítricos de regreso al huésped de origen.

CTV-NB LM

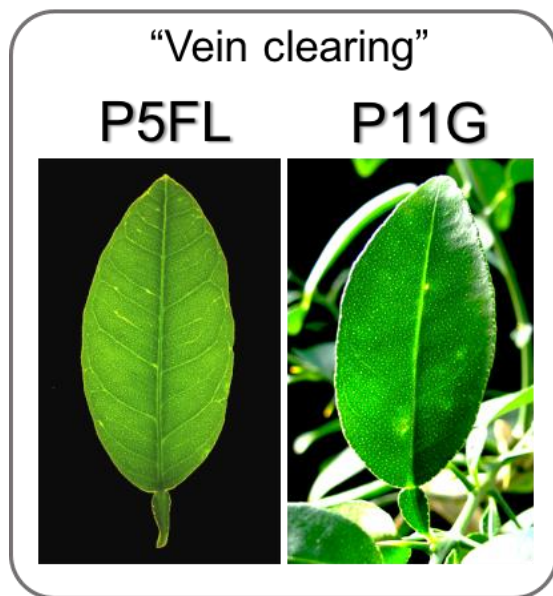


Fig. 28. Detalle de hojas de plantas de lima mexicana (LM) injertadas con material infectado de los pases CTV-NB P5FL y P11G mostrando aclaramiento de nerviaduras (“vein clearing”).

Sin embargo, en los bioensayos y análisis realizados se han detectado algunas diferencias biológicas en la intensidad, tiempo de aparición de los síntomas y acumulación viral con respecto al aislado original:

- i) se ha observado una disminución de las tasas de infectividad iniciales (comparadas al primer mpi) al inocular mecánicamente viriones purificados de los pases CTV-NB a las plantas madre de CM, cuánto mayor era el pase, menor fue la tasa observada (ver Tabla 10), aunque ésta aumentaba hasta valores eficaces en brotaciones posteriores
- ii) se han detectado tasas de infectividad también especialmente bajas de todos los virus CTV-NB procedentes de la inoculación por injerto en el huésped ND (tras 1 mpi),

- aunque éstas se restablecieron poco después, y por su parte, la acumulación viral observada en tejidos infectados por P1G y P11G (detectada con lupa GFP) fue más baja que la observada para el control de T36 wt
- iii) en general, el P5FL, que es en el que detectamos molecularmente la mayor cantidad de cambios nucleotídicos en la región de la poliproteína (ver apartado anterior), resultó ser el menos eficiente infectando por injerto los huéspedes CM, LM y AM (Tabla 10) y se acumuló peor en todo el periodo analizado (datos de qRT-PCR e IP-ELISA)
 - iv) por su parte el P11G mostró un cambio importante en las tasas de infectividad observadas en diversos cítricos tras el primer mpi (Tabla 10), alcanzando, sin embargo, los valores mejores de infectividad en todos los huéspedes con el tiempo, y sus valores de acumulación viral también fueron en aumento con los años de infección de regreso a cítricos (datos de qRT-PCR e IP-ELISA)
 - v) es importante destacar que los pases menos evolucionados (especialmente P1G y luego P5FL) mostraron una inducción de síntomas similar a la del virus salvaje tanto en AM como en POM, en los que se observó el síndrome de SY y enanismo con similar intensidad, especialmente en el huésped AM, mientras que el P11G, el más evolucionado en *N. benthamiana* (y con mayor número de cambios en su secuencia consenso), pareció inducir unos síntomas más suaves que los anteriores y que el aislado control T36 wt.

Estos resultados podrían sugerir que la adaptación al huésped *N. benthamiana*, en el que el virus aumentó sus eficiencias netas de infección y acumulación, conlleven la selección de poblaciones virales bien adaptadas a esta especie pero que difieren en su eficacia al infectar de nuevo cítricos, bien en los estadios iniciales en su interacción con determinados huéspedes, en su capacidad de replicarse y moverse eficazmente o en la inducción de síntomas específicos (tipo e intensidad), como consecuencia de un coste de adaptación relacionada con las diana de interacción virus-huésped. De ser así, es tentativo especular que algunos de los cambios de secuencia detectados en las secuencias consenso de las poblaciones evolucionadas de CTV-NB podrían alterar las

posteriores interacciones virus-cítricos. En este caso, dado que dichas poblaciones de variantes serían las más eficaces en *N. benthamiana* pero no en cítricos, cabría esperar que los virus CTV-NB pasados de nuevo al huésped original pudieran acumular cambios mutacionales para regresar a secuencias adaptadas de nuevo a cítricos.

Con este objetivo, en el apartado siguiente analizamos la historia evolutiva a nivel molecular de estas poblaciones de regreso a cítricos.

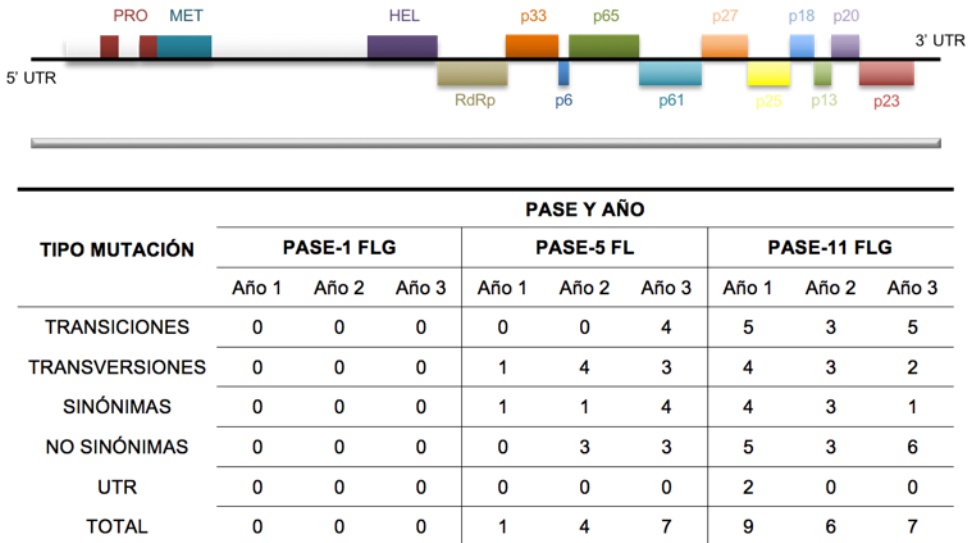
3.5.3. Regreso de los virus evolucionados CTV-NB de los pases 1, 5 y 11 al huésped natural de cítricos: reversión a la secuencia original de T36.

Las poblaciones de CTV de los cítricos inoculados mecánicamente con los viriones evolucionados CTV-NB de los pases P1G, P5FL y P11G, se analizaron mediante secuenciación del genoma completo (secuencia consenso) durante los tres años posteriores a su inoculación.

La secuencia consenso del P1G, que era idéntica al ancestro, permaneció inalterada a lo largo de los tres años analizados en cítricos. En cambio, la secuencia consenso de P5FL de regreso a cítricos, denominada P5FL-Cit, reveló la pérdida progresiva de mutaciones a lo largo del tiempo. De los 12 cambios fijados en la secuencia consenso de P5FL en *N. benthamiana*, al cabo de un año en cítricos se perdió una de las mutaciones localizadas en la poliproteína (C282A). Durante el segundo año, otras cuatro mutaciones presentes en este gen revertieron a la secuencia salvaje, la mayoría de ellas situadas en la región más próxima al extremo 5' (posiciones 1129, 1226, 1227 y 2478), mientras que en el tercer año todas las mutaciones fijadas en la evolución de CTV-NB habían desaparecido, quedando una secuencia consenso P5FL-Cit idéntica a la de T36 salvaje (Tabla 11, 12 y Fig. 29). Un resultado similar se observó con la secuencia consenso de P11G-Cit, en la que de las 18 mutaciones fijadas en *N. benthamiana*, se pasó a 13 durante el primer año en cítricos, siendo dos de ellas mutaciones *de novo* en las posiciones genómicas 18395 y 18418 (sustituciones sinónimas en el gen *p23*). Hay que destacar que las primeras mutaciones perdidas en la población de P11G-Cit durante el primer

año de regreso a cítricos, fueron las que afectaban a los extremos 5' y 3'-UTR del genoma viral, a la RdRp y al gen *p18*. Pese a que no observamos que dichas mutaciones afectaran teóricamente dominios funcionales conservados, tanto los extremos del genoma de CTV como la polimerasa son elementos claves que regulan la eficiencia de la replicación viral. Por otra parte, se ha demostrado que *p18* puede tener una función clave en la infección exitosa de determinadas especies cítricas (Tatineni *et al.*, 2011). Adicionalmente a las mutaciones indicadas, durante el primer año también se perdieron otras 3 localizadas en la poliproteína (G726A, A3577G y T6115A). Tras el segundo año sólo se detectaron 7 de las mutaciones del P11G original, perdiéndose 2 de la poliproteína (posiciones 3577 y 4752) y 4 de *p23* (las dos aparecidas *de novo* y las de las posiciones 18976 y 18997) y, como en el caso de P5FL, durante el tercer año la secuencia consenso había revertido por completo a la secuencia del aislado T36 ancestral de cítricos (Tabla 11, 12 y Fig. 29).

Tabla 11. Mutaciones que aparecen o desaparecen en cada pase y linaje a lo largo de tres años durante la evolución de CTV-NB de regreso a cítricos. En la parte superior de la tabla se representa el esquema del genoma de CTV con una línea gris que indica las regiones secuenciadas.



Capítulo IV

Si se compara la tasa de reversión de mutaciones en la evolución de estas poblaciones de regreso a cítricos, se observa que la dinámica de reversión es diferente según el virus CTV-NB evolucionado: al principio es más rápida para el pase más evolucionado y con más cambios (P11G) que para el menos evolucionado (P5FL), después, ambas poblaciones pierden un gran número de mutaciones durante el segundo año (especialmente P5FL), y menos en el último año.

Tabla 12. Tipo de sustituciones detectadas en los pases CTV-NB P5FL y P11FLG de regreso a cítricos a lo largo de los tres años analizados. Resto como Tabla 7.

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
SECUENCIA CONSENSO CTV-NB de <i>N. benthamiana</i>					
5	282	Poliproteína	C → A		
5	1129	Poliproteína	G → C	R → P	
5	1226	Poliproteína	G → C		
5	1227	Poliproteína	T → G	Y → D	
5	1553	Poliproteína	T → C		
5	1574	Poliproteína	C → T		
5	1641	Poliproteína	G → T	V → F	
5	1653	Poliproteína	A → T	N → Y	
5	2477	Poliproteína	G → T	E → D	
5	2478	Poliproteína	C → A	R → S	
5	3737	Poliproteína	G → A		
5	3854	Poliproteína	T → C		
11G	106	5'-UTR	C → T		
11G	726	Poliproteína	G → A	E → K	
11G	3577	Poliproteína	A → G	E → G	MET
11G	4356	Poliproteína	T → G	F → V	
11G	4752	Poliproteína	T → G	L → V	
11G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
11G	6115	Poliproteína	T → A	M → K	
11G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
11G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
11G	10537	RdRp	A → G	K → E	
11G	16945	p18	G → A	A → T	
11G	18740	p23	C → T	S → F	
11G	18838	p23	C → T	R → C	
11G	18953	p23	C → A	T → N	
11G	18976	p23	C → T		
11G	18997	p23	C → T	L → F	
11G	19017	p23	C → T		

PASE	POSICIÓN	GEN/REGIÓN	MUTACIÓN	AMINOÁCIDO	DOMINIO
11G	19151	3'-UTR	G → A		
SECUENCIA CONSENSO CTV-NB-Cit AÑO 1					
5	1129	Poliproteína	G → C	R → P	
5	1226	Poliproteína	G → C		
5	1227	Poliproteína	T → G	Y → D	
5	1553	Poliproteína	T → C		
5	1574	Poliproteína	C → T		
5	1641	Poliproteína	G → T	V → F	
5	1653	Poliproteína	A → T	N → Y	
5	2477	Poliproteína	G → T	E → D	
5	2478	Poliproteína	C → A	R → S	
5	3737	Poliproteína	G → A		
5	3854	Poliproteína	T → C		
11G	3577	Poliproteína	A → G	E → G	MET
11G	4356	Poliproteína	T → G	F → V	
11G	4752	Poliproteína	T → G	L → V	
11G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
11G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
11G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
11G	18395	p23	A → T		
11G	18418	p23	G → T		
11G	18740	p23	C → T	S → F	
11G	18838	p23	C → T	R → C	
11G	18976	p23	C → T		
11G	18997	p23	C → T	L → F	
11G	19017	p23	C → T		
SECUENCIA CONSENSO CTV-NB-Cit AÑO 2					
5	1553	Poliproteína	T → C		
5	1574	Poliproteína	C → T		
5	1641	Poliproteína	G → T	V → F	
5	1653	Poliproteína	A → T	N → Y	
5	2477	Poliproteína	G → T	E → D	
5	3737	Poliproteína	G → A		
5	3854	Poliproteína	T → C		
11G	4356	Poliproteína	T → G	F → V	
11G	4771	Poliproteína	C → G	P → R	
11G	6222	Poliproteína	C → T	L → F	
11G	6244	Poliproteína	C → T	S → F	
11G	18740	p23	C → T	S → F	
11G	18838	p23	C → T	R → C	
11G	19017	p23	C → T		
SECUENCIA CONSENSO CTV-NB-Cit AÑO 3					
No hay cambios respecto a la secuencia de T36 salvaje					

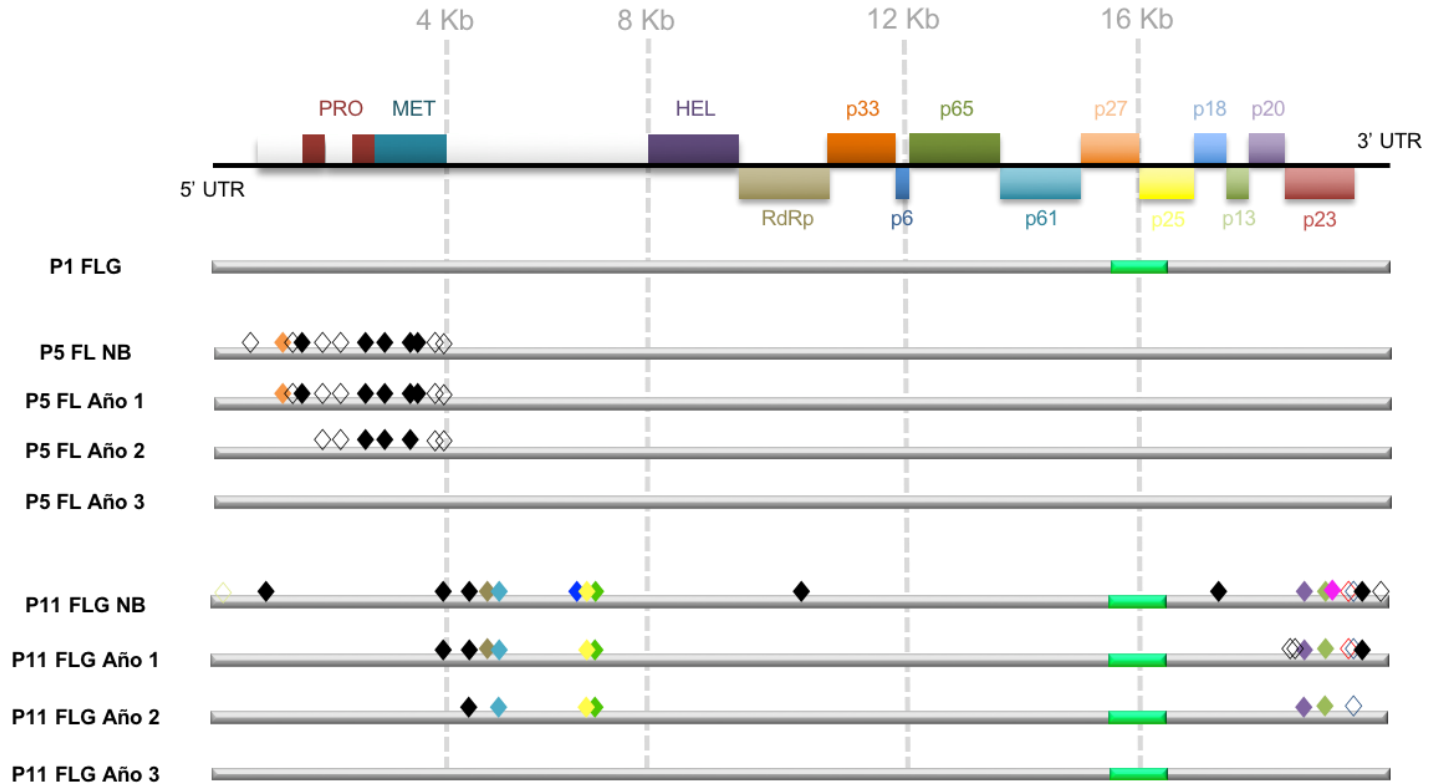


Fig. 29. Distribución de las mutaciones encontradas en la secuencia consenso de los virus CTV-NB de los pases P1G, P5FL y P11G a lo largo de los tres años posteriores a su regreso a *C. macrophylla*. NB: *N. benthamiana*. Resto como Fig. 14.

En la región de p23, los valores de las tasas de sustituciones sinónimas ($d_S=0.0098\pm 0.0056$) y no-sinónimas ($d_N=0.0027\pm 0.0013$), estimadas como en el apartado anterior, fueron menores que las obtenidas para las poblaciones de CTV-NB. De igual modo, la diversidad nucleotídica media también fue menor (0.0041 ± 0.0015).

El análisis de selección por codón realizado en las mismas condiciones que para las poblaciones de CTV-NB, mostró los mismos cuatro codones de p23 (112, 126, 196 y 209 de la secuencia comparada) sometidos significativamente a selección negativa (P-value=1).

Las frecuencias de sustitución nucleotídica observadas para p23 a lo largo de la evolución experimental, incluyendo tanto las secuencias de este gen de todos los países en *N. benthamiana* como las de los países P1G, P5FL y P11G-Cit evolucionadas durante los tres años en cítricos, revelan la clara predominancia en las Ts de tipo C→T (52.32%), seguidas de las de tipo T→C (39.78%) y, finalmente, las de tipo G→A y A→G (Tabla 13).

Utilizando todas las secuencias mencionadas, los valores estimados de d_S (0.0113 ± 0.0063) y d_N (0.0036 ± 0.0015) arrojaron una diferencia muy similar.

Tabla 13. Matriz de sustitución nucleotídica de p23 para los linajes CTV-NB evolucionados en *C. macrophylla* durante tres años. Resto como Tabla 8.

	A	T	C	G
A	-	0.22	0.17	2.87
T	0.26	-	39.78	0.22
C	0.26	52.32	-	0.22
G	3.3	0.22	0.17	-

Por otra parte, el análisis filogenético de todas las secuencias de p23 evolucionadas en ambos huéspedes, junto con sus respectivos parentales y la de T36 salvaje, se llevó a cabo como en el apartado anterior. Se observa como P5FL-Cit evolucionado en cítricos (P5FL-Citx, donde la x representa el número de año analizado) está emparentado directamente con la secuencia salvaje de p23 y con los países P1, P2 y P5 de CTV-NB, debido a la

ausencia de cambios en este gen. P1G-Cit es idéntica a las secuencias de *p23* de los pases P1G a P5G de *N. benthamiana*, y la secuencia parental. Por último, P11G-Cit1 está ligeramente más evolucionada que P11G de *N. benthamiana* probablemente debido a la aparición de las dos mutaciones *de novo* comentadas en el apartado anterior. La pérdida de mutaciones durante el año 2 muestra como P11G-Cit2 se emparenta con las secuencias consenso de P6G y P7G de CTV-NB en un cluster relativamente cercano al de CTV-NB P11G, mientras que la pérdida total de cambios en P11G-Cit3 la agrupa con la secuencia parental y los pases P1G a P5G y P1G-Cit (Fig. 30). La filogenia muestra la disposición entrecruzada de las secuencias de CTV-NB y cítricos a lo largo de la evolución experimental en ambos huéspedes, reflejando los eventos de convergencia evolutiva para ambos linajes y la presencia de secuencias intermedias en la transición evolutiva entre ellas en ambos tipos de huésped.

El análisis filogenético de estas poblaciones junto con las secuencias clonadas de los pases CTV-NB P9G y P11G muestra como P1G-Cit y P11G-Cit3, ambas sin cambios, agrupadas con las 11 secuencias individuales de P9G y las tres de P11G idénticas al ancestro, así como con las de los pases P1G a P5G. En cuanto a P11G-Cit2, queda agrupada con las secuencias 1, 12 y 20 detectadas en CTV-NB P11G, además de las de P6G y P7G, y alejada a su vez del cluster anterior. Por último, P11G-Cit1 forma un cluster independiente cercano a los que forman, por un lado, las secuencias 10 y 22, y por otro las 6, 14 y 21 de la población CTV-NB P11G, compuesto por las secuencias más evolucionadas respecto a la ancestral de *p23* (Fig. 31).

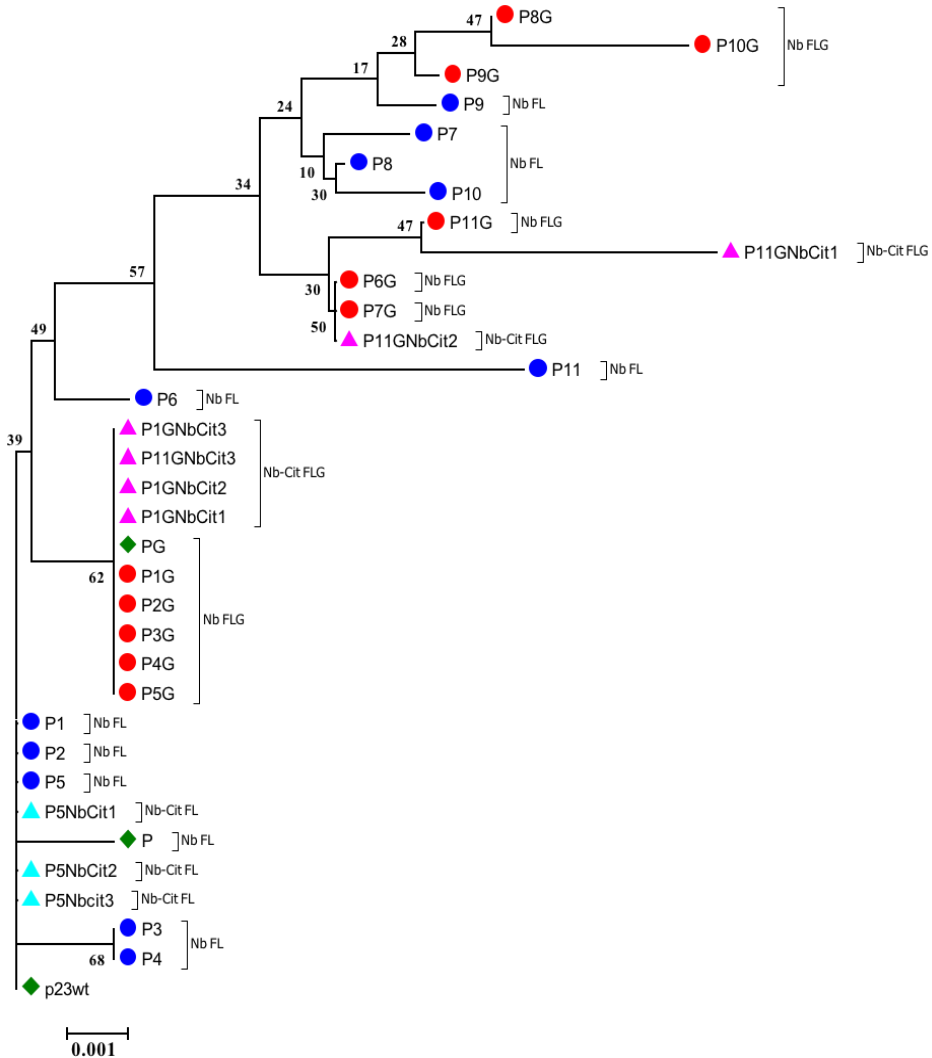


Fig. 30. Árbol filogenético enraizado con la secuencia ancestral de p23 (p23 wt en rombo de color verde) utilizando las secuencias de todos los países y ambos linajes, tanto de *N. benthamiana* (CTV-NB) como de regreso a cítricos. Obtenido con el método de Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap. Las secuencias consenso del linaje FL aparecen con círculos azules y las del linaje FLG en círculos rojos; las secuencias parentales de ambos linajes se representan con rombos verdes, mientras que los triángulos rosa y azules representan los países P1G, P11G y P5FL evolucionados en *C. macrophylla*, respectivamente, indicando el número de año analizado al final del nombre. Resto como en apartado anterior.

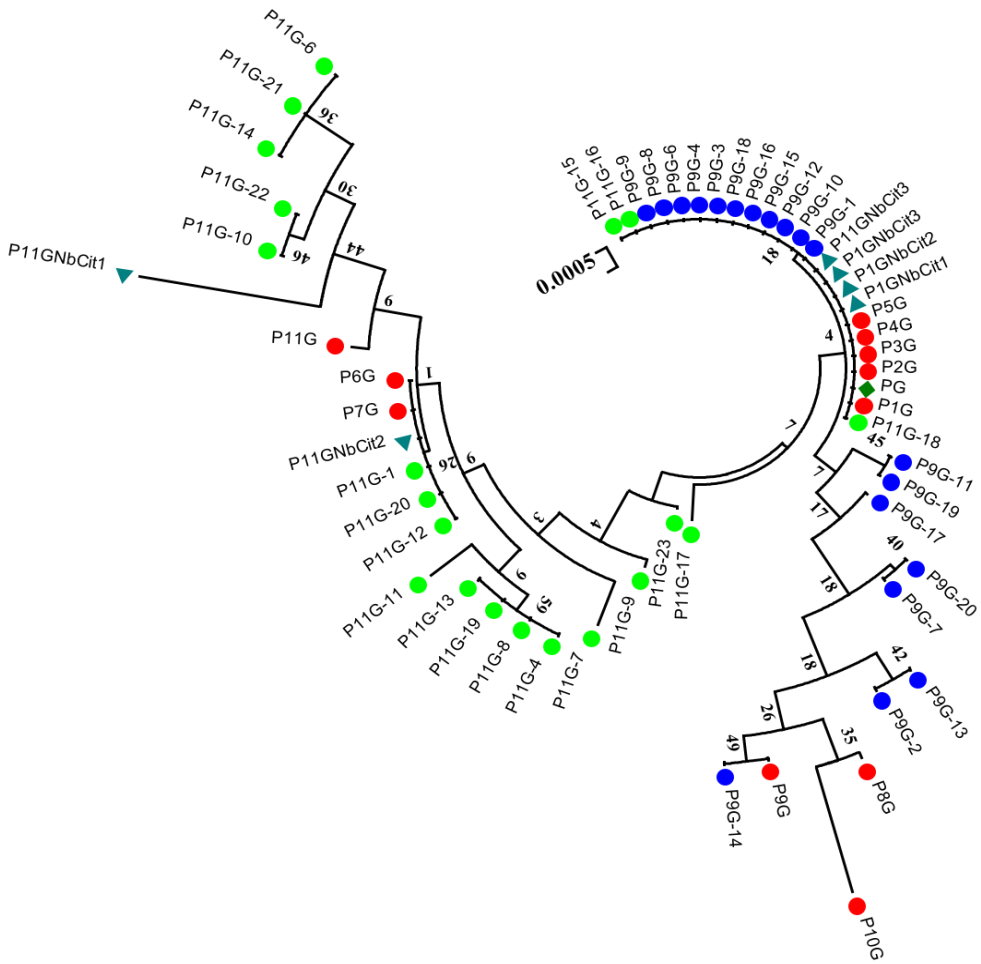


Fig. 31. Árbol filogenético enraizado con la secuencia parental (PG) (con un rombo verde) obtenido con las secuencias del gen *p23* de los pases correspondientes al linaje FLG (en color rojo) y secuencias individuales clonadas de P9G (en color azul) y P11G (en color verde), además de los pases P1G y P11G evolucionados en cítricos (triángulos verdes). Obtenido con el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

Todas las secuencia de *p23* obtenidas en este experimento de evolución fueron sometidas a diversos análisis para determinar la presencia potencial de co-variaciones utilizando diversos programas y servidores como el CAPS server (Fares y Travers, 2006; Fares y

McNally, 2006), aunque ninguno arrojó un resultado claro. Lo mismo se realizó utilizando las secuencias de la poliproteína.

En cuanto a la poliproteína, al igual que ocurría con las poblaciones de CTV-NB, los valores medios de diversidad nucleotídica estimados para esta región también en las poblaciones de CTV-Cit, fueron bajos y muy similares ($\pi=0.0007\pm 0.0003$). Algo similar ocurrió con las estimas de sustituciones sinónimas ($d_S=0.0011\pm 0.0007$) y no-sinónimas ($d_N=0.0006\pm 0.0003$), si bien en este caso la $d_N < d_S$ arrojó una diferencia $d_N - d_S$ negativa. El test de selección basado en HYPHY confirmó de nuevo los codones 112 y 229 bajo la acción de selección negativa.

Finalmente, se utilizaron todas las secuencias completas de CTV evolucionadas en ambos huéspedes, junto a los parentales, para estimar la diferencia de las tasas d_N y d_S , que fueron muy bajas y cercanas a 0 (-0.0004 ± 0.0003), así como los valores medios de diversidad nucleotídica poblacional (0.0005 ± 0.0001), también muy bajos y prácticamente procedente de la variación intrapoblacional (NB vs Cit).

La reconstrucción de la filogenia de todas estas secuencias demostraba la historia evolutiva de las mismas, donde se agrupaban, por un lado, las secuencias del linaje FL que no sufrieron mutaciones a lo largo de su evolución (P1 y P4), o que ya las habían perdido (P5FL-Cit3), junto a la secuencia de T36 wt. Las secuencias de los años 1 y 2 de P5FL-Cit (Fig. 32) forman junto a P5 un grupo separado, dada la conservación de un número de mutaciones importante en la región de la poliproteína. El linaje FLG forma una agrupación segregada, por un lado con la población de secuencias P1G, P4G, P11G-Cit3 y el linaje ancestral de T36G, que son idénticas, y un cluster, que es el más evolucionado y que compila las secuencias P11G-Cit2, P11G-Cit1 y P11G (Fig. 32). El árbol refleja muy bien la evolución del virus a lo largo de su tránsito por dos huéspedes distintos en función de los pases (CTV-NB) y del tiempo (CTV-Cit), así como sus convergencias evolutivas. Las secuencias con mayor número de cambios, correspondientes a los pases más avanzados de CTV-NB o de los primeros años de regreso a cítricos, quedan más alejadas de la salvaje, y viceversa, reflejándose en las distintas ramas las secuencias intermedias de transición entre dichas etapas evolutivas.

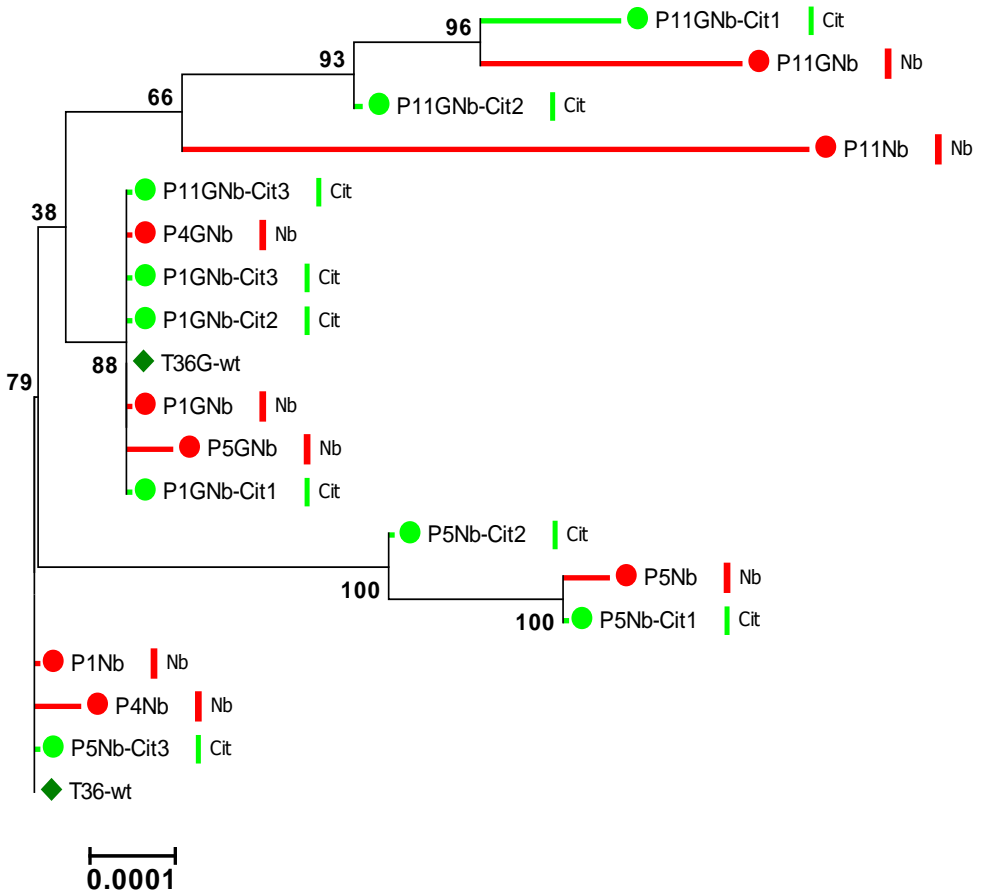


Fig. 32. Árbol filogenético enraizado con la secuencia parental de T36 wt de las secuencias completas de CTV de todos los países y linajes evolucionados en *N. benthamiana* (marcados con círculos rojos) como en cítricos (marcados con círculos verdes). Las secuencias ancestrales se representan con rombos de color verde oscuro. Árbol obtenido con el método de Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap. Resto como en apartado anterior.

4. DISCUSIÓN

La adaptación de los virus a nuevos huéspedes es un hecho importante para que su supervivencia sea un éxito, y un aspecto estudiado durante mucho tiempo en gran variedad de especies de este tipo de patógenos. En términos ecológicos, el éxito de la supervivencia de los virus depende en gran medida de la variabilidad de sus poblaciones, de modo que éstas pueden ir adaptándose a los cambios que se producen en el ambiente hasta alcanzar su pico de eficacia (Kassen, 2002). En este contexto se encuentran los virus especialistas y los generalistas. Los primeros tienen una alta eficacia biológica en su huésped natural a costa de reducir su capacidad de competición interespecífica (Futuyma y Moreno, 1988; Woolhouse *et al.*, 2001; Bedhomme *et al.*, 2015) o de supervivencia en otros huéspedes (coste adaptativo de huésped). Por el contrario, los generalistas mantienen una eficacia similar en todos los huéspedes que infectan, aunque ello suele conllevar un coste asociado a la poca capacidad de poder aprovechar de forma óptima los recursos de un huésped determinado (Whitlock, 1996; Bedhomme *et al.*, 2015). Por este motivo, hay pocos casos descritos de virus generalistas, ya que la evolución tiende a favorecer estrategias especialistas (Woolhouse *et al.*, 2001). En este sentido, es importante destacar que dentro de los virus de plantas, CTV es un virus extremadamente especialista con un rango de huéspedes muy restringido, ya que sólo infecta a plantas de la familia *Rutaceae*, dentro de la cual se ha detectado en la mayor parte de las especies y variedades de los géneros *Citrus* y *Fortunella*, y en algunas otras especies de géneros afines (Bar-Joseph y Lee, 1989; Bar-Joseph *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 2008). Y además, dentro de los cítricos que infecta, CTV sólo es capaz de replicarse en un nicho celular específico, limitado a determinadas células asociadas al floema.

Sin embargo, la historia evolutiva de CTV parece reflejar que la adquisición de nuevos genes como p33, p18 y p13 le habría permitido ampliar su rango de huéspedes en cítricos (Tatineni *et al.*, 2011). A pesar de ello, las infecciones de CTV nunca se habían descrito, ni conseguido experimentalmente, en plantas herbáceas antes de los trabajos de nuestro grupo desarrollando el sistema genético basado en clones agroinfecciosos de T36 e infecciones sistémicas en *N. benthamiana* (Ambrós *et al.*, 2011, 2013).

Son muchos los trabajos previos que han analizado los procesos de transmisión de CTV, mediante injerto y pulgones, en diversas variedades de cítricos (susceptibles y resistentes) y cómo estos alteran la estructura de las poblaciones del virus, la diversidad genética de sus aislados y sus características patogénicas (Sambade *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2015; Harper *et al.*, 2016; Killiny *et al.*, 2016; tesis P. Moya, 2010). De igual modo, se han descrito cuales son los principales factores que modulan la evolución de CTV en cítricos y el efecto importante de éstos en la diversificación de las poblaciones virales, cambio en las características patogénicas y de transmisión (ya sea por pulgón o por injerto) de diferentes aislados virales (Guerri *et al.*, 1991; Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Mawassi *et al.*, 1995, 1996, 2000; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999; Vives *et al.*, 1999, 2005; Rubio *et al.*, 2001, 2013; Che *et al.*, 2002, 2003; Sambade *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2009).

Sin embargo, hasta el momento de esta tesis sólo se había realizado un estudio amplio de evolución experimental de CTV mediante pases seriados en cítricos (P. Moya, tesis doctoral, 2010). Este estudio consistió en inocular por injerto un aislado clonal de T36 (procedente de la un clon infeccioso) mantenido en plantas de LM, a cítricos sanos susceptibles (ND, POM y LM) y a uno parcialmente resistente (AM). A lo largo de 4 años se realizó la evolución experimental de este aislado mediante pases sucesivos por injerto a nuevas plantas y se analizó la estructura poblacional y variabilidad genética de los genes supresores *p20* y *p23*. Los resultados mostraron una gran estabilidad de las poblaciones de CTV en los huéspedes sensibles a lo largo de los pases, mientras que en AM se detectaron cambios importantes. Desde el primer pase se detectaron variantes de secuencia muy divergentes a las de T36 y relacionadas filogenéticamente con las secuencias consenso de aislados suaves y agresivos del virus. Este suceso ocurrió en réplicas biológicas del mismo pase así como a lo largo de los pases seriados durante los dos primeros años. Sin embargo, a lo largo del tiempo de evolución (4-5 años), la secuencia consenso de *p20* y *p23* del aislado de partida T36 volvió a observarse como mayoritaria en un número considerable de poblaciones virales. A pesar de ello, las poblaciones mantenían variantes de secuencia divergentes a éste en diversas proporciones, que convergían con las de los aislados

suaves y agresivos, o bien se encontraban en el tránsito de evolución entre ambos. Ello sugería que un huésped resistente como AM actúa como un cuello de botella forzando la evolución rápida de este virus (o de algunos de sus genes) como consecuencia de tamaños poblacionales efectivos reducidos. También indicaba que la evolución de CTV seguiría el modelo de paisajes adaptativos de Wright, en el que los tres genotipos analizados representarían picos de eficiencia biológica, al menos para los genes estudiados, separados por profundos valles.

Debido a la complejidad de abordar este tipo de estudios evolutivos en cítricos y, teniendo la posibilidad de analizar las infecciones sistémicas de poblaciones de CTV en un huésped herbáceo, en este capítulo estudiamos la evolución de CTV-T36 mediante pases seriados en *N. benthamiana*. Con el fin de analizar la estabilidad genética del aislado en este nuevo huésped, las características de sus poblaciones y su potencial de adaptación, se llevó a cabo la evolución experimental de dos linajes de CTV-T36, con o sin el gen marcador GFP, a lo largo de 11 pases. La transmisión del virus desde plantas infectadas sistémicamente hasta plantas sanas se realizó mediante injerto de inflorescencias y peciolos, después del tratamiento previo de éstas con el supresor del silenciamiento p19 (TBSV). Ello fue clave e imprescindible para conseguir tasas de infectividad relevantes (de hasta el 44%), en comparación con las obtenidas con el supresor del silenciamiento p23 de CTV (11%) o la falta de infectividad en ausencia de supresor.

Al inicio del experimento de evolución, los porcentajes de prendimiento de los injertos infectados de CTV-NB en *N. benthamiana* sanas fueron bajos (20-30%), lo que podría deberse a una menor carga viral de los injertos en los primeros pases, que podrían suponer un cuello de botella y/o que el aislado de origen procedente de cítricos no estuviera adaptado a este huésped. Ello provocaría infecciones subliminales y/o interacciones no compatibles del virus como las que se observan en los huéspedes cítricos resistentes a CTV, en los que el virus se replica, acumula y mueve mal (Folimonova *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011; Dawson *et al.*, 2013, 2015; Gómez-Muñoz *et al.*, 2016). Este tipo de interacciones virus-huésped no exitosas, podrían provocar un colapso de los tubos cribosos del floema en las zonas de unión con la planta receptora limitando la supervivencia de los injertos, tal como ocurre en las

interacciones incompatibles de aislados de CTV en cítricos resistentes como el AM (Bar-Joseph y Nitzan, 1991; Folimonova *et al.*, 2008). En cambio, en pases más avanzados del experimento de evolución, concretamente a partir de P7, el prendimiento y supervivencia de injertos incrementó hasta el 100%, lo que también se correlacionaba con mayores cargas virales de las poblaciones infectando estos pases. Adicionalmente, los cambios genéticos observados en la secuencia consenso de los virus evolucionados de dichos pases fueron importantes, y podrían implicar su adaptación al huésped y la compatibilidad de las interacciones virus-planta responsables de una infección exitosa. De hecho, la tasa máxima de prendimiento de injertos en P7 coincidió con un adelanto de los síntomas inducidos por CTV en *N. benthamiana*. Estos síntomas, que incluyen arrugamiento, epinastia, clorosis de nerviaduras y necrosis apical (Ambrós *et al.*, 2011) se adelantaron una semana a partir de P7, un indicio más de la potencial adaptación del virus, que alcanzaba mayores títulos en menor tiempo e interacciones más eficientes con este huésped.

En estas etapas avanzadas del experimento, el porcentaje global de infectividad de las plantas injertadas también aumentó hasta el 60-80% (2 mpi). Es importante destacar que el aumento de infectividad neto a lo largo de los 11 pases de CTV-NB fue significativo para ambos linajes evolucionados. Este tipo de adaptación también se ha descrito en experimentos de pases seriados utilizando la planta herbácea *Pisum sativum* (planta del guisante) y el potivirus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV), donde se transmitía el virus mecánicamente consiguiendo una tasa de infección del 100% al llegar a P4, mientras que la tasa inicial era del 3% (Wallis *et al.*, 2007). Al igual que en nuestro ensayo, el tiempo de aparición de los síntomas característicos de la infección por PPV en guisante se redujo a más de la mitad de P1 a P10 (Wallis *et al.*, 2007). De forma similar, en experimentos de evolución llevados a cabo en *A. thaliana* durante 17 pases seriados con otro potivirus, en este caso el del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV), también se produjo un aumento neto de la tasa de infectividad (pasando del 18% en los primeros pases al 100% al final del experimento) como de los síntomas inducidos, que pasaron de ser muy suaves inicialmente a más intensos en los pases finales (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). Resultados similares se obtuvieron

también al evolucionar TEV durante 15 pases en 4 huéspedes herbáceos distintos de la familia *Solanaceae*, en los que se detectó una adaptación local a cada huésped con un incremento considerable de la infectividad y la virulencia, y a su vez, una disminución en los otros 3 huéspedes (Bedhomme *et al.*, 2012).

Las cinéticas de acumulación de CTV-NB a lo largo de los pases seriados en *N. benthamiana*, confirmaron el incremento neto significativo en ambos linajes hasta P10 (qRT-PCR y *Northern blot*), lo que se correlaciona con todas las características adaptativas comentadas anteriormente. Además, el resultado obtenido fue similar para ambos linajes, lo que sugiere un fenómeno de convergencia adaptativa. No obstante, a pesar de la caída en el título viral observada en el P11 del experimento (debido a factores externos), las plantas infectadas siguieron mostrando el adelanto significativo en los síntomas. Resultados similares se obtuvieron también en el estudio de adaptación de PPV a la planta del guisante (Wallis *et al.*, 2007), en los que se observó una disminución del 50% entre el primer y el último pase en el valor de Ct obtenido mediante qRT-PCR, independientemente del aislado del virus y del tipo de transmisión empleados. Estos hechos se deberían, principalmente, a un aumento en el número de secuencias en la población viral con mayor compatibilidad con la maquinaria del nuevo huésped que permitirían una replicación/interacción más eficiente y, por tanto, poblaciones con mayor capacidad de movimiento célula a célula y a larga distancia. Esto también facilitaría la transmisión planta a planta y, como consecuencia, aumentaría la probabilidad de supervivencia del virus. Asimismo, durante la evolución de TEV en *A. thaliana* también se detectó un incremento significativo en la carga viral, ya que el virus evolucionado a lo largo de 17 pases se acumuló unas 44 veces más que el TEV salvaje (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). La acumulación del virus del mosaico del pepino (CMV) al realizar 5 pases seriados en *A. thaliana* también mostró un ligero incremento en alguno de los aislados estudiados (Pagán *et al.*, 2014), aunque quizá poco significativo debido al escaso número de pases llevado a cabo.

Cabe destacar que tanto la infectividad como el título viral son parámetros de medida de la eficacia biológica del virus, de modo que un aumento neto a lo largo de la evolución es indicativo de que el virus está mejor adaptado al huésped.

Un dato más que evidencia la adaptación de CTV a *N. benthamiana* durante la evolución experimental en este huésped, es el hecho de haber conseguido infectar sistémicamente esta planta mediante la inoculación mecánica de extracto crudo viral procedente de los pases P7 y P11, algo que no se había conseguido antes sin el pre-tratamiento con supresores del silenciamiento (Ambrós *et al.*, 2011, 2013). Además, el mayor título viral en estas plantas infectadas sistémicamente con los virus evolucionados de P7 y P11, en las que aumentan tanto los gRNAs como los sgRNAs de CTV, apoya la hipótesis de poblaciones bien adaptadas a este huésped.

Adicionalmente, se detectó un cambio importante en los perfiles y acumulación de los siRNAs derivados de la infección de CTV-NB a lo largo de la evolución experimental. Éstos pequeños RNAs se generan como respuesta de defensa de la planta frente a infecciones víricas, mecanismo conocido como silenciamiento génico mediado por RNA, y sus tamaños suelen ser de 21-24 nt (Hamilton y Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001). Los virus, por su parte, desarrollan un mecanismo de contra-defensa mediado por proteínas supresoras del silenciamiento génico (Csorba *et al.*, 2009; Ding, 2010). Así, tanto el patrón como los niveles de acumulación de siRNAs variarán en función del mecanismo de acción de los supresores y de su capacidad de interacción con las proteínas del huésped. Estos niveles, al igual que la acumulación de gRNA a medida que avanzaba la evolución, también aumentaron con los pases, sugiriendo nuevamente la adaptación de CTV a este huésped herbáceo. Los cítricos sensibles (ND y LM) infectados de forma natural con CTV, al presentar un mayor título viral, también muestran una mayor acumulación de siRNAs (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). En cambio, en AM, donde el virus se acumula muy poco, los niveles de siRNAs son bastante inferiores, hecho que también se correlaciona con una menor expresión de los sgRNAs de los 3 supresores del silenciamiento de CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). De forma paralela, en nuestro experimento sucedería algo similar: a medida que el virus se va adaptando al huésped herbáceo, se replica y mueve mejor y éste se hace más sensible a la infección viral de modo que la acumulación de siRNAs también va aumentando.

No obstante, un indicativo importante hace referencia al tipo de siRNAs acumulados en estas plantas, de modo que en los

primeros pases evolutivos se observó una predominancia de siRNAs de mayor tamaño (24 nt y superiores). Por el contrario, en pases avanzados de la evolución se observó un patrón más complejo detectándose también la acumulación de siRNAs de menor tamaño (21-22 nt). Este patrón de siRNAs de menor tamaño se asemejaría más al perfil detectado en cítricos sensibles a las infecciones por CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011) como LM y ND, lo que sugeriría similitudes en su expresión en el huésped herbáceo y en el natural, así como una mejor adaptación del sistema de silenciamiento génico mediado por RNA del virus en el nuevo huésped.

La distribución de las mutaciones en las secuencias consenso de las poblaciones evolucionadas de CTV-NB, fue muy desigual a lo largo del genoma viral: éstas se concentraron principalmente en dos regiones calientes o “hot spots”. En la primera de ellas, comprendida entre las 4-7 Kb de la poliproteína, aparecían mutaciones no-sinónimas comunes a ambos linajes a partir de P6, así como otras específicas del linaje FLG. Aunque en esta región no existe ningún dominio estrictamente funcional de la poliproteína, no se puede descartar que los cambios aminoacídicos observados permitan interacciones más eficaces con el nuevo huésped. De los tres cambios aparecidos en ambos linajes, uno aparece en P6 (C4771G) mientras que los otros dos (T6115A y C6244T) lo hacen en P9, y todos se mantienen en la secuencia consenso de la población hasta el final del experimento. Es importante destacar que el aumento significativo en el título viral en *N. benthamiana*, que se acelera a partir de P6-7, se correlaciona con la detección en estos pases, de las mutaciones mencionadas. Su plausible implicación en la tasa de replicación de CTV, que se ve favorecida en el nuevo huésped *N. benthamiana*, requeriría de estudios de genética reversa para establecer la relación directa. Por otra parte, las tres mutaciones aparecidas en P5, que se encontraban en el dominio MET, no quedaron fijadas en la población mayoritaria. Durante el experimento de evolución de PPV en plantas de guisante, se produjo una mutación con cambio de aminoácido que era la responsable del aumento en el título viral y afectaba a la proteína N1b. En este caso, la proteína era la RNA polimerasa RNA dependiente directamente implicada en la replicación viral (Wallis *et al.*, 2007). En nuestro

ensayo, es interesante resaltar que en la secuencia consenso de la población más evolucionada de CTV-NB, en P11G, se detectó la única mutación que afectaba a la RdRp viral. El hecho de que ésta fuese de las primeras sustituciones revertidas durante el primer año de regreso de estos virus evolucionados al huésped natural, cítricos, hace especular sobre alguna ventaja adaptativa de esta mutación según el huésped en el que se replica CTV.

La segunda región donde se acumularon un gran número de mutaciones, fue el gen *p23*, siendo muchas de ellas comunes en ambos linajes, tanto sinónimas como no-sinónimas. Cinco de estos cambios, C18740T, C18838T, C18956T, C18976T y C19017T, aparecieron entre los países P6 y P8 en ambos linajes y quedaron fijados hasta el último pase. Todos ellos muestran sucesos de convergencia evolutiva, al igual que los detectados en la región estudiada de la poliproteína, y podrían relacionarse con la adaptación específica de las poblaciones de CTV a este nuevo huésped. Este tipo de situaciones se han observado previamente en otros virus de plantas. Así, tras la evolución del virus de la rotura de la flor del pelargonium (PFBV) en plantas de *Chenopodium quinoa*, se detectaron 5 mutaciones en el gen de la CP del virus directamente relacionadas con la evolución adaptativa en este huésped (Rico *et al.*, 2006). Además, en este caso se demostró que dichas mutaciones eran co-variaciones. Asimismo, la evolución de TEV en diferentes ecotipos de plantas de *A. thaliana* también originó mutaciones específicas de huésped que se fijaron en genes como los de la CP o el supresor del silenciamiento HC-Pro (Hillung *et al.*, 2015). De forma similar, en PPV se han detectado mutaciones adaptativas en la región Nt de su CP cuando es evolucionado en dos especies del género *Nicotiana*. Esta región está implicada en el movimiento sistémico del virus y es clave en su interacción con la maquinaria de defensa del nuevo huésped. Así, las mutaciones en esta región son adaptativas para permitir el movimiento a larga distancia en estas plantas herbáceas, pero conllevan un coste, ya que disminuyen la capacidad de movimiento de esos virus en melocotonero, su huésped natural (Carbonell *et al.*, 2013). Además de éstas, también se han detectado mutaciones adaptativas específicas de huésped en la región C-P3(PIPO)/6K1/N-CI de PPV cuando el virus evoluciona en *N. benthamiana* o cerezo (*Prunus avium*), lo que induce una pérdida de eficacia biológica en el

huésped contrario, afectando tanto a su capacidad de replicación como a la de movimiento (Calvo *et al.*, 2014).

Otro de los factores a tener en cuenta en la observación de la acumulación de mutaciones en el gen *p23* durante su evolución en *N. benthamiana*, es que se trata de uno de los supresores de silenciamiento de CTV, el más potente a nivel intracelular (Lu *et al.*, 2004; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Las modificaciones acumuladas podrían desembocar en una capacidad de supresión adaptada al nuevo huésped herbáceo. La evolución de los mecanismos de interacción entre el/los supresor/es viral/es y las rutas de defensa de la planta, también se refleja en el cambio observado a lo largo del experimento, del perfil de siRNAs derivados de *p23*. En las etapas iniciales de la evolución, la resistencia del nuevo huésped a la infección por CTV es elevada, y los niveles de siRNAs detectados bajos. Como consecuencia de la evolución y adaptación de los virus CTV-NB al nuevo huésped, aumentan los niveles de siRNAs y se observa una modificación en el patrón, ya que se enriquece en RNAs de mayor tamaño. Finalmente, el patrón parece asemejarse más al perfil observado en cítricos sensibles cuando están infectados por el virus ancestral.

Además del conjunto de mutaciones mencionadas, es importante resaltar que en las poblaciones más evolucionadas de CTV-NB P11, se detectaron un conjunto de sustituciones *de novo* en los genes *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* y *p20*, además de en los extremos 5' y 3'-UTR. Tanto la *RdRp* como los extremos 5' y 3'-UTR son regiones con una implicación clave en la replicación viral.

Con respecto a la dirección de la presión selectiva en la evolución de los virus CTV-NB, se ha mostrado que las mutaciones de P5 que afectaban a las posiciones genómicas 3737 y 3854, estaban sometidas a selección negativa. Al tratarse de mutaciones dentro de una región muy conservada de la metiltransferasa, a pesar de no afectar los dominios estrictamente funcionales, es plausible pensar que de algún modo podrían afectar la eficacia biológica del virus y por ello revertieron tras el P5, sin observarse en el resto de las poblaciones evolucionadas. De forma similar, el acúmulo de este tipo de mutaciones en la poliproteína, podría influir en la menor infectividad y acumulación viral detectada de los virus evolucionados de P5FL una vez de regreso a cítricos, al menos en las etapas iniciales (plantas madre CM iniciales). Por otra parte, la acumulación

de sustituciones sinónimas observadas en *p23* también indicaría que las poblaciones estarían sometidas a una selección purificadora en esta región, al igual que se ha descrito para algunas posiciones del genoma de TEV en su evolución experimental por pases seriados en un nuevo huésped como *A. thaliana* (Hillung *et al.*, 2014). En el caso de *p23* de CTV, el análisis de selección por codón reveló que las mutaciones que afectaban a las posiciones genómicas 18768, 18976 y 19017 estaban sometidas a selección negativa, apareciendo las dos últimas en los pases P8 y P6, respectivamente, y quedando fijadas en ambos linajes hasta P11. Al tratarse de mutaciones sinónimas que muestran una evolución convergente, este fenómeno se podría explicar por el hecho de: i) mantener estructuras secundarias de RNA que actúen regulando algún proceso, ii) evitar la formación de dsRNAs largos que sean posibles dianas del mecanismo de silenciamiento de la planta, y/o iii) aumentar la eficacia de la traducción mediante el uso de codones sinónimos para los cuales el huésped presenta una mayor cantidad de tRNAs (Hillung *et al.*, 2014). Esta última hipótesis ya se había descrito previamente para CTV y otros closterovirus, de forma que adaptan el uso de codones según el huésped al que infectan (Cheng *et al.*, 2012).

Los árboles filogenéticos obtenidos para la región parcial de la poliproteína y el gen *p23*, reflejaron diversas convergencias evolutivas para los dos linajes evolucionados, consecuencia de las distintas mutaciones aparecidas y mantenidas en las secuencias consenso de sus poblaciones hasta el final del experimento. Las filogenias recogen perfectamente la historia evolutiva del experimento para ambos linajes. Este tipo de evolución se describió por primera vez en un bacteriófago (Bull *et al.*, 1997) y se ha detectado a lo largo de los años en distintos virus de plantas cuando se llevan a cabo experimentos de adaptación mediante pases seriados. Este es el caso, por ejemplo, del virus del mosaico del nabo (TuMV) (Tan *et al.*, 2005), de TEV (Hillung *et al.*, 2014) o del virus del mosaico del trigo (TriMV) (Bartels *et al.*, 2016). Por otra parte, los árboles filogenéticos en los que se incluyen secuencias de genomas individuales de las poblaciones virales del gen *p23* de P9G y P11G, revelaron que la variante ancestral de T36 wt quedaba retenida en un 50% de la población de P9G. En el caso de la población de P11G, la diversidad genética fue más elevada debido a

la presencia de un mayor número de polimorfismos individuales. A pesar de ello, la secuencia ancestral de T36 persistía en un 3% de la cuasi-especie viral, que también retuvo otro 3% de genomas relacionados con las secuencias consenso de pases evolutivos anteriores, como P6 y P7. Estos resultados de la estructura de las cuasi-especies de CTV-NB, irían en la línea de lo que se ha denominado “genomas memoria minoritarios” (Briones *et al.*, 2003; Briones y Domingo, 2008) o “memoria de cuasi-especies”. Este fenómeno hace referencia a una “memoria molecular” en las poblaciones virales de su historia evolutiva anterior, que queda mantenida en la cuasi-especie en forma de genomas minoritarios dentro del espectro de mutantes. Estos genomas minoritarios no se detectan en la secuencia consenso del virus y suelen representar el 0.1%-10% del espectro de mutantes. En nuestro caso, las poblaciones más evolucionadas de P11G seguirían esta dinámica. Se ha referenciado ampliamente cómo estos genomas memoria pueden condicionar la respuesta del virus ante nuevas presiones selectivas (como la respuesta a nuevos fármacos antivirales en el caso de HIV o la infección de un nuevo huésped), y ser responsables del fracaso de terapias en enfermedades causadas por importantes virus patógenos (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000; Briones y Domingo, 2008). En el caso de las cuasi-especies evolucionadas de P11G, la retención en su cuasi-especie de genomas minoritarios de la secuencia ancestral de cítricos (el huésped natural de CTV-T36), podría acelerar la re-adaptación de la población viral una vez de regreso a su huésped natural. En este caso, esos genomas minoritarios ofrecerían de nuevo ventaja en el huésped ancestral, y volverían a predominar con el tiempo en la población, representando la secuencia mayoritaria. De hecho, esta situación es la que observamos en las poblaciones de P11G-Cit al cabo de tres años de regreso a cítricos.

Con respecto a estas poblaciones de CTV-NB evolucionadas de regreso a cítricos, el huésped natural, los virus de los pases P1G, P4G, P5FL y P11G inoculados mecánicamente en *C. macrophylla*, mostraron un retraso en la capacidad de infección conforme más evolucionado estaba el virus: mientras el aislado clonal original de T36 wt infectaba un 100% tras 1 mpi, el resto mostró una tasa de infección más reducida, y los virus de P11G tan sólo infectaron el 25% de cítricos en ese período. Sin embargo, esta disminución sólo

de detectó en la etapa inicial del establecimiento de la infección en cítricos, ya que después los valores se restablecían y en cualquier caso la eficacia de infección de CTV en cítricos nunca se perdió. Este retraso en la inducción de la infección en cítricos podría ser un indicio de la adaptación ocurrida en el nuevo huésped herbáceo. Esta situación se observó en los experimentos de PPV a la hora de inocular el virus evolucionado en plantas de guisante en melocotoneros (*Prunus persica*), el huésped natural. Las tasas de infectividad conseguidas en melocotoneros con el virus evolucionado de P1 fueron del 70%, pero disminuyeron de forma progresiva hasta el 10-15% con el P8 (Wallis *et al.*, 2007).

El título viral de las poblaciones de CTV-NB de regreso a *C. macrophylla*, también se evaluó a lo largo de tres años, obteniendo resultados dispares. Cabría esperar unos títulos iniciales mayores para pases inferiores y menores para pases más avanzados, consecuencia de la acumulación de mutaciones resultado de la adaptación a *N. benthamiana*, seguidas de un aumento progresivo a lo largo de los años como consecuencia de la re-adaptación a cítricos. Sin embargo, los resultados muestran que P5FL es el pase con menor carga viral, la cual, aunque disminuye ligeramente a lo largo del tiempo, se mantiene relativamente estable. Es de destacar, que en este pase fue donde se encontraron gran cantidad de mutaciones en la región de la poliproteína más próxima al extremo 5' (hasta las 4 Kb), no detectadas en pases posteriores y eliminadas de las poblaciones más evolucionadas. Se podría especular sobre el efecto negativo que estas mutaciones, o algunas de ellas, podían haber tenido sobre la eficacia replicativa de los virus de P5FL, lo que se podría manifestar en el menor título viral observado. Por otra parte, la situación observada para P11G sí que cumple la hipótesis inicial, de forma que en año 1 la carga viral es inferior a P1G, y aumenta progresivamente (hasta casi el doble) a medida que la población de este pase se re-adapta nuevamente al huésped natural (año 3), o se seleccionan como mayoritarios de nuevo los genomas ancestrales que habían permanecido como minoritarios. En cuanto a P1G, a pesar de una ligera disminución del título viral en año 2 (consecuencia quizás del estado de las plantas o del extracto utilizado), también aumenta en año 3 alcanzando el valor obtenido con P11G.

En cuanto a los resultados de caracterización biológica de los virus evolucionados de CTV-NB en cítricos indicadores, la tasa de infectividad observada (tras el primer mpi e independientemente del pase injertado), fue del 100% en los cítricos parcialmente resistentes (AM y POM). Por el contrario, en el resto de huéspedes sensibles injertados, sólo se consiguió este nivel de infectividad cuando se inocularon los virus de P11G. Estos resultados sugieren que las mutaciones detectadas en el genoma de CTV durante su evolución, no parecían afectar a ninguno de los genes o regiones implicadas en la invasión inicial en huéspedes resistentes, pero podrían afectar a las implicadas en la infección-interacción en huéspedes sensibles. En este contexto, es interesante hacer notar que entre las primeras mutaciones de las poblaciones CTV-NB de P11G para las que se observa reversión a la secuencia ancestral de cítricos, se encuentran las que afectan a la RdRp y los extremos 5' y 3'-UTR, regiones relacionadas con la eficacia replicativa en el huésped, así como p18, un gen para el que se ha demostrado su implicación en la infección exitosa de determinadas especies de cítricos (Tatineni *et al.*, 2011).

El patrón de expresión de CTV detectado mediante IP-ELISA en todos los pases y cítricos inoculados no varió, quedando limitada la infección a las células floemáticas, al igual que el virus salvaje (Ambrós *et al.*, 2013). En cambio, el patrón de acumulación sí que sufrió cambios tanto a nivel de pase como de huésped. Así, en las plantas de CM madre, y en concordancia con los resultados de qRT-PCR, se detectaron niveles de acumulación inferiores en P5FL y P11G respecto a P1G y al virus salvaje durante el año 1, mientras que dos años más tarde los niveles de acumulación del último pase aumentaron y los de P5FL no. Por otra parte, en las plantas de LM los niveles de acumulación viral fueron inferiores a los detectados en las CM madre para todos los virus, e incluso P1G se acumulaba peor que el aislado salvaje durante el año 1. Resultados similares se obtuvieron al analizar tejidos infectados de P1G y P11G mediante lupa UV, donde cabe destacar la baja acumulación observada en ND a pesar de ser un huésped sensible. CTV es un virus altamente especialista y adaptado a ciertas especies de cítricos en los que sólo se replica y mueve eficazmente en los más susceptibles como CM, ND y LM. Su evolución por pases seriados en un nuevo huésped como *N. benthamiana*, habría producido su adaptación a éste, y

como consecuencia los virus evolucionados habrían perdido eficacia biológica en los huéspedes cítricos naturales, situación que se ha descrito también con TEV (Bedhomme *et al.*, 2012) y en PPV (Carbonell *et al.*, 2013; Calvo *et al.*, 2014). Esta compensación o coste adaptativo podría ser debida a la aparición de mutaciones específicas de huésped en el genoma de CTV.

Los síntomas inducidos en los cítricos indicadores inoculados con los virus de CTV-NB, también reflejaron la evolución sufrida por el virus en 11 pases, consecuencia de su potencial adaptación a *N. benthamiana*. Así, los virus de P11G indujeron síntomas de SY y enanismo, tanto en AM como en POM, más suaves que los virus CTV-NB de pases anteriores y que el aislado salvaje. Los cambios en la secuencia consenso del virus y su posible pérdida de eficacia biológica en el huésped natural por adaptación al huésped herbáceo, serían los desencadenantes de una reducción de la virulencia en cítricos (al menos en algunos huéspedes), al igual que ocurre con TEV cuando evoluciona en distintos huéspedes de forma local y pierde eficacia en el resto (Bedhomme *et al.*, 2012) o en PPV cuando evoluciona de una especie herbácea a una leñosa o viceversa (Carbonell *et al.*, 2013; Calvo *et al.*, 2014).

El análisis de las secuencias completas de P5FL y P11G de regreso a cítricos, mostró una pérdida progresiva de las mutaciones que se fijaron durante la evolución de CTV en *N. benthamiana*. Los cambios de P5FL, al estar presentes sólo en este pase, aportaban poca información y tampoco se pudieron asociar con efectos biológicos concretos. La tasa de reversión de mutaciones de P5FL fue, sin embargo, menor que la observada para P11G en los dos primeros años. En cambio, las primeras mutaciones que se perdieron durante el año 1 en P11G fueron las de los extremos 5' y 3'-UTR, la de RdRp y la de p18, regiones implicadas en la replicación del virus y cuyos cambios podrían aumentar la eficacia biológica de CTV en el huésped herbáceo pero que, por el contrario, implicarían una menor capacidad de replicación en cítricos. Durante el siguiente año se perdieron mutaciones de la poliproteína y de p23, quedando sólo 6 de los cambios mantenidos en ambos linajes y fijados desde los primeros pases. Estos resultados sugieren que estas mutaciones, que podrían aportar cierta eficacia biológica en *N. benthamiana*, no afectarían tanto a la eficacia del virus en cítricos y,

por ello, fueron revertidas en las últimas etapas de la re-adaptación al huésped natural.

Los árboles filogenéticos generados para las secuencias consenso del gen *p23* de todos los países y ambos linajes en cítricos y *N. benthamiana*, mostraron cómo la población de P11G, de vuelta a cítricos, sufría una regresión de su secuencia consenso pasando por etapas previas de su historia evolutiva en el huésped herbáceo. Además, al incluir en estos árboles secuencias individuales de las cuasiespecies de P9G y P11G para este gen, se observa cómo las secuencias de P11G-Cit de los años 1 y 2 se agrupan y convergen con variantes de secuencia de las poblaciones virales observadas en *N. benthamiana*, y que fueron sustituyendo poco a poco a las evolucionadas en este huésped, una vez regresadas a cítricos.

La historia evolutiva de la re-adaptación de CTV al huésped natural, se ve reflejada en el árbol filogenético que contiene todas las secuencias consenso completas de los países y linajes, en ambos huéspedes. En él, todas las secuencias evolucionadas en cítricos de año 3 se agrupan con la ancestral de T36 wt, y se perfila la dirección evolutiva y las convergencias observadas para ambos linajes y huéspedes con el tiempo.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Durante el desarrollo de esta tesis se ha avanzado en el conocimiento de las interacciones virus-planta en uno de los patosistemas más difíciles de abordar, no sólo por la complejidad del propio virus sino también por las características de sus huéspedes naturales. A pesar de ello, se han utilizado diversas estrategias que nos han permitido ampliar la información al respecto y tener una visión más integral de dicho patosistema.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), el mayor de los virus de ssRNA de plantas, tiene un rango de huéspedes muy restringido y de forma natural sólo infecta el floema de algunas especies de cítricos. Así, el nicho ecológico natural en el que se dan las infecciones celulares e interacciones de CTV con las proteínas del huésped, es muy estricto. Sin embargo, tal como se ha mostrado en los últimos años y en este trabajo, en un huésped experimental no-natural como *N. benthamiana*, algunos aislados de CTV son capaces de inducir infecciones celulares aunque con un comportamiento diferencial. De este modo, sólo algunos aislados severos, entre ellos T36 y T318A, se replican con éxito en protoplastos de esta especie (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ambrós *et al.*, 2013). La fase de replicación es esencial para el inicio de la infección celular, lo que implica que el virus y sus proteínas han de ser capaces de establecer las primeras interacciones con componentes del huésped para hacer uso de la maquinaria de replicación del mismo. A pesar de ello, el establecimiento de una infección sistémica requiere que el virus progrese desde las células inicialmente infectadas al resto de la planta, es decir ha de ser capaz de moverse. Dicho movimiento ocurre en dos etapas sucesivas: la primera sólo a nivel local e implica el transporte del virus por el citoplasma de la célula infectada hacia la periferia y su salida a las células vecinas, y la segunda que consiste en el movimiento a larga distancia a través de los elementos floemáticos (Waigmann *et al.*, 2004). En ambas etapas, son indispensables múltiples interacciones entre los factores del huésped y del virus (Gilberston y Lucas, 1996; Folimonova *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2015).

En este contexto, el uso de clones agroinfectiosos de cDNA de dos aislados que se replican en protoplastos de *N. benthamiana*,

ha demostrado que sólo uno de ellos, T36, es capaz de infectar sistémicamente este huésped, induciendo síntomas similares a los observados en cítricos (Ambrós *et al.*, 2011; 2013). Por el contrario, T318A únicamente es capaz de replicarse a nivel celular y establecer infecciones locales limitadas a unas pocas células sin infectar sistémicamente (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009; Ambrós *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, datos no publicados; Gómez-Muñoz, tesis doctoral en fase de escritura). Esto sugiere un movimiento limitado a corta distancia para T318A y la ausencia de movimiento a larga distancia en este huésped. Esta respuesta dual implica la existencia de interacciones diferenciales entre algunas proteínas de estos aislados virales y las de *N. benthamiana*, que serían las responsables de que se establezca una interacción compatible o no.

A lo largo de este trabajo, nos hemos basado en esta respuesta diferencial en las interacciones entre los aislados T36 y T318A y su huésped para estudiar los factores implicados en ellas. Además, el hecho de que la sintomatología inducida en el huésped experimental sea similar a la observada en cítricos, indicaba que muchas de las interacciones CTV-*N. benthamiana* y/o las rutas principales implicadas en la inducción de enfermedad/patogénesis serían comunes a ambos huéspedes.

Debido a la complejidad del genoma de CTV, el trabajo se ha centrado en dos de sus proteínas supresoras del silenciamiento génico, p20 y p25, las menos estudiadas anteriormente. El análisis de la localización subcelular de p25 en *N. benthamiana* y cítricos, reveló diferencias importantes entre el aislado severo T318A y los más suaves, T36 y T385. En el presente trabajo se han determinado por primera vez, algunos de los motivos de secuencia específicos que regulan dicha localización diferencial. Así, mientras que la p25 de T318A presenta una localización citosólica, las p25 de los otros dos aislados se localizan en el núcleo, tanto en *N. benthamiana* como en cítricos. El hecho de que la localización subcelular de estas proteínas sea la misma cuando se expresan en el contexto de una infección viral *in planta* (mediante PVX), apoya la fiabilidad de los resultados observados en las expresiones transitorias. Además, la posible interacción detectada entre p25-T36 y la Ran3-GTPasa de *N. benthamiana*, encargada de separar las importinas de las proteínas translocadas al núcleo, también se correlacionaría con la localización nuclear observada. El hecho de que la p25 carezca de

una señal NLS típica se vería compensado por su importación al núcleo vía Ran3 o sus importinas asociadas.

La localización subcelular hallada para p25 podría tener implicaciones clave en las funciones que la CP viral debe llevar a cabo durante la infección celular, de modo que su traslado y acumulación en el núcleo sería decisoria para la multiplicación, acumulación y/o movimiento viral en una infección compatible como la observada en el patosistema T36-*N. benthamiana*. Algunas de las proteínas de este huésped detectadas en complejos proteína-proteína tras un análisis proteómico, mostró interactores potenciales de la p26-T36 con enzimas nucleares que podrían permitir al virus la regulación de procesos de transcripción y maduración de mRNAs a su favor.

Por el contrario, su translocación mayoritaria al citosol, que es lo que se observa para la p25 de T318A, no permitiría establecer algunas de las interacciones necesarias con los factores nucleares implicados en estos procesos, pudiendo afectar el éxito de la infección y el movimiento sistémico.

En cambio, la localización subcelular de p20 en el núcleo celular independientemente del aislado estudiado y el huésped, va en la línea de lo descrito para muchas proteínas supresoras del silenciamiento de virus de plantas. Este orgánulo es el lugar donde las proteínas supresoras virales mayormente inducen o contrarrestan las rutas de defensa antiviral, la patogénesis (Taliensky *et al.*, 2010; Shaw y Brown, 2012), o el movimiento sistémico (Csorba *et al.*, 2009). Además, la peculiar distribución de p20 a nivel perinuclear y en vesículas amorfas dentro del núcleo podría estar asociada a la distribución de las vesículas de maduración y exportación al citosol de las ribonucleoproteínas (RNPs), a componentes de la membrana nuclear y/o derivadas del retículo endoplasmático asociadas a los complejos o factorías de replicación viral en el citosol (Salonen *et al.*, 2005; Mackenzie, 2005; Denison, 2008; Laliberté y Zheng, 2014), a su posible interacción con la fibrilarina, un marcador de nucleólo, o la redistribución de ésta afectando los niveles de transcripción celular en beneficio del virus (Hiscox, 2002), o a una respuesta patogénica exacerbada tipo hipersensible. Al co-expresar p20-GFP con la fibrilarina, la extensión de la localización de esta última proteína a zonas de acumulación de p20, concretamente a regiones perinucleares, también sugería una

interacción entre ambas proteínas, aunque en este trabajo no se observó interacción directa entre p20 y el nucléolo. A pesar de ello, no se puede descartar este tipo de interacción, ya que p20 podría ser capaz de relocalizar parte de la fibrilarina sintetizada para alterar diversas funciones celulares y favorecer muchos de los procesos llevados a cabo durante el ciclo biológico del virus. Este fenómeno de interacción de la fibrilarina con la ORF3 del virus de la roseta del maní (GRV) o con la proteína p2 del virus del rayado del arroz (RSV) (Kim *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2015) se ha descrito previamente como facilitador del movimiento a larga distancia de estos virus.

La localización nuclear de ciertas proteínas virales es importante también para llevar a cabo funciones específicas que le permiten al virus completar su ciclo vital. En el caso de p25, al tratarse de una proteína multifuncional, requeriría una localización en distintos compartimentos celulares para poder realizar ciertas funciones como la supresión del silenciamiento, además de una localización citoplasmática para llevar a cabo la encapsidación del virión, tal y como se ha descrito para las proteínas de la cápsida (CP) de otros virus de los géneros Begomovirus, Carmovirus o Sobemovirus (Gorovits *et al.*, 2013; Olsper *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015), permitiendo así la invasión del huésped. Asimismo, las diferencias en la localización entre la p25 de T318A y la de T36 y T385 podrían ser las responsables del comportamiento diferencial de estos aislados en *N. benthamiana*, de forma que CTV requeriría, por ejemplo, la localización de p25 en el núcleo de esta especie para poder moverse a larga distancia. No obstante, hay que considerar que en los procesos de replicación y movimiento también intervienen otras interacciones entre proteínas, tanto del virus como del huésped, por lo que la localización de p25 no sería suficiente para permitir ciertas etapas del ciclo viral, tal como se ha observado en el aislado de T385, que no es capaz de replicarse en esta especie herbácea (Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ambrós *et al.*, 2013).

El estudio de los motivos de secuencia responsables de la localización subcelular de p25 reveló la presencia de una señal de exportación nuclear (NES) en el extremo Nt de esta proteína, compuesta por leucinas y otros aminoácidos hidrofóbicos (del tipo *leucine-rich* NES), que media la exportación de p25 del núcleo al citosol. En ella se detectó un polimorfismo dependiente de aislado en la posición aminoacídica 31, una valina (V) en aislados más

suaves como T36 o T385, o una leucina (L) en los más agresivos como T318A. Esta posición resultó suficiente para cambiar la localización subcelular de los mutantes puntuales de p25 ensayados, confirmando su implicación directa en el funcionamiento de este motivo, de forma que la presencia de la V31 provocaría su inhibición o una disminución en su eficacia de exportación. Siguiendo esta aproximación, y con el fin de estudiar la implicación de esta posición en una infección de CTV *in vivo* en *N. benthamiana*, se determinó que la expresión/replicación de un clon completo del aislado T36 marcado con GFP (El-Mohtar y Dawson, 2014), y que incluía la mutación V31L en su p25, quedaba reducida a un pequeño número de células infectadas en algunas de las hojas agroinoculadas. Este comportamiento es similar al observado cuando se agroinocula el clon de longitud completa del aislado T318A en este huésped (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009; Gómez-Muñoz, tesis doctoral en elaboración). En ambos casos se observa una infección local muy limitada a escasos foci celulares y una necrosis asociada a procesos de PCD y/o HR. Este hecho apoyaría la hipótesis de que la presencia de p25 en el núcleo de las células de *N. benthamiana* permite ciertas interacciones con las proteínas de este huésped que determinan que el virus sea capaz de causar infección local y/o sistémica. No obstante, la localización subcelular de p25 no solamente dependería de la NES caracterizada en la región Nt de la proteína, sino que parece haber otras regiones ricas en aminoácidos hidrofóbicos que podrían intervenir en este proceso, como los aminoácidos 20 y 21 o la región comprendida entre las posiciones 64 a 74. De hecho, la delección de esta última región también induce un cambio en la localización de p25, ya sea debido a interacciones directas o indirectas consigo misma u otras proteínas del huésped, a cambios conformacionales o a variaciones en el balance de cargas. En este sentido, hay que tener en cuenta que esta región queda comprendida en la que se ha descrito recientemente como implicada en la interacción de p25 consigo misma, dominio localizado entre los aminoácidos 41-84 (Nchongboh *et al.*, 2014).

Este fenómeno de localización diferencial de proteínas virales según el aislado ya se había descrito previamente para la proteína ORF6 de las cepas L y U1 del virus del mosaico del tabaco (TMV), de modo que la del primer aislado se localiza en el retículo endoplásmico, mientras que la del aislado U1 presenta una

localización nuclear/nucleolar, citoplasmática y mitocondrial (Gushchin *et al.*, 2013). La localización nuclear/nucleolar de esta última se ha asociado, además, con distintos niveles de patogenicidad (Gushchin *et al.*, 2013). Sin embargo, una localización diferencial para una CP de virus de plantas dependiente de aislado como la detectada en este trabajo con CTV, es novedosa.

Por otro lado, muchas proteínas supresoras del silenciamiento génico también actúan como determinantes de patogenicidad virales (Moissiard y Voinnet, 2004; MacDiarmid *et al.*, 2005). En el caso de CTV, hasta el momento sólo se había identificado a la proteína p23, supresora del silenciamiento génico a nivel intracelular (Lu *et al.*, 2004), como determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* y cítricos (Fagoaga *et al.*, 2006; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Con el trabajo desarrollado en esta tesis se ha confirmado que p20 también actúa como determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* cuando se expresa como un RNA subgenómico del virus X de la patata (PVX) (Sablowski *et al.*, 1995; Scholthof *et al.*, 1995), provocando una intensificación de la sintomatología inducida y causando la muerte rápida de la planta como p23. Además, esta capacidad fue diferencial según el aislado analizado, de modo que p20-T36 inducía síntomas más acusados que p20-T318A, sugiriendo así interacciones ligeramente diferenciales entre las proteínas del huésped y la p20 de cada uno de estos aislados. No obstante, el mecanismo de acción como proteína supresora del silenciamiento sería igual para ambos aislados, ya que durante la infección mediada por PVX-p20 de ambos, se detectaron principalmente siRNAs de 21-22 nt. De hecho, este tipo de siRNAs son los que se acumulan en infecciones de cítricos causadas por CTV (Fagoaga *et al.*, 2006; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011) y cuyo mecanismo de acción se ha propuesto que sea el bloqueo de la metiltransferasa HEN1 que modifica los siRNAs para que puedan ser cargados por las proteínas Argonauta (AGO), o bien la inhibición de AGO1 y/o AGO2 para impedir la degradación del gRNA viral debido a la imposibilidad de éstas de cargar los siRNAs. Ambos mecanismos se han descrito, por ejemplo, para el supresor HC-Pro de potyvirus (Lozsa *et al.*, 2008; Jamous *et al.*, 2011) o 2b de cucumovirus (Zhang *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013), y sería similar al propuesto para p23 de CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se sabe que el núcleo y el nucléolo son esenciales para que las proteínas supresoras del silenciamiento lleven a cabo su función, por ello muchas de ellas se localizan en estos compartimentos celulares (Csorba *et al.*, 2009; Taliansky *et al.*, 2010; Shaw y Brown, 2012). Así, debido a la localización nuclear o no nuclear observada para las p25 de los tres aislados, se decidió determinar la capacidad de supresión del silenciamiento a larga distancia en plantas de *N. benthamiana* de la línea 16c, teniendo en cuenta que esta proteína se ha descrito como supresora a larga distancia (Lu *et al.*, 2004). En este caso, también se observaron diferencias, aunque más sutiles, según el aislado de CTV, de modo que la capacidad de supresión observada para p25-T36 fue superior a la de los otros dos aislados, lo que sugería una vez más una mayor capacidad de éxito en la interacción de las proteínas del aislado T36 con las de este huésped, en este caso con las de la ruta del silenciamiento génico. Cabe destacar que, como hemos mostrado en esta tesis, la capacidad de supresión de p25 es débil en comparación con la de p20 o p23 de CTV, y también con respecto a supresores del silenciamiento de otros virus de plantas como p19 de tombusvirus o HC-Pro de potyvirus (Voinnet *et al.*, 1999; Anandalakshmi *et al.*, 2000).

A diferencia de p20 y p23, la evaluación de la capacidad de p25 para actuar como determinante de patogenicidad de CTV en *N. benthamiana*, llevada a cabo en este trabajo, descartó esta función para p25, en la línea de lo observado previamente en cítricos (Leandro Peña, comunicación personal). Sin embargo, gracias al perfil de siRNAs generados en las plantas infectadas con los virus PVX-p25, que fue mayoritariamente de 24 nt, se pudo inferir el mecanismo de funcionamiento más plausible de este supresor del silenciamiento. Así pues, p25 podría interactuar con AGO4 evitando la carga de estos siRNAs y, como consecuencia, impediría la metilación de ciertos genes de la planta, favoreciendo la infección por parte de CTV. En este sentido, en las listas iniciales obtenidas tras un análisis proteómico entre las p25 de CTV y proteínas del huésped *N. benthamiana* utilizando el programa PILOT, la AGO4 aparecía como posible proteína interactora de la p25 de ambos aislados, aunque con una abundancia baja en los complejos purificados. Además, se ha comprobado que las proteínas p25 y AGO4 interactúan *in vivo* y en un sistema de doble híbrido de

levadura, aunque dicha interacción no es fuerte (Neus Gómez, tesis doctoral en fase final de escritura y Gómez-Muñoz *et al.*, en preparación). Estos resultados irían en concordancia con la hipótesis del mecanismo de acción propuesto para p25 y, la débil interacción mostrada entre ambas proteínas *in vivo*, reflejaría la baja capacidad de supresión del silenciamiento de p25 descrita en el Capítulo 2 de esta tesis.

Por otra parte, la obtención del interactoma de p25 de los aislados T36 y T318A con las proteínas del huésped *N. benthamiana* reveló diferencias interesantes entre ambas. Por un lado, las proteínas potencialmente interactoras de p25-T36 se relacionaron con un gran número de procesos metabólicos, actividad redox, homeostasis y transporte celular, biosíntesis y degradación de proteínas, unión a proteínas plastídicas o de ácidos nucleicos, de respuesta a estrés, defensa, metilación, señalización mediante especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas de choque térmico (HSP). Mientras que, los interactores potenciales de p25-T318A estaban más con transporte/localización, respuesta a estrés, especialmente con proteínas implicadas en apoptosis, patogénesis y HSPs, o de unión a calcio y redoxinas. Estas diferencias en la complejidad y diversidad del interactoma obtenido para la p25-T36 respecto al de p25-T318A determinarían la respuesta diferencial de estos aislados en *N. benthamiana*.

La interacción de proteínas virales con componentes de los fotosistemas, encargados de la producción de energía de la planta, se ha relacionado con la inhibición de ciertas rutas de defensa, favoreciendo la infección por parte de los virus e induciendo síntomas característicos de cada virus (Jang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). Así pues, la interacción de la p25 de ambos aislados con proteínas del complejo de captación de luz (LHC) sugeriría la implicación de los cloroplastos en la infección por CTV, mientras que la posible interacción diferencial de p25-T318A con PsaO sería la que determinaría algunos de los síntomas característicos de este aislado. Otro interacto importante detectado para ambas p25 fue la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH), la cual puede intervenir en la replicación y/o movimiento de algunos virus (Dollenmaier y Weitz, 2003; Wang y Nagy, 2008). Del mismo modo, algunos factores de transcripción como EF1A también intervienen en la replicación viral (Zenko *et al.*, 2002; Matsuda y Dreher, 2004;

Yamagi *et al.*, 2006; Sasvari *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2015), por lo que la posible interacción detectada para ambas p25 también sugeriría la implicación de este factor en la replicación de CTV. No obstante, en el caso de p25-T36 se detectó un mayor número de factores de elongación e iniciación, por lo que la capacidad de traducción de este aislado podría verse favorecida frente a T318A. Además de éstas, las posibles interacciones detectadas con distintas subunidades ribosomales por parte de p25-T36, también incrementarían la eficacia a la hora de traducir las proteínas virales de este aislado. En este sentido, cabría destacar también la posible interacción de p25-T36 con la histona 2B (H2B), lo que regularía la expresión de ciertos genes del huésped, tal y como se ha visto con la interacción de la proteína AL1 de geminivirus con la histona H3 (Bass *et al.*, 2000).

Otras proteínas de la familia de las ATP sintasas, implicadas en mecanismos de defensa frente a virus (Bhat *et al.*, 2012) o indicadoras de interacciones o infecciones compatibles (Huang *et al.*, 2016), se han detectado como posibles proteínas interactoras de p25-T36. Esta interacción diferencial se correlacionaría con una mayor capacidad de este aislado para infectar *N. benthamiana* debido a dos acciones fundamentales: por un lado la interacción compatible entre CTV y este huésped, y por otro la inhibición de esta ruta de defensa, facilitando la infección. Otras proteínas interactoras de ambas p25 relacionadas con la defensa de la planta fueron las de la familia GLP, encargadas de generar H₂O₂ como molécula señalizadora para inducir la muerte celular o un mayor revestimiento de la pared celular (Yamahara *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2004; Laloi *et al.*, 2004) frente a infecciones virales. En cambio, solo p25-T36 mostró posibles interacciones con un mayor número de proteínas de la familia de la glutatión S transferasa (GST), actuando algunas de ellas como marcadores de respuesta defensiva temprana (Perl-Treves *et al.*, 2004), lo que podría sugerir que esta interacción inhibiría esta ruta de defensa, ayudando al aislado T36 a infectar la célula. Por otra parte, las posibles interacciones de p25-T318A con proteínas relacionadas con la patogénesis como PR4 o la THX9, encargadas de activar la respuesta hipersensible y de modular la inmunidad de la planta, respectivamente (Tada *et al.*, 2008; Guevara-Morato *et al.*, 2010), podrían causar la imposibilidad de este aislado de llevar a cabo una infección compatible.

En cuanto a proteínas relacionadas con el movimiento viral intracelular, se encontraron diferencias respecto a ambas p25. Así, p25-T36 sería capaz de interactuar con un mayor número de proteínas del citoesqueleto, tanto estructurales (actina y tubulina) como de organización/desorganización (diversos factores ADF), lo que favorecería el movimiento tanto intracelular como sistémico de este aislado de CTV en *N. benthamiana*, tal y como se ha visto en el caso del virus del mosaico de la haba de soja (SMV) (Lu *et al.*, 2015). Asimismo, la posible interacción de p25-T36 con distintas acuaporinas también facilitaría el movimiento del aislado T36 en este huésped debido a la capacidad de estas proteínas de regular la organización de la actina.

El papel de las HSP durante las infecciones virales resulta esencial debido a su implicación en procesos como la replicación, el ensamblaje del virión, el movimiento intracelular o la formación del complejo RISC durante el silenciamiento génico mediado por RNA (Mayer, 2005; Smith *et al.*, 2009). Así, la posible interacción de p25 con este tipo de proteínas, sobretodo en el caso de p25-T36, podrían favorecer la eficacia de distintas etapas del ciclo biológico de este aislado de CTV, al igual que sucede en el caso de otros virus de plantas (Mine *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). Además, la interacción de la CP de CTV con este tipo de proteínas también produciría las alteraciones observadas en los cloroplastos durante las infecciones naturales.

Otra aproximación que permite el estudio de las interacciones entre CTV y su huésped es la evolución del virus en un huésped no natural, como la especie *N. benthamiana*. De esta manera, se puede determinar la estabilidad genética de sus poblaciones, los cambios genómicos que se producen a lo largo del tiempo de evolución, y determinar qué genes sufren cambios potencialmente adaptativos porque requieren una mayor interacción con las proteínas del huésped para incrementar la eficacia biológica del virus en este nuevo hospedador. Bajo esta premisa, se abordó un estudio de evolución experimental por pases seriados mediante injerto utilizando dos linajes del aislado T36 de CTV (con o sin GFP). Las poblaciones virales de dichos linajes se adaptaron de forma progresiva a este huésped herbáceo, lo que se reflejó en un aumento en la tasa de prendimiento de injertos y en la tasa neta de infectividad con el número de pases, todo ello acompañado por un

adelanto en la aparición de los síntomas característicos. Es importante destacar que en ambos linajes evolucionados se obtuvieron resultados similares, lo que apoya claramente un proceso de evolución convergente. En experimentos de evolución similares llevados a cabo con otros virus de plantas como el potivirus de la sharka (PPV) o el virus del grabado del tabaco (TEV) en diferentes huéspedes (Wallis *et al.*, 2007; Agudelo-Romero *et al.*, 2008; Bedhomme *et al.*, 2012), los procesos adaptativos a nuevos huéspedes también se vieron acompañados de cambios fenotípicos relacionados con un aumento en la eficacia biológica del virus.

En el caso de nuestro experimento de evolución con CTV, dichos cambios fenotípicos se correlacionaron, además con el adelanto en la inducción de síntomas, con un aumento neto progresivo del título viral y un cambio en los perfiles y acumulación de siRNAs detectados, que se asemejaron más en los últimos pases evolutivos a los detectados en cítricos sensibles infectados por CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Este último hecho sugiere un aumento en la capacidad de interacción con mayor éxito de los supresores del silenciamiento con las proteínas del nuevo huésped encargadas de la defensa antiviral. A nivel molecular, todo esto se reflejaba en un conjunto de mutaciones acumuladas de forma progresiva en dos regiones calientes del genoma centradas en una región de la poliproteína y en el supresor del silenciamiento p23. Estas sustituciones que se iban fijando en las poblaciones virales a medida que avanzaba el experimento, podrían ser consideradas potencialmente adaptativas y favorecer su interacción con las proteínas de *N. benthamiana*. Un hecho importante en este sentido es que, gran parte de las mutaciones encontradas eran comunes a ambos linajes, mostrando así sucesos de convergencia evolutiva que suelen resultar de procesos de adaptación al nuevo huésped. Mutaciones adaptativas de este tipo también se han detectado en estudios de evolución llevados a cabo con el virus de la rotura de la flor del pelargonium (PFBV), con TEV o con PPV (Rico *et al.*, 2006; Calvo *et al.*, 2013; Carbonell *et al.*, 2013; Hillung *et al.*, 2015).

La adaptación de los virus CTV-NB se reflejó a la hora de inocular estas poblaciones evolucionadas de regreso a cítricos, en los que se observó un retraso en la capacidad de infección inicial conforme más evolucionados estaban los virus, e independientemente del linaje inoculado. Además, la acumulación

viral también se vio afectada durante los dos primeros años en cítricos, aunque aumentó de forma progresiva a medida que CTV se re-adaptaba al huésped natural, especialmente para las poblaciones procedentes de P11. En este sentido, el P5 fue el más afectado, ya que acumuló mutaciones en la región más próxima al extremo 5' que no se detectaron en pasajes posteriores, provocando una disminución considerable en la acumulación a lo largo de los tres años de estudio en cítricos.

La caracterización biológica de las poblaciones evolucionadas de CTV en cítricos indicadores no muestra diferencias en el tipo de tejidos infectados por CTV, que se localiza exclusivamente en células floemáticas como el virus salvaje (Ambrós *et al.*, 2013). Sin embargo, la acumulación de mutaciones potencialmente adaptativas en las poblaciones virales evolucionadas en *N. benthamiana* si parecía afectar a la capacidad inicial de infección de huéspedes sensibles por inoculación mecánica. Así, inicialmente sólo se consiguió una tasa de infectividad del 100% en huéspedes parcialmente resistentes como pomelo o naranjo amargo. Sin embargo, al cabo de 1 mpi, las poblaciones CTV-NB más evolucionadas de P11 recuperan su capacidad infecciosa. Por otra parte, el título viral en las poblaciones virales CTV-NB de regreso a cítricos era menor cuanto mayor eran los pasajes evolutivos. Sin embargo, a lo largo de los dos primeros años de evolución en cítricos las poblaciones derivadas de P11 recuperaron niveles de acumulación similares a las del virus salvaje, mientras que las de P5, que contenían originalmente más cambios en la región de la poliproteína, no lo hicieron. Estos hechos indican un fenómeno de re-adaptación de los virus CTV-NB de nuevo a su huésped natural con el tiempo. Ello lo apoya el análisis molecular de las poblaciones virales a lo largo de los tres años de evolución posterior en cítricos. A lo largo de este tiempo se pierden progresivamente las sustituciones acumuladas en las secuencias de CTV-NB, revirtiendo a la secuencia original de T36 de cítricos. Dicha pérdida se acelera durante el primer año y para el P11 más que para el P5, y al final de los tres años la secuencia consenso del genoma del virus ha revertido por completo a la del virus original de cítricos.

Por tanto, se podría concluir que las mutaciones que aumentan la eficacia biológica de CTV en *N. benthamiana*, y que favorecen las interacciones con las proteínas de este huésped,

inducen una disminución de la misma en el huésped natural, o sea tienen un cierto coste adaptativo. Este hecho también quedó patente en la inducción de síntomas en cítricos indicadores, de manera que los virus más evolucionados de P11 inducen una sintomatología más suave en determinados huéspedes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La localización subcelular de las proteínas supresoras del silenciamiento génico p20 y p25 de CTV coincide en el huésped experimental *N. benthamiana* y en el natural, cítricos.
- 2) La proteína p20 de los aislados T36, T318A y T385 de CTV se localiza en el citosol y núcleo celular, especialmente en regiones perinucleares o asociadas a la membrana del RE. Su acumulación en inclusiones nucleares puntuales podría asociarse a vesículas intermediarias en la maduración y/o movimiento de otros orgánulos nucleares o de las RNPs. La co-expresión de p20-GFP con el marcador nucleolar de fibrilarina sugiere su interacción con ésta *in planta*, y provoca su redistribución a regiones asociadas a membrana. Dicha localización podría determinar su acción supresora intracelular regulando diversos procesos nucleares, su acción patogénica y el movimiento sistémico del virus.
- 3) La CP de CTV tiene una localización subcelular diferencial según el aislado: mientras la p25 de los aislados T36 y T385 se localiza en el núcleo, la del aislado severo T318A es citosólica. La localización diferencial de estas p25 se mantiene *in vivo* en el huésped herbáceo en un contexto de infección viral.
- 4) La localización de p25 está regulada por la región Nt de la proteína, sin detectarse ninguna señal de localización nuclear NLS. El polimorfismo de secuencia de la posición aminoacídica 31, una valina (V) en aislados como T36 y T385 y una leucina (L) en los más agresivos como T318A, es clave para dicha localización. El residuo Leu31 forma parte de una señal de exportación nuclear del tipo NES rica en leucinas, compuesta por leucinas y un motivo rico en aminoácidos hidrofóbicos. La NES sólo es funcional en la p25 de T318A y regula su exportación nuclear. Un único cambio Val31 a Leu31, o viceversa, en las p25 de ambos

aislados es suficiente para inducir el cambio de localización del núcleo al citosol o a la inversa. Un clon de longitud completa de T36-GFP con la mutación Val31Leu en su p25 no es funcional en planta y tiene una capacidad de infección limitada a pocas células, similar a la del clon agroinfectioso de T318A. Adicionalmente, otros residuos de la p25, como los de las posiciones 20-21 o el motivo rico en aminoácidos hidrofóbicos de la región 64 a 74, también parecen regular la localización de p25.

- 5) La proteína p25 de CTV actúa como supresor de silenciamiento débil a larga distancia en *N. benthamiana*. Dicha capacidad es ligeramente superior para la p25 de T36 que para la de los aislados T318A o T385.
- 6) La proteína p20 de CTV actúa como determinante de patogenicidad en *N. benthamiana* durante una infección viral heteróloga, acentúa la intensidad de los síntomas virales inducidos por PVX y causa la muerte rápida de la planta de forma similar a p23. Dicha patogenicidad es diferencial según el aislado, y los síntomas más acusados los induce la p20 de T36. La intensificación de los síntomas se correlaciona con la mayor acumulación de los gRNA y sgRNAs de PVX, y la detección de siRNAs de 21-22 nt. Por el contrario, la p25 no es un determinante de patogenicidad. La detección de siRNAs predominantemente de 24 nt en las infecciones inducidas por los virus PVX-p25 en *N. benthamiana*, sugiere como mecanismo de supresión su posible interacción con AGO4.
- 7) El interactoma obtenido para la p25 de los aislados T36 y T318A con las proteínas del huésped *N. benthamiana* muestra diferencias importantes. Mientras que el de p25-T36 es mucho más complejo y diverso, el de p25-T318A se reduce a unos pocos procesos metabólicos.
- 8) Los procesos metabólicos en los que intervienen las posibles proteínas interactoras de p25-T36 incluyen la fotosíntesis, actividad redox, homeostasis y transporte

celular, biosíntesis y degradación de proteínas, unión a proteínas de plastidios y ácidos nucleicos, respuesta al estrés, metilación, señalización por ROS y proteínas HSP. Por otra parte, los interactores de p25-T318A están implicados en transporte/localización, respuesta a estrés, apoptosis, patogénesis y proteínas HSP, de unión a calcio y redoxinas.

- 9) Ambas p25 también comparten interactores, principalmente relacionados con componentes de los fotosistemas I y II, de la estructura del citoesqueleto (actinas y tubulinas), diferentes co-chaperonas y el factor de elongación eEF1. No obstante, p25-T36 también interaccionaría de forma diferencial con factores de despolimerización de actina, con determinadas subunidades de ATP sintasas de orgánulos, con acuaporinas y con proteínas nucleares de regulación de la transcripción o del proteasoma. Gran parte de estos interactores resultan esenciales en infecciones por otros virus de plantas y podrían explicar el comportamiento diferencial de los aislados T36 y T318A en *N. benthamiana*.
- 10) La evolución experimental de dos linajes de CTV por pases seriados en *N. benthamiana*, se ha optimizado mediante injertos y pre-tratando las plantas con un supresor de silenciamiento. Dicha evolución conlleva: un aumento del prendimiento de injertos, de la tasa neta de infectividad de las plantas inoculadas y del título viral, fenómenos que se correlacionan positivamente con el aumento en el número de pases. Los virus evolucionados inducen, además, un adelanto significativo de los síntomas en esta especie herbácea comparado con el virus salvaje. Todo ello implica un aumento en la eficacia biológica del virus en este nuevo huésped.
- 11) Poblaciones evolucionadas de pases avanzados infectan directamente *N. benthamiana* por inoculación mecánica sin un tratamiento previo. Sus tasas de infectividad sistémica se correlacionan con el número de pases: los virus más

evolucionados de P11 son más eficaces, lo que apoya su mejor adaptación al huésped.

- 12) La acumulación de siRNAs en plantas infectadas con los virus CTV-NB aumenta a lo largo de los pases evolutivos, y su perfil se enriquece en siRNAs de menor tamaño. Esta situación es similar a la de cítricos infectados por CTV, un hecho que apoyaría la adaptación de sus proteínas supresoras a *N. benthamiana*.
- 13) Ambos linajes CTV-NB evolucionan de forma similar y muestran convergencias que se reflejan a nivel molecular. Las poblaciones del primer pase son estables genéticamente, pero en pases posteriores acumulan numerosas mutaciones, sinónimas y no-sinónimas, concentradas en una región de la poliproteína y en el gen *p23*. La mayoría de éstas aparecen y se fijan a partir de P6 y se mantienen en las poblaciones finales de ambos linajes de forma convergente. Tres de estos cambios, potencialmente adaptativos, se localizan en la poliproteína, y cinco en el gen *p23*, aunque ninguno afecta a los dominios funcionales conservados de dichas proteínas.
- 14) Las filogenias de las poblaciones virales de ambos linajes reflejan su historia evolutiva y los sucesos de convergencia evolutiva. La estructura de las cuasiespecies virales de *p23* en P9G y P11G revela que éstas siguen el concepto de “memoria de cuasiespecies”, de forma que la variante ancestral de T36 salvaje es retenida en la población como un genoma minoritario.
- 15) El análisis de la presión selectiva muestra dos posiciones en la poliproteína y tres en *p23* sometidas a selección negativa, aunque sólo las segundas se mantienen hasta el último pase. En general, la evolución observada sigue procesos de selección purificadora asociados a la acumulación de mutaciones sinónimas.

- 16) En las poblaciones más evolucionadas de P11 se detectan un conjunto de sustituciones *de novo* en los genes *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* y *p20*, y en los extremos 5' y 3'-UTR.
- 17) Virus evolucionados de P4, P5 y P11 son menos infecciosos, inicialmente, por inoculación mecánica de regreso a cítricos, y tienen un título viral menor que el virus parental durante el primer año. Los virus de P11 recuperan mejor su capacidad infecciosa y alcanzan tasas de infectividad y títulos tan elevados como los del virus salvaje durante los dos años posteriores. Este hecho indica la re-adaptación de estos virus al huésped cítrico.
- 18) Los virus de P5 infectan peor por injerto los huéspedes CM, LM y AM, mientras que los de P11 son menos patogénicos en los huéspedes resistentes AM y POM e inducen síntomas más suaves de SY y enanismo.
- 19) La re-adaptación de los virus evolucionados CTV-NB a cítricos, se refleja a nivel molecular en la pérdida progresiva de las mutaciones adquiridas en el huésped herbáceo a lo largo de tres años de evolución en cítricos. Dicha pérdida es más rápida durante el primer año y para los virus del P11, comparada con la del P5.
- 20) Al cabo de tres años de evolución de regreso a cítricos, la secuencia consenso de las poblaciones virales revierte por completo a la del virus salvaje T36 de cítricos, que representaría la más eficaz biológicamente en el huésped natural.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aarts, N., M. Metz, E. Holub, B. J. Staskawicz, M. J. Daniels and J. E. Parker (1998). "Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(17): 10306-10311.

Adenot, X., T. Elmayan, D. Lauressergues, S. Boutet, N. Bouché, V. Gascioli and H. Vaucheret (2006). "DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7." Curr Biol **16**(9): 927-932.

Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198.

Agbeci, M., R. Grangeon, R. S. Nelson, H. Zheng and J.-F. Laliberté (2013). "Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus." PLoS pathogens **9**(10): e1003683.

Agranovsky, A. (1996). "Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: over the barriers." Advances in virus research **47**: 119-158.

Agudelo-Romero, P., P. Carbonell, M. A. Perez-Amador and S. F. Elena (2008). "Virus adaptation by manipulation of host's gene expression." PLoS One **3**(6): e2397.

Aguilar, E., D. Almendral, L. Allende, R. Pacheco, B. N. Chung, T. Canto and F. Tenllado (2015). "The P25 protein of Potato virus X (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms." Journal of virology **89**(4): 2090-2103.

Ahlquist, P., A. O. Noueir, W.-M. Lee, D. B. Kushner and B. T. Dye (2003). "Host factors in positive-strand RNA virus genome replication." Journal of virology **77**(15): 8181-8186.

Akbergenov, R., A. Si-Ammour, T. Blevins, I. Amin, C. Kutter, H. Vanderschuren, P. Zhang, W. Grisse, F. Meins and T. Hohn (2006). "Molecular characterization of geminivirus-derived small

RNAs in different plant species." Nucleic acids research **34**(2): 462-471.

Albertini, D., R. Vogel, C. Bové and J. Bové (1988). Transmission and preliminary characterization of citrus tristeza virus strain K. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists.

Albiach-Martí, M. R., J. W. Grosser, S. Gowda, M. Mawassi, T. Satyanarayana, S. M. Garnsey and W. O. Dawson (2004). "Citrus tristeza virus replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives." Molecular Breeding **14**(2): 117-128.

Albiach-Martí, M. R., M. Mawassi, S. Gowda, T. Satyanarayana, M. E. Hilf, S. Shanker, E. C. Almira, M. C. Vives, C. López and J. Guerri (2000). "Sequences of citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical." Journal of virology **74**(15): 6856-6865.

ALBIACH-MARTI, M. R., C. Robertson, S. Gowda, S. Tatineni, B. Belliure, S. M. Garnsey, S. Y. Folimonova, P. Moreno and W. O. Dawson (2010). "The pathogenicity determinant of Citrus tristeza virus causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome." Molecular plant pathology **11**(1): 55-67.

Allen, T. D., J. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva and M. W. Goldberg (2000). "The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm." J Cell Sci **113**(10): 1651-1659.

Alzhanova, D. V., Y. Hagiwara, V. V. Peremyslov and V. V. Dolja (2000). "Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus." Virology **268**(1): 192-200.

Alzhanova, D. V., A. J. Napuli, R. Creamer and V. V. Dolja (2001). "Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog." The EMBO journal **20**(24): 6997-7007.

- Amari, K., M. Di Donato, V. V. Dolja and M. Heinlein (2014). "Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus." PLoS pathogens **10**(10): e1004448.
- Ambrós, S., C. El-Mohtar, S. Ruiz-Ruiz, L. Peña, J. Guerri, W. O. Dawson and P. Moreno (2011). "Agroinoculation of Citrus tristeza virus causes systemic infection and symptoms in the presumed nonhost *Nicotiana benthamiana*." Molecular plant-microbe interactions **24**(10): 1119-1131.
- Ambrós, S., S. Ruiz-Ruiz, L. Peña and P. Moreno (2013). "A genetic system for citrus tristeza virus using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: an update."
- Anandalakshmi, R., R. Marathe, X. Ge, J. Herr, C. Mau, A. Mallory, G. Pruss, L. Bowman and V. B. Vance (2000). "A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants." Science **290**(5489): 142-144.
- Andika, I. B., K. Maruyama, L. Sun, H. Kondo, T. Tamada and N. Suzuki (2015). "Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against potato virus X in leaves and roots." The Plant Journal **81**(5): 781-793.
- Anelli, T. and R. Sitia (2008). "Protein quality control in the early secretory pathway." The EMBO journal **27**(2): 315-327.
- Arregui, J., J. Ballester, L. Navarro and J. Pina (1982). Effect of soil mix and fertilization on growth of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) seedlings grown in greenhouse. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Agrícola.
- Ashby, J., E. Boutant, M. Seemanpillai, A. Sambade, C. Ritzenthaler and M. Heinlein (2006). "Tobacco mosaic virus movement protein functions as a structural microtubule-associated protein." Journal of virology **80**(17): 8329-8344.
- Asins, M. J., G. P. Bernet, C. Ruiz, M. Cambra, J. Guerri and E. A. Carbonell (2004). "QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction." Theor Appl Genet **108**(4): 603-611.

Aubert, B. and C. Bove (1984). "Mild and severe strains of citrus tristeza virus in Reunion Island."

Austin, M. J., P. Muskett, K. Kahn, B. J. Feys, J. D. Jones and J. E. Parker (2002). "Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses." Science **295**(5562): 2077-2080.

Ayllón, M., C. López, J. Navas-Castillo, S. Garnsey, J. Guerri, R. Flores and P. Moreno (2001). "Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity." Archives of Virology **146**(1): 27-40.

Ayllón, M. A., S. Gowda, T. Satyanarayana, A. V. Karasev, S. Adkins, M. Mawassi, J. Guerri, P. Moreno and W. O. Dawson (2003). "Effects of modification of the transcription initiation site context on Citrus tristeza virus subgenomic RNA synthesis." Journal of virology **77**(17): 9232-9243.

Ayllón, M. A., L. Rubio, A. Moya, J. Guerri and P. Moreno (1999). "The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission." Virology **255**(1): 32-39.

Ayllón, M. A., L. Rubio, V. Sentandreu, A. Moya, J. Guerri and P. Moreno (2006). "Variations in two gene sequences of Citrus tristeza virus after host passage." Virus genes **32**(2): 119-128.

Ayllón, M. a. A., S. Gowda, T. Satyanarayana and W. O. Dawson (2004). "cis-acting elements at opposite ends of the Citrus tristeza virus genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs." Virology **322**(1): 41-50.

Azevedo, C., A. Sadanandom, K. Kitagawa, A. Freialdenhoven, K. Shirasu and P. Schulze-Lefert (2002). "The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance." Science **295**(5562): 2073-2076.

Azevedo, J., D. Garcia, D. Pontier, S. Ohnesorge, A. Yu, S. Garcia, L. Braun, M. Bergdoll, M. A. Hakimi and T. Lagrange (2010). "Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis

caused by a pathogen-encoded GW repeat protein." Genes & development **24**(9): 904-915.

Bak, A. and S. Y. Folimonova (2015). "The conundrum of a unique protein encoded by citrus tristeza virus that is dispensable for infection of most hosts yet shows characteristics of a viral movement protein." Virology **485**: 86-95.

BALLESTER-OLMOS, J., J. Pina, E. Carbonell, P. Moreno, A. H. MENDOZA, M. Cambra and L. Navarro (1993). "Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain." Plant Pathology **42**(2): 219-229.

Ballut, L., M. Drucker, M. Pugniere, F. Cambon, S. Blanc, F. Roquet, T. Candresse, H.-P. Schmid, P. Nicolas and O. Le Gall (2005). "HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities." Journal of General Virology **86**(9): 2595-2603.

Bar-Joseph, M. and R. Lee (1989). "Citrus tristeza virus." AAB descriptions of plant viruses **353**(7).

Bar-Joseph, M. and G. Loebenstein (1973). "Effects of strain, source plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid." Phytopathology **63**(6): 716-720.

Bar-Joseph, M., G. Loebenstein and J. Cohen (1970). "Partial purification of viruslike particles associated with the Citrus tristeza disease." Phytopathology **60**(1): 75-78.

Bar-Joseph, M., G. Loebenstein and J. Cohen (1972). "Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease." Virology **50**(3): 821-828.

Bar-Joseph, M., R. Marcus and R. F. Lee (1989). "The continuous challenge of citrus tristeza virus control." Annual review of phytopathology **27**(1): 291-316.

Bar-Joseph, M. and M. Mawassi (2013). "The defective RNAs of Closteroviridae." Frontiers in microbiology **4**.

Bar-Joseph, M. and Y. Nitzan (1991). The spread and distribution of citrus tristeza virus isolates in sour orange seedlings. Proc. 11th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.

Barbarossa, L. and V. Savino (2006). "Sensitive and Specific Digoxigenin-labelled RNA Probes for Routine Detection of Citrus tristeza virus by Dot-blot Hybridization." Journal of Phytopathology **154**(6): 329-335.

Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Bartels, M., R. French, R. A. Graybosch and S. Tatineni (2016). "Triticum mosaic virus exhibits limited population variation yet shows evidence of parallel evolution after replicated serial passage in wheat." Virology **492**: 92-100.

Bass, H. W., S. Nagar, L. Hanley-Bowdoin and D. Robertson (2000). "Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells." J Cell Sci **113**(7): 1149-1160.

Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature **431**(7006): 356.

Baumberger, N. and D. C. Baulcombe (2005). "Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11928-11933.

Baumberger, N., C.-H. Tsai, M. Lie, E. Havecker and D. C. Baulcombe (2007). "The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation." Current Biology **17**(18): 1609-1614.

- Bayne, E. H., D. V. Rakitina, S. Y. Morozov and D. C. Baulcombe (2005). "Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing." The Plant Journal **44**(3): 471-482.
- Beachy, R. N., S. Loesch-Fries and N. E. Tumer (1990). "Coat protein-mediated resistance against virus infection." Annual review of phytopathology **28**(1): 451-472.
- Bedhomme, S., J. Hillung and S. F. Elena (2015). "Emerging viruses: why they are not jacks of all trades?" Current opinion in virology **10**: 1-6.
- Bedhomme, S., G. Lafforgue and S. F. Elena (2012). "Multihost experimental evolution of a plant RNA virus reveals local adaptation and host-specific mutations." Molecular biology and evolution **29**(5): 1481-1492.
- Belshaw, R., O. G. Pybus and A. Rambaut (2007). "The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses." Genome research **17**(10): 1496-1504.
- BEN-ZE'EV, I., M. BAR-JOSEPH, Y. Nitzan and R. Marcus (1989). "A severe citrus tristeza virus isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy." Annals of applied biology **114**(2): 293-300.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.
- Bertolini, E., A. Moreno, N. Capote, A. Olmos, A. de Luis, E. Vidal, J. Pérez-Panadés and M. Cambra (2008). "Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR." European Journal of Plant Pathology **120**(2): 177-188.
- Bhat, S., S. Y. Folimonova, A. B. Cole, K. D. Ballard, Z. Lei, B. S. Watson, L. W. Sumner and R. S. Nelson (2013). "Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement." Plant physiology **161**(1): 134-147.
- Bhattacharjee, S., A. Zamora, M. T. Azhar, M. A. Sacco, L. H. Lambert and P. Moffett (2009). "Virus resistance induced by NB-

LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control." The Plant Journal **58**(6): 940-951.

Bieri, S., S. Mauch, Q.-H. Shen, J. Peart, A. Devoto, C. Casais, F. Ceron, S. Schulze, H.-H. Steinbiß and K. Shirasu (2004). "RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance." The Plant Cell **16**(12): 3480-3495.

Biswas, K., A. Tarafdar, S. Diwedi and R. Lee (2012). "Distribution, genetic diversity and recombination analysis of Citrus tristeza virus of India." Virus genes **45**(1): 139-148.

Biswas, K. K., A. Tarafdar and S. K. Sharma (2012). "Complete genome sequence of mandarin decline Citrus tristeza virus of the Northeastern Himalayan hill region of India: comparative analyses determine recombinant." Archives of virology **157**(3): 579-583.

Blevins, T., R. Rajeswaran, P. V. Shivaprasad, D. Beknazariants, A. Si-Ammour, H.-S. Park, F. Vazquez, D. Robertson, F. Meins and T. Hohn (2006). "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing." Nucleic acids research **34**(21): 6233-6246.

Boevink, P. and K. J. Oparka (2005). "Virus-host interactions during movement processes." Plant Physiology **138**(4): 1815-1821.

Bologna, N. G. and O. Voinnet (2014). "The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis." Annual review of plant biology **65**: 473-503.

Bonnet, J., A. Fraile, S. Sacristán, J. M. Malpica and F. García-Arenal (2005). "Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus." Virology **332**(1): 359-368.

Bortolamiol, D., M. Pazhouhandeh, K. Marrocco, P. Genschik and V. Ziegler-Graff (2007). "The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing." Current Biology **17**(18): 1615-1621.

- Bortolamiol, D., M. Pazhouhandeh and V. Ziegler-Graff (2008). "Viral suppression of RNA silencing by destabilization of ARGONAUTE 1." Plant signaling & behavior **3**(9): 657-659.
- Boulo, S., H. Akarsu, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2007). "Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes." Virus research **124**(1): 12-21.
- Boutet, S., F. Vazquez, J. Liu, C. Béclin, M. Fagard, A. Gratias, J. B. Morel, P. Crété, X. Chen and H. Vaucheret (2003). "Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance." Curr Biol **13**(10): 843-848.
- Bové, C., R. Vogel, D. Albertini and J. Bové (1988). Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV, Riverside, CA.
- Boyko, V. P., A. V. Karasev, A. A. Agranovsky, E. V. Koonin and V. V. Dolja (1992). "Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(19): 9156-9160.
- Bremner, K., L. Seymour and C. Pouton (2001). "Harnessing nuclear localization pathways for transgene delivery." Current opinion in molecular therapeutics **3**(2): 170-177.
- Brigneti, G., O. Voinnet, W. X. Li, L. H. Ji, S. W. Ding and D. C. Baulcombe (1998). "Retracted: Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*." The EMBO journal **17**(22): 6739-6746.
- Briones, C. and E. Domingo (2008). "Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications." AIDS rev **10**(2): 93-109.
- Briones, C., E. Domingo and C. Molina-París (2003). "Memory in retroviral quasispecies: experimental evidence and theoretical model for human immunodeficiency virus." Journal of molecular biology **331**(1): 213-229.

Bukau, B., J. Weissman and A. Horwich (2006). "Molecular chaperones and protein quality control." Cell **125**(3): 443-451.

Bull, J., M. Badgett, H. A. Wichman, J. P. Huelsenbeck, D. M. Hillis, A. Gulati, C. Ho and I. Molineux (1997). "Exceptional convergent evolution in a virus." Genetics **147**(4): 1497-1507.

Calvo, M., T. Malinowski and J. A. García (2014). "Single amino acid changes in the 6K1-CI region can promote the alternative adaptation of Prunus-and Nicotiana-propagated Plum pox virus C isolates to either host." Molecular Plant-Microbe Interactions **27**(2): 136-149.

Cambra, M., E. Camarasa, M. Gorris, S. Garnsey and E. Carbonell (1991). Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.

Cambra, M., S. Garnsey, T. Permar, C. Henderson, D. Gumpf and C. Vela (1990). "Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies." Phytopathology **80**: 1034.

Cambra, M., P. Moreno and L. Navarro (1979). "Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-sandwich." Ann. INIA, Ser. Prot. Veg **12**: 115-125.

Carbonell, A. and J. C. Carrington (2015). "Antiviral roles of plant ARGONAUTES." Current opinion in plant biology **27**: 111-117.

Carbonell, A., N. Fahlgren, H. Garcia-Ruiz, K. B. Gilbert, T. A. Montgomery, T. Nguyen, J. T. Cuperus and J. C. Carrington (2012). "Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants." The Plant cell **24**(9): 3613-3629.

Carbonell, A., V. I. Maliogka, J. d. J. Pérez, B. Salvador, D. S. León, J. A. García and C. Simón-Mateo (2013). "Diverse amino acid changes at specific positions in the N-terminal region of the coat protein allow Plum pox virus to adapt to new hosts." Molecular Plant-Microbe Interactions **26**(10): 1211-1224.

- Carr, J. P., M. G. Lewsey and P. Palukaitis (2010). "Signaling in induced resistance." Advances in virus research **76**: 57-121.
- Carrington, J. C., K. D. Kasschau, S. K. Mahajan and M. C. Schaad (1996). "Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants." The Plant Cell **8**(10): 1669.
- Cañizares, M. C., J. Navas-Castillo and E. Moriones (2008). "Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus." Virology **379**(1): 168-174.
- Chanda, B., Y. Xia, M. K. Mandal, K. Yu, K. T. Sekine, Q. M. Gao, D. Selote, Y. Hu, A. Stromberg, D. Navarre, A. Kachroo and P. Kachroo (2011). "Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants." Nat Genet **43**(5): 421-427.
- Chao, J. A., J. H. Lee, B. R. Chapados, E. W. Debler, A. Schneemann and J. R. Williamson (2005). "Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2." Nature structural & molecular biology **12**(11): 952.
- Chare, E. and E. Holmes (2006). "A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses." Archives of virology **151**(5): 933-946.
- Chare, E. R. and E. C. Holmes (2004). "Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission." Journal of General Virology **85**(10): 3149-3157.
- Chaturvedi, R., K. Krothapalli, R. Makandar, A. Nandi, A. A. Sparks, M. R. Roth, R. Welti and J. Shah (2008). "Plastid ω 3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid." The Plant Journal **54**(1): 106-117.
- Che, X., W. O. Dawson and M. Bar-Joseph (2003). "Defective RNAs of Citrus tristeza virus analogous to Crinivirus genomic RNAs." Virology **310**(2): 298-309.

Che, X., M. Mawassi and M. Bar-Joseph (2002). "A novel class of large and infectious defective RNAs of Citrus tristeza virus." Virology **298**(1): 133-145.

Chelsky, D., R. Ralph and G. Jonak (1989). "Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus." Molecular and cellular biology **9**(6): 2487-2492.

Cheng, C.-W., Y.-Y. Hsiao, H.-C. Wu, C.-M. Chuang, J.-S. Chen, C.-H. Tsai, Y.-H. Hsu, Y.-C. Wu, C.-C. Lee and M. Meng (2009). "Suppression of Bamboo mosaic virus accumulation by a putative methyltransferase in *Nicotiana benthamiana*." Journal of virology **83**(11): 5796-5805.

Cheng, X.-f., X.-y. Wu, H.-z. Wang, Y.-q. Sun, Y.-s. Qian and L. Luo (2012). "High codon adaptation in citrus tristeza virus to its citrus host." Virology journal **9**(1): 113.

Chiba, S., K. Hleibieh, A. Delbianco, E. Klein, C. Ratti, V. Ziegler-Graff, S. Bouzoubaa and D. Gilmer (2013). "The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity." Molecular Plant-Microbe Interactions **26**(2): 168-181.

Chitwood, D. H. and M. C. Timmermans (2010). "Small RNAs are on the move." Nature **467**(7314): 415.

CHIU, M. H., I. Chen, D. C. Baulcombe and C. H. TSAI (2010). "The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway." Molecular plant pathology **11**(5): 641-649.

Cho, S.-Y., W. K. Cho, H.-S. Choi and K.-H. Kim (2012). "Cis-acting element (SL1) of Potato virus X controls viral movement by interacting with the NbMPB2Cb and viral proteins." Virology **427**(2): 166-176.

Christensen, A. B., H. Thordal-Christensen, G. Zimmermann, T. Gjetting, M. F. Lyngkjær, R. Dudler and P. Schweizer (2004). "The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and

is an important component of quantitative resistance in wheat and barley." Molecular Plant-Microbe Interactions **17**(1): 109-117.

Chung, B. Y.-W., W. A. Miller, J. F. Atkins and A. E. Firth (2008). "An overlapping essential gene in the Potyviridae." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(15): 5897-5902.

Cioce, M. and A. I. Lamond (2005). "Cajal bodies: a long history of discovery." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **21**: 105-131.

Clarke, D. K., E. A. Duarte, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo and J. Holland (1993). "Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses." Journal of Virology **67**(1): 222-228.

Cock, P. J., T. Antao, J. T. Chang, B. A. Chapman, C. J. Cox, A. Dalke, I. Friedberg, T. Hamelryck, F. Kauff and B. Wilczynski (2009). "Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics." Bioinformatics **25**(11): 1422-1423.

Codoñer, F. M., J.-A. Darós, R. V. Solé and S. F. Elena (2006). "The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens." PLoS Pathog **2**(12): e136.

Collier, S. M. and P. Moffett (2009). "NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens." Trends Plant Sci **14**(10): 521-529.

Costa, A. and G. Muller (1980). "Tristeza control by cross protection: a US-Brazil cooperative success." Plant disease **64**(6): 538-541.

Costa, A., G. MÜLLER and C. Costa (1968). Rearing the tristeza vector, Toxoptera citricida, on squash. CONFERENCE INTERNATIONAL OF THE ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS.

Csorba, T., A. Bovi, T. Dalmay and J. Burgyán (2007). "The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways." Journal of virology **81**(21): 11768-11780.

Csorba, T., L. Kontra and J. Burgyán (2015). "Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence." Virology **479**: 85-103.

Csorba, T., R. Lózsa, G. Hutvágner and J. Burgyán (2010). "Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1." The Plant Journal **62**(3): 463-472.

Csorba, T., V. Pantaleo and J. Burgyán (2009). "RNA silencing: an antiviral mechanism." Advances in virus research **75**: 35-230.

Cuellar, W. J., J. F. Kreuze, M.-L. Rajamäki, K. R. Cruzado, M. Untiveros and J. P. Valkonen (2009). "Elimination of antiviral defense by viral RNase III." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(25): 10354-10358.

Cuevas, J., A. Moya and S. Elena (2003). "Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments." Journal of evolutionary biology **16**(3): 456-466.

Culver, J. N. and M. S. Padmanabhan (2007). "Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time." Annu Rev Phytopathol **45**: 221-243.

d'Urso, F., M. Ayllón, L. Rubio, A. Sambade, A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri and P. Moreno (2000). "Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission." Plant Pathology **49**(2): 288-294.

Da Graca, J., L. Marais and L. Von Broembsen (1984). Severe tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. Proc. 9th Conf. IOCV.

Dalmay, T., A. Hamilton, S. Rudd, S. Angell and D. C. Baulcombe (2000). "An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus." Cell **101**(5): 543-553.

Dawson, W. O., M. Bar-Joseph, S. M. Garnsey and P. Moreno (2015). "Citrus tristeza virus: making an ally from an enemy." Annual review of phytopathology **53**: 137-155.

Dawson, W. O., S. M. Garnsey, S. Tatineni, S. Y. Folimonova, S. J. Harper and S. Gowda (2013). "Citrus tristeza virus-host interactions." Frontiers in microbiology **4**.

de Bianchi, S., L. Dall'Osto, G. Tognon, T. Morosinotto and R. Bassi (2008). "Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of Arabidopsis." The Plant Cell **20**(4): 1012-1028.

de la Iglesia, F. and S. F. Elena (2007). "Fitness declines in tobacco etch virus upon serial bottleneck transfers." Journal of virology **81**(10): 4941-4947.

de la Iglesia, F., F. Martínez, J. Hillung, J. M. Cuevas, P. J. Gerrish, J.-A. Daròs and S. F. Elena (2012). "Luria-Delbrück estimation of turnip mosaic virus mutation rate in vivo." Journal of virology **86**(6): 3386-3388.

de Mendoza, A. H., J. Ballester-Olmos and J. Pina (1988). "Comparative aphid transmission of a common citrus tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain."

del Toro, F., F. T. Fernández, J. Tilsner, K. M. Wright, F. Tenllado, B. N. Chung, S. Praveen and T. Canto (2014). "Potato virus Y HCPro localization at distinct, dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm." Molecular Plant-Microbe Interactions **27**(12): 1331-1343.

Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K. D. Kasschau, J. C. Carrington and O. Voinnet (2006). "Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense." Science **313**(5783): 68-71.

Delfosse, V. C., Y. C. Agrofoglio, M. F. Casse, I. B. Kresic, H. E. Hopp, V. Ziegler-Graff and A. J. Distéfano (2014). "The P0 protein encoded by cotton leafroll dwarf virus (CLRVDV) inhibits local but not systemic RNA silencing." Virus research **180**: 70-75.

Deng, Z., S. Huang, P. Ling, C. Yu, Q. Tao, C. Chen, M. Wendell, H.-B. Zhang and F. Gmitter Jr (2001). "Fine genetic mapping and BAC contig development for the citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.)." Molecular Genetics and Genomics **265**(4): 739-747.

Denison, M. R. (2008). "Seeking membranes: positive-strand RNA virus replication complexes." PLoS Biol **6**(10): e270.

Derrien, B., N. Baumberger, M. Schepetilnikov, C. Viotti, J. De Cillia, V. Ziegler-Graff, E. Isono, K. Schumacher and P. Genschik (2012). "Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(39): 15942-15946.

Di Carli, M., E. Benvenuto and M. Donini (2012). "Recent Insights into plant-virus interactions through proteomic analysis." Journal of proteome research **11**(10): 4765-4780.

Di Carli, M., M. E. Villani, L. Bianco, R. Lombardi, G. Perrotta, E. Benvenuto and M. Donini (2010). "Proteomic analysis of the plant-virus interaction in Cucumber mosaic virus (CMV) resistant transgenic tomato." Journal of proteome research **9**(11): 5684-5697.

Di Tullio, A., S. Reale and F. De Angelis (2005). "Molecular recognition by mass spectrometry." Journal of mass spectrometry **40**(7): 845-865.

Diaz, A., X. Wang and P. Ahlquist (2010). "Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(37): 16291-16296.

Ding, Q., L. Zhao, H. Guo and A. C. Zheng (2010). "The nucleocytoplasmic transport of viral proteins." Virologica Sinica **25**(2): 79-85.

Ding, S.-W. (2010). "RNA-based antiviral immunity." Nature reviews. Immunology **10**(9): 632.

Ding, S.-W. and O. Voinnet (2007). "Antiviral immunity directed by small RNAs." Cell **130**(3): 413-426.

Dingwall, C., J. Robbins, S. M. Dilworth, B. Roberts and W. D. Richardson (1988). "The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen." The Journal of cell biology **107**(3): 841-849.

Dodds, J., T. Jarupat, J. Lee and C. Roistacher (1987). "Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus." Phytopathology **77**(3): 442-447.

Dodds, J., R. Jordan, C. Roistacher and T. Jarupat (1987). "Diversity of citrus tristeza virus isolates indicated by dsRNA analysis." Intervirology **27**(4): 177-188.

Dodds, P. N. and J. P. Rathjen (2010). "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions." Nat Rev Genet **11**(8): 539-548.

Dolja, V. V., J. F. Kreuze and J. P. Valkonen (2006). "Comparative and functional genomics of closteroviruses." Virus research **117**(1): 38-51.

Dollenmaier, G. and M. Weitz (2003). "Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with secondary and tertiary RNA structural elements of the hepatitis A virus 3' translated and non-translated regions." Journal of general virology **84**(2): 403-414.

Domingo, E. (2000). "Viruses at the edge of adaptation." Virology **270**(2): 251-253.

Domingo, E. and J. Holland (1997). "RNA virus mutations and fitness for survival." Annual Reviews in Microbiology **51**(1): 151-178.

Domingo, E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza and A. Arias (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. Quasispecies: Concept and Implications for Virology, Springer: 51-82.

Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi and C. Weissmann (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." Cell **13**(4): 735-744.

Domingo, E., J. Sheldon and C. Perales (2012). "Viral quasispecies evolution." Microbiology and Molecular Biology Reviews **76**(2): 159-216.

Domínguez, A., A. H. de Mendoza, J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno and L. Peña (2002). "Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene." Molecular Breeding **10**(1-2): 1-10.

Donaire, L., D. Barajas, B. Martínez-García, L. Martínez-Priego, I. Pagán and C. Llave (2008). "Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs." Journal of virology **82**(11): 5167-5177.

Dong, X. (2004). "NPR1, all things considered." Current opinion in plant biology **7**(5): 547-552.

Dong, X., A. Biswas, K. E. Süel, L. K. Jackson, R. Martinez, H. Gu and Y. M. Chook (2009). "Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1." Nature **458**(7242): 1136.

dos Reis Figueira, A., S. Golem, S. P. Goregaoker and J. N. Culver (2002). "A nuclear localization signal and a membrane association domain contribute to the cellular localization of the Tobacco mosaic virus 126-kDa replicase protein." Virology **301**(1): 81-89.

Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth and J. F. Crow (1998). "Rates of spontaneous mutation." Genetics **148**(4): 1667-1686.

Du, Z., X. Zhou, Y. Ling, Z. Zhang and Z. Su (2010). "agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community." Nucleic acids research: gkq310.

Duan, C.-G., Y.-Y. Fang, B.-J. Zhou, J.-H. Zhao, W.-N. Hou, H. Zhu, S.-W. Ding and H.-S. Guo (2012). "Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein." The Plant Cell **24**(1): 259-274.

- Duarte, E., D. Clarke, A. Moya, E. Domingo and J. Holland (1992). "Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(13): 6015-6019.
- Dufresne, P. J., K. Thivierge, S. Cotton, C. Beauchemin, C. Ide, E. Ubalijoro, J.-F. Laliberté and M. G. Fortin (2008). "Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles." Virology **374**(1): 217-227.
- Dunham, W. H., M. Mullin and A. C. Gingras (2012). "Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies." Proteomics **12**(10): 1576-1590.
- Dunoyer, P., C. Himber and O. Voinnet (2005). "DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal." Nature genetics **37**(12): 1356.
- Díaz-Pendón, J. A. and S.-W. Ding (2008). "Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis." Annu. Rev. Phytopathol. **46**: 303-326.
- Dória, M. S., A. O. de Sousa, C. de Jesus Barbosa, M. G. C. Costa, A. da Silva Gesteira, R. M. Souza, A. C. O. Freitas and C. P. Pirovani (2015). "Citrus tristeza virus (CTV) causing proteomic and enzymatic changes in sweet orange variety "Westin"." PLoS one **10**(7): e0130950.
- d'Urso, F., A. Sambade, A. Moya, J. Guerri and P. Moreno (2003). "Variation of haplotype distributions of two genomic regions of Citrus tristeza virus populations from eastern Spain." Molecular Ecology **12**(2): 517-526.
- Ebhardt, H. A., E. P. Thi, M.-B. Wang and P. J. Unrau (2005). "Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(38): 13398-13403.

Eigen, M. and P. Schuster (1977). "A principle of natural self-organization." Naturwissenschaften **64**(11): 541-565.

Eigen, M. and P. Schuster (1982). Stages of emerging life—five principles of early organization. Disequilibrium and Self-Organisation, Springer: 169-183.

Ejiri, S.-i. (2002). "Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **66**(1): 1-21.

El-Mohtar, C. and W. O. Dawson (2014). "Exploring the limits of vector construction based on Citrus tristeza virus." Virology **448**: 274-283.

Elena, S. F. (2012). "RNA virus genetic robustness: possible causes and some consequences." Current opinion in virology **2**(5): 525-530.

Elena, S. F. (2016). "Local adaptation of plant viruses: lessons from experimental evolution." Molecular Ecology.

Elena, S. F., P. Carrasco, J. A. Daròs and R. Sanjuán (2006). "Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses." EMBO reports **7**(2): 168-173.

Elena, S. F. and R. Sanjuán (2007). "Virus evolution: insights from an experimental approach." Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. **38**: 27-52.

Elena, S. F., C. O. Wilke, C. Ofria and R. E. Lenski (2007). "Effects of population size and mutation rate on the evolution of mutational robustness." Evolution **61**(3): 666-674.

Escarmís, C., M. Dávila and E. Domingo (1999). "Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet." Journal of molecular biology **285**(2): 495-505.

Escarmís, C., C. Perales and E. Domingo (2009). "Biological effect of Muller's Ratchet: distant capsid site can affect picornavirus protein processing." Journal of virology **83**(13): 6748-6756.

Escriu, F., A. Fraile and F. García-Arenal (2007). "Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus." PLoS Pathog **3**(1): e8.

Eulalio, A., I. Nunes-Correia, A. Carvalho, C. Faro, V. Citovsky, S. Simoes and M. P. de Lima (2004). "Two African swine fever virus proteins derived from a common precursor exhibit different nucleocytoplasmic transport activities." Journal of virology **78**(18): 9731-9739.

Fabre, F., B. Moury, E. I. Johansen, V. Simon, M. Jacquemond and R. Senoussi (2014). "Narrow bottlenecks affect pea seedborne mosaic virus populations during vertical seed transmission but not during leaf colonization." PLoS Pathog **10**(1): e1003833.

Fagard, M., S. Boutet, J.-B. Morel, C. Bellini and H. Vaucheret (2000). "AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(21): 11650-11654.

Fagoaga, C., C. López, A. H. de Mendoza, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña (2006). "Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime." Plant molecular biology **60**(2): 153-165.

Fagoaga, C., C. López, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña (2005). "Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of Citrus tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain." Molecular plant-microbe interactions **18**(5): 435-445.

Fagoaga, C., G. PENSABENE-BELLAVIA, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Pena (2011). "Ectopic expression of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts." Molecular plant pathology **12**(9): 898-910.

Fahrenkrog, B. and U. Aebi (2002). The vertebrate nuclear pore complex: from structure to function. Nuclear Transport, Springer: 25-48.

Falk, A., B. J. Feys, L. N. Frost, J. D. Jones, M. J. Daniels and J. E. Parker (1999). "EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(6): 3292-3297.

Fang, D., C. Federici and M. Roose (1998). "A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in Poncirus trifoliata (L.) Raf." Genetics **150**(2): 883-890.

Fang, D. and M. Roose (1999). "A novel gene conferring citrus tristeza virus resistance in Citrus maxima (Burm.) Merrill." HortScience **34**(2): 334-335.

Fares, M. A. and D. McNally (2006). "CAPS: coevolution analysis using protein sequences." Bioinformatics **22**(22): 2821-2822.

Fares, M. A. and S. A. Travers (2006). "A novel method for detecting intramolecular coevolution: adding a further dimension to selective constraints analyses." Genetics **173**(1): 9-23.

Farnham, G. and D. C. Baulcombe (2006). "Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18828-18833.

Fawcett, H. and J. Wallace (1946). "Evidence of the virus nature of citrus quick decline." Calif. Citrogr **32**(50): 88-89.

Febres, V., L. Ashoulin, M. Mawassi, A. Frank, M. Bar-Joseph, K. Manjunath, R. Lee and C. Niblett (1996). "The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles." Phytopathology **86**(12): 1331-1335.

Feki, S., M. Loukili, R. Triki-Marrakchi, G. Karimova, I. Old, H. Ounouna, A. Nato, F. Nato, J.-L. Guesdon and P. Lafaye (2005). "Interaction between tobacco Ribulose-1, 5-biphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (RubisCO-LSU) and the PVY

Coat Protein (PVY-CP)." European journal of plant pathology **112**(3): 221-234.

Feng, J. and J. Chen (2013). "In silico analysis the complementarity of tomato microRNA/microRNA* sequences with Cucumber mosaic virus (CMV) genomic RNAs." Journal of nanoscience and nanotechnology **13**(6): 4421-4426.

Fernández-Cuartero, B., J. Burgyán, M. A. Aranda, K. Salänki, E. Moriones and F. García-Arenal (1994). "Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature." Virology **203**(2): 373-377.

Feys, B. J., L. J. Moisan, M. A. Newman and J. E. Parker (2001). "Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4." The EMBO journal **20**(19): 5400-5411.

Feys, B. J., M. Wiermer, R. A. Bhat, L. J. Moisan, N. Medina-Escobar, C. Neu, A. Cabral and J. E. Parker (2005). "Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity." The Plant Cell **17**(9): 2601-2613.

Fields, S. and O.-k. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-246.

Flores, R., V. Conejero and R. Garro (1975). "Partial characterization of the protein component of nucleoprotein particles associated with citrus tristeza disease." Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Flores, R., P. Moreno, B. Falk, G. P. Martelli and W. O. Dawson (2013). "e-Book on Closteroviridae." Frontiers in microbiology **4**.

Fodor, J., G. Gullner, A. L. Adam, B. Barna, T. Komives and Z. Király (1997). "Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance)." Plant Physiology **114**(4): 1443-1451.

Folimonov, A. S., S. Y. Folimonova, M. Bar-Joseph and W. O. Dawson (2007). "A stable RNA virus-based vector for citrus trees." Virology **368**(1): 205-216.

Folimonova, S. Y. (2012). "Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein." Journal of virology **86**(10): 5554-5561.

Folimonova, S. Y., A. S. Folimonov, S. Tatineni and W. O. Dawson (2008). "Citrus tristeza virus: survival at the edge of the movement continuum." Journal of virology **82**(13): 6546-6556.

Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida and I. W. Mattaj (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-1060.

Fraser, L. (1952). "Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus." Agr. Gaz. NS Wales **63**: 125-131.

Freeman, S. H., J. C. S. Freeman and J. C. Herron (2002). Análisis evolutivo.

Freitas, N. and C. Cunha (2009). "Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins." Current genomics **10**(8): 550-557.

Fridborg, I., J. Grainger, A. Page, M. Coleman, K. Findlay and S. Angell (2003). "TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X." Molecular plant-microbe interactions **16**(2): 132-140.

Frizzi, A. and S. Huang (2010). "Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology." Plant Biotechnol J **8**(6): 655-677.

Frost, S. D., H. F. Günthard, J. K. Wong, D. Havlir, D. D. Richman and A. J. L. Brown (2001). "Evidence for positive selection driving the evolution of HIV-1 env under potent antiviral therapy." Virology **284**(2): 250-258.

Fu, S., J. Shao, C. Zhou and J. S. Hartung (2016). "Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and two strains of Citrus Tristeza Virus." BMC genomics **17**(1): 349.

Fu, Z. Q., S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S. H. Spoel, Y. Tada and N. Zheng (2012). "NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants." Nature **486**(7402): 228-232.

Fukada, M., S. Asano, T. Nakamura and M. Adachi (1997). "CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal." Nature **390**(6657): 308.

Fusaro, A. F., R. L. Correa, K. Nakasugi, C. Jackson, L. Kawchuk, M. F. Vaslin and P. M. Waterhouse (2012). "The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation." Virology **426**(2): 178-187.

Futuyma, D. J. and G. Moreno (1988). "The evolution of ecological specialization." Annual Review of Ecology and Systematics **19**(1): 207-233.

Gago, S., S. F. Elena, R. Flores and R. Sanjuán (2009). "Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid." Science **323**(5919): 1308-1308.

Gandía, M., A. Conesa, G. Ancillo, J. Gadea, J. Forment, V. Pallás, R. Flores, N. Duran-Vila, P. Moreno and J. Guerri (2007). "Transcriptional response of Citrus aurantifolia to infection by Citrus tristeza virus." Virology **367**(2): 298-306.

Garcia-Ruiz, H., A. Takeda, E. J. Chapman, C. M. Sullivan, N. Fahlgren, K. J. Brempelis and J. C. Carrington (2010). "Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection." The Plant Cell **22**(2): 481-496.

García-Andrés, S., F. Monci, J. Navas-Castillo and E. Moriones (2006). "Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir Solanum nigrum: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature." Virology **350**(2): 433-442.

García-Arenal, F. and A. Fraile (2011). "Population dynamics and genetics of plant infection by viruses." Recent advances in plant virology: 263-281.

García-Arenal, F., A. Fraile and J. M. Malpica (2001). "Variability and genetic structure of plant virus populations." Annual review of phytopathology **39**(1): 157-186.

García-Arenal, F. and B. A. McDonald (2003). "An analysis of the durability of resistance to plant viruses." Phytopathology **93**(8): 941-952.

Garnsey, M., G. SM and L. EL (1987). "Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus." Phytophylactica **19**(2): 151-158.

Garnsey, S., D. Gonsalves and D. Purcifull (1977). "Mechanical transmission of citrus tristeza virus [Etrog citron]." Phytopathology.

Garnsey, S. and G. Muller (1988). Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus. Proc. 10th Conf. Intern. Organization Citrus Virol.

Garnsey, S., T. Permar, M. Cambra and C. Henderson (1993). Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). Proc. 12th Conf. IOCV, IOCV Riverside, CA.

Geer, L. Y., S. P. Markey, J. A. Kowalak, L. Wagner, M. Xu, D. M. Maynard, X. Yang, W. Shi and S. H. Bryant (2004). "Open mass spectrometry search algorithm." Journal of proteome research **3**(5): 958-964.

Genovés, A., J. A. Navarro and V. Pallás (2009). "A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery." Virology **395**(1): 133-142.

Genovés, A., J. A. Navarro and V. Pallás (2010). "The intra-and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway." Molecular plant-microbe interactions **23**(3): 263-272.

Ghazala, W., A. Waltermann, R. Pilot, S. Winter and M. Varrelmann (2008). "Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus." Journal of general virology **89**(7): 1748-1758.

- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.
- Ghorbel, R., C. LÓpez, C. Fagoaga, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña (2001). "Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms." Molecular plant pathology **2**(1): 27-36.
- Ghosh, I., A. D. Hamilton and L. Regan (2000). "Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein." Journal of the American Chemical Society **122**(23): 5658-5659.
- Ghoshal, B. and H. Sanfaçon (2014). "Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1." Virology **456**: 188-197.
- Gilbertson, R. L. and W. J. Lucas (1996). "How do viruses traffic on the 'vascular highway'?" Trends in Plant Science **1**(8): 250-251.
- Gillings, M., P. Broadbent, J. Indsto and R. Lee (1993). "Characterisation of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction." Journal of Virological Methods **44**(2): 305-317.
- Gimenez-Ibanez, S. and R. Solano (2013). "Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens." Front Plant Sci **4**: 72.
- Glick, E., A. Zrachya, Y. Levy, A. Mett, D. Gidoni, E. Belausov, V. Citovsky and Y. Gafni (2008). "Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(1): 157-161.
- Gmitter, F., S. Xiao, S. Huang, X. Hu, S. Garnsey and Z. Deng (1996). "A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region." Theoretical and Applied Genetics **92**(6): 688-695.

Gonsalves, D., D. Purcifull and S. Garnsey (1978). "Purification and serology of citrus tristeza virus." Phytopathology **68**: 553-559.

González, I., L. Martínez, D. V. Rakitina, M. G. Lewsey, F. A. Atencio, C. Llave, N. O. Kalinina, J. P. Carr, P. Palukaitis and T. Canto (2010). "Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity." Molecular plant-microbe interactions **23**(3): 294-303.

González, I., D. Rakitina, M. Semashko, M. Taliansky, S. Praveen, P. Palukaitis, J. P. Carr, N. Kalinina and T. Canto (2012). "RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization." RNA **18**(4): 771-782.

Goodin, M. M., D. Zaitlin, R. A. Naidu and S. A. Lommel (2008). "Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant-pathogen interactions." Molecular plant-microbe interactions **21**(8): 1015-1026.

Gorovits, R., A. Moshe, M. Ghanim and H. Czosnek (2013). "Recruitment of the host plant heat shock protein 70 by Tomato yellow leaf curl virus coat protein is required for virus infection." PLoS One **8**(7): e70280.

Gottwald, T. R. (2007). "Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere." Outlooks on Pest Management **18**(6): 274.

Gowda, S., M. A. Ayllón, T. Satyanarayana, M. Bar-Joseph and W. O. Dawson (2003). "Transcription strategy in a closterovirus: a novel 5'-proximal controller element of citrus tristeza virus produces 5'-and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3' open reading frame controller elements." Journal of virology **77**(1): 340-352.

Gowda, S., T. Satyanarayana, M. A. Ayllón, P. Moreno, R. Flores and W. O. Dawson (2003). "The conserved structures of the 5' nontranslated region of Citrus tristeza virus are involved in replication and virion assembly." Virology **317**(1): 50-64.

Gowda, S., T. Satyanarayana, M. a. A. Ayllón, M. R. Albiach-Martí, M. Mawassi, S. Rabindran, S. M. Garnsey and W. O. Dawson

(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**(1): 134-151.

Gowda, S., T. Satyanarayana, C. L. Davis, J. Navas-Castillo, M. R. Albiach-Martí, M. Mawassi, N. Valkov, M. Bar-Joseph, P. Moreno and W. O. Dawson (2000). "The p20 gene product of Citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies." Virology **274**(2): 246-254.

Gowda, S., T. Satyanarayana, C. Robertson, S. Garnsey and W. Dawson (2005). Infection of citrus plants with virions generated in Nicotiana benthamiana plants agroinfiltrated with a binary vector based Citrus tristeza virus. Proceedings of the Sixteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Monterey, Mexico, 7-12 November 2004, International Organization of Citrus Virologists.

Gowda, S., S. Tatineni, S. Y. Folimonova, M. E. Hilf and W. O. Dawson (2009). "Accumulation of a 5' proximal subgenomic RNA of Citrus tristeza virus is correlated with encapsidation by the minor coat protein." Virology **389**(1): 122-131.

Grant, T. (1959). "Tristeza virus strains in relation to different citrus species used as test plants." Phytopathology **49**(12): 823-827.

Grant, T. J. and A. Costa (1951). "A mild strain of the tristeza virus of citrus." Phytopathology **41**(2): 114-122.

Grisoni, M. and C. Riviere (1993). "Analysis of epidemics of citrus tristeza virus (CTV) in young citrus groves exposed to aphid infestation under different climatic conditions in Reunion Island."

Guerri, J., P. Moreno, N. Muñoz and M. Martinez (1991). "Variability among Spanish citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis." Plant pathology **40**(1): 38-44.

Guevara-Morato, M. Á., M. García de Lacoba, I. García-Luque and M. T. Serra (2010). "Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in Capsicum chinense L3 plants with dual

RNase and DNase activities." Journal of experimental botany **61**(12): 3259-3271.

Guo, H., Q. Ding, F. Lin, W. Pan, J. Lin and A. C. Zheng (2009). "Characterization of the nuclear and nucleolar localization signals of bovine herpesvirus-1 infected cell protein 27." Virus research **145**(2): 312-320.

Gururani, M. A., J. Venkatesh, C. P. Upadhyaya, A. Nookaraju, S. K. Pandey and S. W. Park (2012). "Plant disease resistance genes: current status and future directions." Physiological and molecular plant pathology **78**: 51-65.

Gushchin, V. A., N. I. Lukhovitskaya, D. E. Andreev, K. M. Wright, M. E. Taliany, A. G. Solovyev, S. Y. Morozov and S. A. MacFarlane (2013). "Dynamic localization of two tobamovirus ORF6 proteins involves distinct organellar compartments." Journal of General Virology **94**(1): 230-240.

Gómez-Muñoz, N., K. Velázquez, M. C. Vives, S. Ruiz-Ruiz, J. A. Pina, R. Flores, P. Moreno and J. Guerri (2016). "The resistance of sour orange to Citrus tristeza virus is mediated by both the salicylic acid and RNA silencing defence pathways." Mol Plant Pathol.

Haas, G., J. Azevedo, G. Moissiard, A. Geldreich, C. Himber, M. Bureau, T. Fukuhara, M. Keller and O. Voinnet (2008). "Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4." The EMBO Journal **27**(15): 2102-2112.

Haas, M., A. Geldreich, M. Bureau, L. Dupuis, V. Leh, G. Vetter, K. Kobayashi, T. Hohn, L. Ryabova and P. Yot (2005). "The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasms." The Plant Cell **17**(3): 927-943.

Hafrén, A., D. Hofius, G. Rönholm, U. Sonnewald and K. Mäkinen (2010). "HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions." The Plant Cell **22**(2): 523-535.

- Hagiwara, Y., V. V. Peremyslov and V. V. Dolja (1999). "Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization." Journal of virology **73**(10): 7988-7993.
- Hajimorad, M., X. Ding, S. Flasiński, S. Mahajan, E. Graff, R. Haldeman-Cahill, J. Carrington and B. Cassidy (1996). "NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions." Virology **224**(2): 368-379.
- Hamera, S., X. Song, L. Su, X. Chen and R. Fang (2012). "Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities." The Plant Journal **69**(1): 104-115.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell and D. Baulcombe (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." EMBO J **21**(17): 4671-4679.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-1150.
- Hammond-Kosack, K. and J. D. Jones (2000). "Responses to plant pathogens." Biochemistry and molecular biology of plants **1**: 1102-1156.
- Han, Y.-H., H.-Y. Xiang, Q. Wang, Y.-Y. Li, W.-Q. Wu, C.-G. Han, D.-W. Li and J.-L. Yu (2010). "Ring structure amino acids affect the suppressor activity of melon aphid-borne yellows virus P0 protein." Virology **406**(1): 21-27.
- Harper, S., T. Dawson and M. Pearson (2009). "Complete genome sequences of two distinct and diverse Citrus tristeza virus isolates from New Zealand." Archives of virology **154**(9): 1505-1510.

- Harper, S., T. Dawson and M. Pearson (2010). "Isolates of Citrus tristeza virus that overcome Poncirus trifoliata resistance comprise a novel strain." Archives of virology **155**(4): 471-480.
- Harper, S., N. Killiny, S. Tatineni, S. Gowda, S. Cowell, T. Shilts and W. Dawson (2016). "Sequence variation in two genes determines the efficacy of transmission of citrus tristeza virus by the brown citrus aphid." Archives of virology **161**(12): 3555-3559.
- Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." Nature **475**(7356): 324.
- Harvey, J. J., M. G. Lewsey, K. Patel, J. Westwood, S. Heimstädt, J. P. Carr and D. C. Baulcombe (2011). "An antiviral defense role of AGO2 in plants." PloS one **6**(1): e14639.
- Hashimoto, M., K. Komatsu, R. Iwai, T. Keima, K. Maejima, T. Shiraishi, K. Ishikawa, T. Yoshida, Y. Kitazawa and Y. Okano (2015). "Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification." Molecular Plant-Microbe Interactions **28**(6): 675-688.
- Haupt, S., G. H. Cowan, A. Ziegler, A. G. Roberts, K. J. Oparka and L. Torrance (2005). "Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway." The Plant Cell **17**(1): 164-181.
- He, Y., M. Zhong, Y. Zhang, Y. Wang and K. Cao (2015). "Identification of Host Factors Interacting with the Movement Protein of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus by Yeast Two-Hybrid System." Bing du xue bao= Chinese journal of virology **31**(2): 124-131.
- Heath, M. C. (2000). "Hypersensitive response-related death." Plant Mol Biol **44**(3): 321-334.
- Heinlein, M. (2015). "Plant virus replication and movement." Virology **479**: 657-671.
- Hendelman, A., M. Kravchik, R. Stav, M. Zik, N. Lugassi and T. Arazi (2013). "The developmental outcomes of P0-mediated ARGONAUTE destabilization in tomato." Planta **237**(1): 363-377.

- Hermoso de Mendoza, A., J. Ballester-Olmos and J. Pina (1984). Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol. LW Timmer, and JA Dodds (eds.) Riverside, California. pp.
- Herranz, M. C. and V. Pallas (2004). "RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of Prunus necrotic ringspot virus." Journal of general virology **85**(3): 761-768.
- Herranz, M. C., J.-A. Sanchez-Navarro, A. Saurí, I. Mingarro and V. Pallás (2005). "Mutational analysis of the RNA-binding domain of the Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement." Virology **339**(1): 31-41.
- Hilf, M. E., A. V. Karasev, M. R. Albiach-Marti, W. O. Dawson and S. M. Garnsey (1999). "Two paths of sequence divergence in the citrus tristeza virus complex." Phytopathology **89**(4): 336-342.
- Hilf, M. E., A. V. Karasev, H. R. Pappu, D. J. Gumpf, C. L. Niblett and S. M. Garnsey (1995). "Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue." Virology **208**(2): 576-582.
- Hilf, M. E., V. A. Mavrodieva and S. M. Garnsey (2005). "Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms." Phytopathology **95**(8): 909-917.
- Hillung, J., J. M. Cuevas and S. F. Elena (2015). "Evaluating the within-host fitness effects of mutations fixed during virus adaptation to different ecotypes of a new host." Phil. Trans. R. Soc. B **370**(1675): 20140292.
- Hillung, J., J. M. Cuevas, S. Valverde and S. F. Elena (2014). "Experimental evolution of an emerging plant virus in host genotypes that differ in their susceptibility to infection." Evolution **68**(9): 2467-2480.
- Himber, C., P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler and O. Voinnet (2003). "Transitivity-dependent and-independent cell-to-cell movement of RNA silencing." The EMBO Journal **22**(17): 4523-4533.

Hiraguri, A., R. Itoh, N. Kondo, Y. Nomura, D. Aizawa, Y. Murai, H. Koiwa, M. Seki, K. Shinozaki and T. Fukuhara (2005). "Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*." Plant Mol Biol **57**(2): 173-188.

Hiraguri, A., R. Itoh, N. Kondo, Y. Nomura, D. Aizawa, Y. Murai, H. Koiwa, M. Seki, K. Shinozaki and T. Fukuhara (2005). "Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*." Plant molecular biology **57**(2): 173-188.

Hiscox, J. A. (2007). "RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus." Nature reviews. Microbiology **5**(2): 119.

Hiscox, J. A., A. Whitehouse and D. A. Matthews (2010). "Nucleolar proteomics and viral infection." Proteomics **10**(22): 4077-4086.

Hodel, M. R., A. H. Corbett and A. E. Hodel (2001). "Dissection of a nuclear localization signal." Journal of Biological Chemistry **276**(2): 1317-1325.

Hofius, D., A. T. Maier, C. Dietrich, I. Jungkunz, F. Börnke, E. Maiss and U. Sonnewald (2007). "Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants." Journal of virology **81**(21): 11870-11880.

Holmes, E. C. (2003). "Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution." Trends in microbiology **11**(12): 543-546.

Holmes, E. C. (2009). The evolution and emergence of RNA viruses, Oxford University Press.

Hu, C.-D., Y. Chinenov and T. K. Kerppola (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." Molecular cell **9**(4): 789-798.

Hu, W. and D. A. Jans (1999). "Efficiency of Importin α/β -Mediated Nuclear Localization Sequence Recognition and Nuclear Import DIFFERENTIAL ROLE OF NTF2." Journal of Biological Chemistry **274**(22): 15820-15827.

Huang, T.-S. and P. D. Nagy (2011). "Direct inhibition of tombusvirus plus-strand RNA synthesis by a dominant negative mutant of a host metabolic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in yeast and plants." Journal of virology **85**(17): 9090-9102.

Huang, T.-S., T. Wei, J.-F. Laliberté and A. Wang (2010). "A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection." Plant physiology **152**(1): 255-266.

Huang, Y., H.-Y. Ma, W. Huang, F. Wang, Z.-S. Xu and A.-S. Xiong (2016). "Comparative proteomic analysis provides novel insight into the interaction between resistant vs susceptible tomato cultivars and TYLCV infection." BMC Plant Biology **16**(1): 162.

Hutvágner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, É. Bálint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

Hwang, J., S. Lee, J.-H. Lee, W.-H. Kang, J.-H. Kang, M.-Y. Kang, C.-S. Oh and B.-C. Kang (2015). "Plant translation elongation factor 1B β facilitates Potato virus X (PVX) infection and interacts with PVX triple gene block protein 1." PloS one **10**(5): e0128014.

Hwang, J., C.-S. Oh and B.-C. Kang (2013). "Translation elongation factor 1B (eEF1B) is an essential host factor for Tobacco mosaic virus infection in plants." Virology **439**(2): 105-114.

Hyodo, K., A. Mine, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno (2013). "ADP ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus." Journal of virology **87**(1): 163-176.

Hyodo, K. and T. Okuno (2014). "Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication." Journal of general plant pathology **80**(2): 123-135.

Hübner, S., H. M. Smith, W. Hu, C. K. Chan, H.-P. Rihs, B. M. Paschal, N. V. Raikhel and D. A. Jans (1999). "Plant importin α binds nuclear localization sequences with high affinity and can mediate

nuclear import independent of importin β ." Journal of Biological Chemistry **274**(32): 22610-22617.

Iki, T., M. Yoshikawa, M. Nishikiori, M. C. Jaudal, E. Matsumoto-Yokoyama, I. Mitsuhashi, T. Meshi and M. Ishikawa (2010). "In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90." Molecular cell **39**(2): 282-291.

Ilharco, F., C. Sousa-Silva and A. Álvarez Álvarez (2005). "First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and Continental Portugal (Homoptera, Aphidoidea)." Agronomia Lusitana **51**(1): 19-21.

Ivanov, K. I. and K. Mäkinen (2012). "Coat proteins, host factors and plant viral replication." Current opinion in virology **2**(6): 712-718.

Iyer-Pascuzzi, A. S. and S. R. McCouch (2007). "Recessive resistance genes and the *Oryza sativa*-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathosystem." Mol Plant Microbe Interact **20**(7): 731-739.

Jamous, R. M., K. Boonrod, M. W. Fuellgrabe, M. S. Ali-Shtayeh, G. Krczal and M. Wassenegger (2011). "The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro." Journal of general virology **92**(9): 2222-2226.

Jang, C., E.-Y. Seo, J. Nam, H. Bae, Y. G. Gim, H. G. Kim, I. S. Cho, Z.-W. Lee, G. R. Bauchan and J. Hammond (2013). "Insights into *Alternanthera* mosaic virus TGB3 functions: interactions with *Nicotiana benthamiana* PsbO correlate with chloroplast vesiculation and veinal necrosis caused by TGB3 over-expression." Frontiers in plant science **4**: 5.

Jensen, P. E., L. Rosgaard, J. Knoetzel and H. V. Scheller (2002). "Photosystem I activity is increased in the absence of the PSI-G subunit." Journal of Biological Chemistry **277**(4): 2798-2803.

Jiménez, I., L. López, J. Alamillo, A. Valli and J. Garcia (2006). "Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection." Molecular plant-microbe interactions **19**(3): 350-358.

- Jin, H. and J.-K. Zhu (2010). "A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes." Genes & development **24**(9): 853-856.
- Jin, Y., D. Ma, J. Dong, J. Jin, D. Li, C. Deng and T. Wang (2007). "HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta." Journal of virology **81**(23): 12881-12888.
- Jones, J. D. and J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." Nature **444**(7117): 323.
- Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel and B. Bartel (2006). "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." Annu. Rev. Plant Biol. **57**: 19-53.
- Jung, H. W., T. J. Tschaplinski, L. Wang, J. Glazebrook and J. T. Greenberg (2009). "Priming in systemic plant immunity." Science **324**(5923): 89-91.
- Kaido, M., K. Abe, A. Mine, K. Hyodo, T. Taniguchi, H. Taniguchi, K. Mise and T. Okuno (2014). "GAPDH-A recruits a plant virus movement protein to cortical virus replication complexes to facilitate viral cell-to-cell movement." PLoS Pathog **10**(11): e1004505.
- Kalab, P. and R. Heald (2008). "The RanGTP gradient—a GPS for the mitotic spindle." Journal of cell science **121**(10): 1577-1586.
- Kalantidis, K., H. T. Schumacher, T. Alexiadis and J. M. Helm (2008). "RNA silencing movement in plants." Biology of the Cell **100**(1): 13-26.
- Kanazawa, A., J. i. Inaba, H. Shimura, S. Otagaki, S. Tsukahara, A. Matsuzawa, B. M. Kim, K. Goto and C. Masuta (2011). "Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants." The Plant Journal **65**(1): 156-168.
- Kang, B.-C., I. Yeam and M. M. Jahn (2005). "Genetics of plant virus resistance." Annu. Rev. Phytopathol. **43**: 581-621.
- Kang, H. K., S. H. Yang, Y. P. Lee, Y. I. Park and S. H. Kim (2012). "A tobacco CBL-interacting protein kinase homolog is involved in

phosphorylation of the N-terminal domain of the cucumber mosaic virus polymerase 2a protein." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **76**(11): 2101-2106.

Kang, S.-H., A. Bak, O.-K. Kim and S. Y. Folimonova (2015). "Membrane association of a nonconserved viral protein confers virus ability to extend its host range." Virology **482**: 208-217.

Kang, S.-H., T. N. M. Dao, O.-K. Kim and S. Y. Folimonova (2017). "Self-interaction of Citrus tristeza virus p33 protein via N-terminal helix." Virus Research **233**: 29-34.

Kang, S.-H., F. Qu and T. J. Morris (2015). "A nuclear fraction of turnip crinkle virus capsid protein is important for elicitation of the host resistance response." Virus research **210**: 264-270.

Karasev, A., V. Boyko, S. Gowda, O. Nikolaeva, M. Hilf, E. Koonin, C. Niblett, K. Cline, D. Gumpf and R. Lee (1995). "Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome." Virology **208**(2): 511-520.

Karasev, A. V., M. E. Hilf, S. M. Garnsey and W. O. Dawson (1997). "Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5'termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs." Journal of virology **71**(8): 6233-6236.

Karasev, A. V., A. S. Kashina, V. I. Gelfand and V. V. Dolja (1992). "HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein." FEBS letters **304**(1): 12-14.

Karran, R. A. and H. Sanfaçon (2014). "Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene." Molecular Plant-Microbe Interactions **27**(9): 933-943.

Kasschau, K. D. and J. C. Carrington (2001). "Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro." Virology **285**(1): 71-81.

Kassen, R. (2002). "The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity." Journal of evolutionary biology **15**(2): 173-190.

Killiny, N., S. Harper, S. Alfaress, C. El Mohtar and W. Dawson (2016). "Minor Coat and Heat Shock Proteins Are Involved in the Binding of Citrus Tristeza Virus to the Foregut of Its Aphid Vector, *Toxoptera citricida*." Applied and environmental microbiology **82**(21): 6294-6302.

Kim, B., C. Masuta, H. Matsuura, H. Takahashi and T. Inukai (2008). "Veinal necrosis induced by Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis* is a form of defense response accompanying HR-like cell death." Molecular plant-microbe interactions **21**(2): 260-268.

Kim, S. H., E. V. Ryabov, N. O. Kalinina, D. V. Rakitina, T. Gillespie, S. MacFarlane, S. Haupt, J. W. Brown and M. Taliansky (2007). "Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection." The EMBO journal **26**(8): 2169-2179.

Knoester, M., L. C. Van Loon, J. Van Den Heuvel, J. Hennig, J. F. Bol and H. J. Linthorst (1998). "Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(4): 1933-1937.

Komatsu, K., M. Hashimoto, J. Ozeki, Y. Yamaji, K. Maejima, H. Senshu, M. Himeno, Y. Okano, S. Kagiwada and S. Namba (2010). "Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways." Molecular plant-microbe interactions **23**(3): 283-293.

Kong, P., L. Rubio, M. Polek and B. W. Falk (2000). "Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates." Virus genes **21**(3): 139-145.

Kosakovsky Pond, S. L. and S. D. Frost (2005). "Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection." Molecular biology and evolution **22**(5): 1208-1222.

Kosugi, S., M. Hasebe, N. Matsumura, H. Takashima, E. Miyamoto-Sato, M. Tomita and H. Yanagawa (2009). "Six classes of nuclear

localization signals specific to different binding grooves of importin α ." Journal of Biological Chemistry **284**(1): 478-485.

Kozłowska-Makulska, A., H. Guilley, M. S. Szyndel, M. Beuve, O. Lemaire, E. Herrbach and S. Bouzoubaa (2010). "P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity." Journal of general virology **91**(4): 1082-1091.

Kreuze, J. F., E. I. Savenkov, W. Cuellar, X. Li and J. P. Valkonen (2005). "Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing." Journal of virology **79**(11): 7227-7238.

Krulko, I., D. Ustyanenko and V. Polischuk (2009). "Role of siRNAs and miRNAs in the processes of RNA-mediated gene silencing during viral infections." Cytology and genetics **43**(1): 63-72.

Kumari, R., S. Kumar, L. Singh and V. Hallan (2016). "Movement Protein of Cucumber Mosaic Virus Associates with Apoplastic Ascorbate Oxidase." PloS one **11**(9): e0163320.

Kunik, T., K. Palanichelvam, H. Czosnek, V. Citovsky and Y. Gafni (1998). "Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells." The Plant Journal **13**(3): 393-399.

Kyriakou, A., N. Ioannou, J. Gavriel, M. Bar-Joseph, C. Papayiannis, T. Kapari-Isaia and G. Savva (1996). Management of Citrus tristeza virus in Cyprus. Proc. 13th Conference IOCV, IOCV Riverside.

La Cour, T., L. Kiemer, A. Mølgaard, R. Gupta, K. Skriver and S. Brunak (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Engineering Design and Selection **17**(6): 527-536.

Lacombe, S., M. Bangratz, F. Vignols and C. Brugidou (2010). "The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing." The Plant Journal **61**(3): 371-382.

Laino, P., M. P. Russo, M. Guardo, G. Reforgiato-Recupero, G. Valè, L. Cattivelli and V. Moliterni (2016). "Rootstock–scion interaction affecting citrus response to CTV infection: a proteomic view." Physiologia plantarum **156**(4): 444-467.

- Lakatos, L., T. Csorba, V. Pantaleo, E. J. Chapman, J. C. Carrington, Y. P. Liu, V. V. Dolja, L. F. Calvino, J. J. López-Moya and J. Burgyán (2006). "Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors." The EMBO journal **25**(12): 2768-2780.
- Laliberté, J.-F. and H. Zheng (2014). "Viral manipulation of plant host membranes." Annual review of virology **1**: 237-259.
- Lalić, J. and S. F. Elena (2012). "Magnitude and sign epistasis among deleterious mutations in a positive-sense plant RNA virus." Heredity **109**(2): 71.
- Laloi, C., K. Apel and A. Danon (2004). "Reactive oxygen signalling: the latest news." Current opinion in plant biology **7**(3): 323-328.
- Lam, M. H., L. J. Briggs, W. Hu, T. J. Martin, M. T. Gillespie and D. A. Jans (1999). "Importin β recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin α ." Journal of Biological Chemistry **274**(11): 7391-7398.
- Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine and A. H. Corbett (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α ." Journal of Biological Chemistry **282**(8): 5101-5105.
- Lastra, R. L., R. R. Peña, M. Niblett, C. Garnsey and R. SM Yokomi (1991). Survey for presence of citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus in Mexico and Central America, September 8-21, 1991: final report.
- Lauring, A. S., J. Frydman and R. Andino (2013). "The role of mutational robustness in RNA virus evolution." Nature reviews. Microbiology **11**(5): 327.
- Lazarowitz, S. G. and R. N. Beachy (1999). "Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants." The Plant Cell **11**(4): 535-548.
- Le Sourd, F., S. Boulben, R. Le Bouffant, P. Cormier, J. Morales, R. Belle and O. Mulner-Lorillon (2006). "eEF1B: At the dawn of the 21st

century." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1759**(1): 13-31.

Lee, B. J., A. E. Cansizoglu, K. E. Süel, T. H. Louis, Z. Zhang and Y. M. Chook (2006). "Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin β 2." Cell **126**(3): 543-558.

Li, C. F., I. R. Henderson, L. Song, N. Fedoroff, T. Lagrange and S. E. Jacobsen (2008). "Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*." PLoS Genet **4**(2): e27.

Li, F. and S.-W. Ding (2006). "Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity." Annu. Rev. Microbiol. **60**: 503-531.

Li, H. and M. J. Roossinck (2004). "Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population." Journal of virology **78**(19): 10582-10587.

Li, H. W., A. P. Lucy, H. S. Guo, W. X. Li, L. H. Ji, S. M. Wong and S. W. Ding (1999). "Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism." The EMBO Journal **18**(10): 2683-2691.

Li, J., C.-Y. Xiang, J. Yang, J.-P. Chen and H.-M. Zhang (2015). "Interaction of HSP20 with a viral RdRp changes its sub-cellular localization and distribution pattern in plants." Scientific reports **5**.

Li, J., Z. Yang, B. Yu, J. Liu and X. Chen (2005). "Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*." Current biology **15**(16): 1501-1507.

Li, Y., M. Wu, H. Song, X. Hu and B. Qiu (2005). "Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus." Archives of virology **150**(10): 1993-2008.

Li, Z., J. Pogany, T. Panavas, K. Xu, A. M. Esposito, T. G. Kinzy and P. D. Nagy (2009). "Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor." Virology **385**(1): 245-260.

- Lillo, F. and D. C. Krakauer (2007). "A statistical analysis of the three-fold evolution of genomic compression through frame overlaps in prokaryotes." Biology direct **2**(1): 22.
- Lim, H.-S., J. Nam, E.-Y. Seo, M. Nam, A. M. Vaira, H. Bae, C.-Y. Jang, C. H. Lee, H. G. Kim and M. Roh (2014). "The coat protein of Alternanthera mosaic virus is the elicitor of a temperature-sensitive systemic necrosis in Nicotiana benthamiana, and interacts with a host boron transporter protein." Virology **452**: 264-278.
- Lin, L., Z. Luo, F. Yan, Y. Lu, H. Zheng and J. Chen (2011). "Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants." Virus genes **43**(1): 90-92.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.
- Liu, J.-Z., E. B. Blancaflor and R. S. Nelson (2005). "The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments." Plant Physiology **138**(4): 1853-1865.
- Lodha, T. and J. Basak (2012). "Plant–pathogen interactions: what microarray tells about it?" Molecular biotechnology **50**(1): 87-97.
- Lopez, C., M. Cervera, C. Fagoaga, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Pena (2010). "Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime." Molecular plant pathology **11**(1): 33-41.
- Lorenzo-Redondo, R., A. V. Bordería and C. Lopez-Galindez (2011). "Dynamics of in vitro fitness recovery of HIV-1." Journal of virology **85**(4): 1861-1870.
- Lozano-Durán, R., T. Rosas-Díaz, G. Gusmaroli, A. P. Luna, L. Taconnat, X. W. Deng and E. R. Bejarano (2011). "Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF

E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Cell **23**(3): 1014-1032.

Lozsa, R., T. Csorba, L. Lakatos and J. Burgyan (2008). "Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins." Nucleic acids research **36**(12): 4099-4107.

Lu, L., G. Wu, X. Xu, H. Luan, H. Zhi, J. Cui, X. Cui and X. Chen (2015). "Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with Soybean mosaic virus-encoded P3 protein." Virus genes **50**(2): 333-339.

Lu, R., A. Folimonov, M. Shintaku, W. X. Li, B. W. Falk, W. O. Dawson and S. W. Ding (2004). "Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15742-15747.

Lu, Y. (2016). "Identification and roles of photosystem II assembly, stability, and repair factors in *Arabidopsis*." Frontiers in plant science **7**.

Lucas, W. J. (2006). "Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes." Virology **344**(1): 169-184.

Lucy, A. P., H. S. Guo, W. X. Li and S. W. Ding (2000). "Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus." The EMBO Journal **19**(7): 1672-1680.

Luna, E., T. J. Bruce, M. R. Roberts, V. Flors and J. Ton (2012). "Next-generation systemic acquired resistance." Plant Physiol **158**(2): 844-853.

Lynch, M. (2006). "The origins of eukaryotic gene structure." Molecular Biology and Evolution **23**(2): 450-468.

López, C., M. Ayllón, J. Navas-Castillo, J. Guerri, P. Moreno and R. Flores (1998). "Molecular variability of the 5'-and 3'-terminal regions of citrus tristeza virus RNA." Phytopathology **88**(7): 685-691.

López, C., J. Navas-Castillo, S. Gowda, P. Moreno and R. Flores (2000). "The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein." Virology **269**(2): 462-470.

- MacDiarmid, R. (2005). "RNA Silencing in Productive Virus Infections 1." Annu. Rev. Phytopathol. **43**: 523-544.
- Mackenzie, J. (2005). "Wrapping things up about virus RNA replication." Traffic **6**(11): 967-977.
- Mallory, A. and H. Vaucheret (2010). "Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins." The Plant Cell **22**(12): 3879-3889.
- Mallory, A. C., L. Ely, T. H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, G. Pruss, L. Bowman and V. B. Vance (2001). "HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal." The Plant Cell **13**(3): 571-583.
- Malpica, J. M., A. Fraile, I. Moreno, C. I. Obies, J. W. Drake and F. García-Arenal (2002). "The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus." Genetics **162**(4): 1505-1511.
- Mandadi, K. K. and K. B. Scholthof (2012). "Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease." Plant Physiol **160**(3): 1432-1452.
- Mandadi, K. K. and K. B. Scholthof (2013). "Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease?" Plant Cell **25**(5): 1489-1505.
- Mangwende, T., M.-L. Wang, W. Borth, J. Hu, P. H. Moore, T. E. Mirkov and H. H. Albert (2009). "The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities." Virology **384**(1): 38-50.
- Martín, S., M. L. García, A. Troisi, L. Rubio, G. Legarreta, O. Grau, D. Alioto, P. Moreno and J. Guerri (2006). "Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus." Journal of general virology **87**(10): 3097-3102.
- Martín, S., A. Sambade, L. Rubio, M. C. Vives, P. Moya, J. Guerri, S. F. Elena and P. Moreno (2009). "Contribution of recombination and selection to molecular evolution of Citrus tristeza virus." Journal of General Virology **90**(6): 1527-1538.

Martínez, F., G. Rodrigo, V. Aragonés, M. Ruiz, I. Lodewijk, U. Fernández, S. F. Elena and J.-A. Daròs (2016). "Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection." BMC genomics **17**(1): 87.

Mateyak, M. K. and T. G. Kinzy (2010). "eEF1A: thinking outside the ribosome." Journal of Biological Chemistry **285**(28): 21209-21213.

Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." Cell **123**(4): 607-620.

Matsuda, D. and T. W. Dreher (2004). "The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer." Virology **321**(1): 36-46.

Mawassi, M., E. Mietkiewska, R. Gofman, G. Yang and M. Bar-Joseph (1996). "Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus." Journal of General Virology **77**(9): 2359-2364.

MAWASSI, M., E. MIETKIEWSKA, M. E. HILF, L. ASHOULIN, A. V. KARASEV, R. GAFNY, R. F. LEE, S. M. GARNSEY, W. O. DAWSON and M. BAR-JOSEPH (1995). "Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus." Virology **214**(1): 264-268.

Mawassi, M., T. Satyanarayana, M. R. Albiach-Martí, S. Gowda, M. A. Ayllón, C. Robertson and W. O. Dawson (2000). "The fitness of citrus tristeza virus defective RNAs is affected by the lengths of their 5'-and 3'-termini and by the coding capacity." Virology **275**(1): 42-56.

Mayer, M. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." Cellular and molecular life sciences **62**(6): 670.

McClellan, A. (1957). "Tristeza virus of citrus: Evidence for absence of seed transmission." Plant. Dis. Rep **41**: 821.

- McClellan, A. (1974). The tristeza virus complex. Proceedings of the Sixth Conference of the International Organization of Citrus Virologists.
- McClellan, A. (1975). "Triesteza virus complex: its transmission by the aphid, *Toxoptera citricidus*." Phytophylactica **7**(3): 109-114.
- McClellan, A. and J. Van der Plank (1955). "The role of seedling yellows and stem pitting in tristeza of citrus." Phytopathology **45**: 222-224.
- Medina, V., V. V. Peremyslov, Y. Hagiwara and V. V. Dolja (1999). "Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus." Virology **260**(1): 173-181.
- Melnyk, C. W., A. Molnar and D. C. Baulcombe (2011). "Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals." The EMBO journal **30**(17): 3553-3563.
- Melzer, M. J., W. B. Borth, D. M. Sether, S. Ferreira, D. Gonsalves and J. S. Hu (2010). "Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian Citrus tristeza virus." Virus Genes **40**(1): 111-118.
- Meng, C., J. Chen, S.-w. Ding, J. Peng and S.-M. Wong (2008). "Hibiscus chlorotic ringspot virus coat protein inhibits trans-acting small interfering RNA biogenesis in Arabidopsis." Journal of general virology **89**(9): 2349-2358.
- Meng, C., J. Chen, J. Peng and S.-M. Wong (2006). "Host-induced avirulence of hibiscus chlorotic ringspot virus mutants correlates with reduced gene-silencing suppression activity." Journal of general virology **87**(2): 451-459.
- Mestre, P., M. Asins, E. Carbonell and L. Navarro (1997). "New gene (s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to citrus tristeza virus." Theoretical and Applied Genetics **95**(4): 691-695.
- Mestre, P., M. Asins, J. Pina, E. Carbonell and L. Navarro (1997). "Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf." Theoretical and Applied Genetics **94**(3-4): 458-464.

- Mine, A., K. Hyodo, Y. Tajima, K. Kusumanegara, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno (2012). "Differential roles of Hsp70 and Hsp90 in the assembly of the replicase complex of a positive-strand RNA plant virus." Journal of virology **86**(22): 12091-12104.
- Miralles, R., P. J. Gerrish, A. Moya and S. F. Elena (1999). "Clonal interference and the evolution of RNA viruses." Science **285**(5434): 1745-1747.
- Miras, M., W. A. Miller, V. Truniger and M. A. Aranda (2017). "Non-canonical translation in plant RNA viruses." Frontiers in plant science **8**.
- Miyamoto, Y., N. Imamoto, T. Sekimoto, T. Tachibana, T. Seki, S. Tada, T. Enomoto and Y. Yoneda (1997). "Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors." Journal of Biological Chemistry **272**(42): 26375-26381.
- Moffett, P. (2009). "Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance." Adv Virus Res **75**: 1-33.
- Moreno, P., S. AmbrOS, M. R. ALBIACH-MARTÍ, J. Guerri and L. Pena (2008). "Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry." Molecular Plant Pathology **9**(2): 251-268.
- Moreno, P., J. Guerri, J. Ballester-Olmos and M. Martinez (1991). Segregation of citrus tristeza virus strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. Proc. 11th Conf. IOCV.
- Moreno, P., J. Guerri and N. Muñoz (1990). "Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA." Phytopathology **80**(5): 477-482.
- Moreno, P., L. Navarro, C. Fuentes, J. Pina, J. Ballester, A. Hermoso de Mendoza, J. Juarez and M. Cambra (1983). "La tristeza de los agrios." Problemática en España. INIA Madrid, España. Hoja Técnica HT **47**: 28.

Morgan, M. J., M. Lehmann, M. Schwarzländer, C. J. Baxter, A. Sienkiewicz-Porzucek, T. C. Williams, N. Schauer, A. R. Fernie, M. D. Fricker and R. G. Ratcliffe (2008). "Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis." Plant Physiology **147**(1): 101-114.

Mosammaparast, N. and L. F. Pemberton (2004). "Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators." Trends in cell biology **14**(10): 547-556.

Muller, A. (1987). "Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization." Phytophylactica **19**(2): 197-198.

Muller, H. J. (1964). "The relation of recombination to mutational advance." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **1**(1): 2-9.

Mur, L. A., L. J. Laarhoven, F. J. Harren, M. A. Hall and A. R. Smith (2008). "Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response." Plant Physiology **148**(3): 1537-1546.

Musinova, Y. R., O. M. Lisitsyna, S. A. Golyshev, A. I. Tuzhikov, V. Y. Polyakov and E. V. Sheval (2011). "Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1813**(1): 27-38.

Mérai, Z., Z. Kerényi, S. Kertész, M. Magna, L. Lakatos and D. Silhavy (2006). "Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing." Journal of Virology **80**(12): 5747-5756.

Mérai, Z., Z. Kerényi, A. Molnár, E. Barta, A. Válóczy, G. Bisztray, Z. Havelda, J. Burgyán and D. Silhavy (2005). "Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity." Journal of Virology **79**(11): 7217-7226.

Müller, G., A. Costa, E. Kitajima and I. Camargo (1974). Additional evidence that tristeza virus multiplies in Passiflora spp. Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, University of California, Division of Agricultural Sciences Berkeley, CA.

Nadler, S. G., D. Tritschler, O. K. Haffar, J. Blake, A. G. Bruce and J. S. Cleaveland (1997). "Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin α with nuclear localization sequences." Journal of Biological Chemistry **272**(7): 4310-4315.

Nagy, P. D. (2008). Recombination in plant RNA viruses. Plant virus evolution, Springer: 133-156.

Nagy, P. D., J. Pogany and J.-Y. Lin (2014). "How yeast can be used as a genetic platform to explore virus–host interactions: from ‘omics’ to functional studies." Trends in microbiology **22**(6): 309-316.

Nagy, P. D. and A. E. Simon (1997). "New insights into the mechanisms of RNA recombination." Virology **235**(1): 1-9.

Nakasugi, K., R. N. Crowhurst, J. Bally, C. C. Wood, R. P. Hellens and P. M. Waterhouse (2013). "De novo transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*." PloS one **8**(3): e59534.

Nakazawa, Y., A. Hiraguri, H. Moriyama and T. Fukuhara (2007). "The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway." Plant Mol Biol **63**(6): 777-785.

Napuli, A. J., B. W. Falk and V. V. Dolja (2000). "Interaction between HSP70 homolog and filamentous virions of the Beet yellows virus." Virology **274**(1): 232-239.

Narváez, G., B. S. Skander, M. A. Ayllon, L. Rubio, J. Guerri and P. Moreno (2000). "A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes." Journal of Virological Methods **85**(1): 83-92.

Navarro, L., J. Pina, J. Juárez, J. Ballester-Olmos, J. Arregui, C. Ortega, A. Navarro, N. Duran-Vila, J. Guerri and P. Moreno (2002).

The citrus variety improvement program in Spain in the period 1975–2001. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV Riverside, CA.

Navas-castillo, J., M. R. ALBIACH-MARTÍ, S. Gowda, M. E. HILF, S. M. GARNSEY and W. O. DAWSON (1997). "Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs." Virology **228**(1): 92-97.

Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olivé and S. Sánchez-Campos (2011). "Emerging virus diseases transmitted by whiteflies." Annual review of phytopathology **49**: 219-248.

Navas-Castillo, J., S. Sanchez-Campos, E. Noris, D. Louro, G. Accotto and E. Moriones (2000). "Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus." Journal of General Virology **81**(11): 2797-2801.

Nchongboh, C. G., G.-w. Wu, N. Hong and G.-p. Wang (2014). "Protein–protein interactions between proteins of Citrus tristeza virus isolates." Virus genes **49**(3): 456-465.

Nelson, R. S. and V. Citovsky (2005). "Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways." Plant Physiology **138**(4): 1809-1814.

Ni, P. and C. C. Kao (2013). "Non-encapsidation activities of the capsid proteins of positive-strand RNA viruses." Virology **446**(1): 123-132.

Nieto, C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet, A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomenech, M. Pitrat, M. Caboche and C. Dogimont (2006). "An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon." The Plant Journal **48**(3): 452-462.

Nikolaeva, O. V., A. V. Karasev, S. M. Garnsey and R. F. Lee (1998). "Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange." Plant Disease **82**(11): 1276-1280.

Nolasco, G., C. De Blas, V. Torres and F. Ponz (1993). "A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate

for the detection of plant viruses and subviral pathogens." Journal of Virological Methods **45**(2): 201-218.

Norman, P., R. Sutton and A. Burditt (1968). "Factors affecting transmission of tristeza virus by melon aphids." Journal of Economic Entomology **61**(1): 238-242.

Novella, I. and B. Ebendick-Corpus (2004). "Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus." Journal of molecular biology **342**(5): 1423-1430.

Ochs, R., M. Lischwe, W. Spohn and H. Busch (1985). "Fibrillarlin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera." Biology of the Cell **54**(2): 123-133.

Olmos, A., M. Cambra, O. Esteban, M. T. Gorris and E. Terrada (1999). "New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube." Nucleic acids research **27**(6): 1564-1565.

Olsper, A., K. Kamsol, C. Sarmiento, J. Gerassimenko and E. Truve (2014). "Cocksfoot mottle virus coat protein is dispensable for the systemic infection." Virology journal **11**(1): 19.

Olsper, A., H. Paves, R. Toomela, T. Tamm and E. Truve (2010). "Cocksfoot mottle sobemovirus coat protein contains two nuclear localization signals." Virus genes **40**(3): 423-431.

Osborn, A. E. (1996). "Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack." Plant Cell **8**(10): 1821-1831.

Osman, T. and K. Buck (1997). "The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3." Journal of virology **71**(8): 6075-6082.

Pacheco, R., A. García-Marcos, A. Manzano, M. G. de Lacoba, G. Camañes, P. García-Agustín, J. R. Díaz-Ruíz and F. Tenllado (2012). "Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death." Molecular Plant-Microbe Interactions **25**(5): 709-723.

- Pagán, I., N. Montes, M. G. Milgroom and F. García-Arenal (2014). "Vertical transmission selects for reduced virulence in a plant virus and for increased resistance in the host." PLoS Pathog **10**(7): e1004293.
- Pallas, V. and J. A. García (2011). "How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components." Journal of General Virology **92**(12): 2691-2705.
- Pappu, H., A. Karasev, E. Anderson, S. Pappu, M. Hilf, V. Febres, R. Eckloff, M. McCaffery, V. Boyko and S. Gowda (1994). "Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome." Virology **199**(1): 35-46.
- Parent, J. S., N. Bouteiller, T. Elmayan and H. Vaucheret (2015). "Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing." The Plant Journal **81**(2): 223-232.
- Park, M.-R., S.-H. Park, S.-Y. Cho and K.-H. Kim (2009). "Nicotiana benthamiana protein, NbPCIP1, interacting with Potato virus X coat protein plays a role as susceptible factor for viral infection." Virology **386**(2): 257-269.
- Park, S.-W., E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher and D. F. Klessig (2007). "Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance." Science **318**(5847): 113-116.
- Pathak, K. B., Z. Sasvari and P. D. Nagy (2008). "The host Pex19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins." Virology **379**(2): 294-305.
- Pazhouhandeh, M., M. Dieterle, K. Marrocco, E. Lechner, B. Berry, V. Brault, O. Hemmer, T. Kretsch, K. E. Richards and P. Genschik (2006). "F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(6): 1994-1999.
- Peiris, J., S. Lai, L. Poon, Y. Guan, L. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W. Yee, W. Yan and M. Cheung (2003). "Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome." The Lancet **361**(9366): 1319-1325.

Pena, L., M. Cervera, J. Juárez, C. Ortega, J. Pina, N. Durán-Vila and L. Navarro (1995). "High efficiency Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus." Plant Science **104**(2): 183-191.

Peng, C.-W., A. J. Napuli and V. V. Dolja (2003). "Leader proteinase of beet yellows virus functions in long-distance transport." Journal of virology **77**(5): 2843-2849.

Peremyslov, V. V., I. A. Andreev, A. I. Prokhnevsky, G. H. Duncan, M. E. Taliansky and V. V. Dolja (2004). "Complex molecular architecture of beet yellows virus particles." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(14): 5030-5035.

Peremyslov, V. V., Y. Hagiwara and V. V. Dolja (1998). "Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus." Journal of virology **72**(7): 5870-5876.

Peremyslov, V. V., Y. Hagiwara and V. V. Dolja (1999). "HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(26): 14771-14776.

Perl-Treves, R., R. C. Foley, W. Chen and K. B. Singh (2004). "Early induction of the Arabidopsis GSTF8 promoter by specific strains of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*." Molecular plant-microbe interactions **17**(1): 70-80.

Permar, T., S. Garnsey, D. Gumpf and R. Lee (1990). "A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus." Phytopathology **80**(3): 224-228.

Peters, R. (2006). "Introduction to nucleocytoplasmic transport: molecules and mechanisms." Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction: 235-258.

Pevzner, P. A., V. Dančík and C. L. Tang (2000). "Mutation-tolerant protein identification by mass spectrometry." Journal of Computational Biology **7**(6): 777-787.

- Peña, E. J., I. Ferriol, A. Sambade, H. Buschmann, A. Niehl, S. F. Elena, L. Rubio and M. Heinlein (2014). "Experimental virus evolution reveals a role of plant microtubule dynamics and TORTIFOLIA1/SPIRAL2 in RNA trafficking." *PloS one* **9**(8): e105364.
- Peña, L., M. Cervera, J. Juárez, A. Navarro, J. A. Pina, N. Durán-Vila and L. Navarro (1995). "Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants." *Plant Cell Reports* **14**(10): 616-619.
- Peña, L. and A. Séguin (2001). "Recent advances in the genetic transformation of trees." *TRENDS in Biotechnology* **19**(12): 500-506.
- Pieterse, C. M., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes and S. C. Van Wees (2012). "Hormonal modulation of plant immunity." *Annual review of cell and developmental biology* **28**: 489-521.
- Prokhnevsky, A. I., V. V. Peremyslov, A. J. Napuli and V. V. Dolja (2002). "Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of beet yellows virus." *Journal of virology* **76**(21): 11003-11011.
- Qi, Y., U. Armbruster, C. Schmitz-Linneweber, E. Delannoy, A. F. de Longevialle, T. Rühle, I. Small, P. Jahns and D. Leister (2012). "Arabidopsis CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts." *Journal of experimental botany* **63**(3): 1251-1270.
- Qi, Y., A. M. Denli and G. J. Hannon (2005). "Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways." *Molecular cell* **19**(3): 421-428.
- Qu, F. and T. J. Morris (2005). "Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections." *FEBS Lett* **579**(26): 5958-5964.
- Qu, F. and T. J. Morris (2005). "Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections." *FEBS letters* **579**(26): 5958-5964.

- Qu, F., T. Ren and T. J. Morris (2003). "The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step." Journal of virology **77**(1): 511-522.
- Qu, F., X. Ye and T. J. Morris (2008). "Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(38): 14732-14737.
- Quimby, B. B. and M. Dasso (2003). "The small GTPase Ran: interpreting the signs." Current opinion in cell biology **15**(3): 338-344.
- Raccah, B., G. Loebenstein and S. Singer (1980). "Aphid-transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees." Phytopathology **70**(2): 89-93.
- Raccah, S. (1987). "Incidence and vector potential of the aphids which transmit citrus tristeza virus in Israel." Phytophylactica **19**(2): 173-178.
- Rai, M. (2006). "Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in Poncirus trifoliata and generation of transgenic grapefruit (Citrus paradisi) plant lines with candidate resistance genes in this region." Plant molecular biology **61**(3): 399-414.
- Raja, P., J. N. Jackel, S. Li, I. M. Heard and D. M. Bisaro (2014). "Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses." Journal of virology **88**(5): 2611-2622.
- Raja, P., B. C. Sanville, R. C. Buchmann and D. M. Bisaro (2008). "Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses." Journal of Virology **82**(18): 8997-9007.
- Rajamäki, M.-L. and J. P. Valkonen (2009). "Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in Nicotiana species." The Plant Cell **21**(8): 2485-2502.

- Reed, J. C., K. D. Kasschau, A. I. Prokhnevsky, K. Gopinath, G. P. Pogue, J. C. Carrington and V. V. Dolja (2003). "Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus." Virology **306**(2): 203-209.
- Restrepo, M. A., D. D. Freed and J. C. Carrington (1990). "Nuclear transport of plant potyviral proteins." The Plant Cell **2**(10): 987-998.
- Rico, P., P. Ivars, S. F. Elena and C. Hernández (2006). "Insights into the selective pressures restricting Pelargonium flower break virus genome variability: evidence for host adaptation." Journal of virology **80**(16): 8124-8132.
- Robaglia, C. and C. Caranta (2006). "Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection." Trends Plant Sci **11**(1): 40-45.
- Roberts, B. L., W. D. Richardson and A. E. Smith (1987). "The effect of protein context on nuclear location signal function." Cell **50**(3): 465-475.
- Rodríguez-Cerezo, E., S. F. Elena, A. Moya and F. García-Arenal (1991). "High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus." Journal of molecular evolution **32**(4): 328-332.
- Roistacher, C., M. Bar-Joseph and D. Gumpf (1984). "Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by small populations of *Aphis gossypii*." Plant Disease **68**(6): 494-496.
- Roistacher, C., D. Gumpf, J. Dodds and R. Lee (1991). "The threat of the citrus killer." Citrograph **76**(10): 4-5.
- Roistacher, C. and P. Moreno (1991). The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. A review. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, University of California Riverside.
- Roistacher, C., E. Nauer, A. Kishaba and E. Calavan (1980). Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. Proceedings of the conference International Organization of Citrus Virologists.

Roistacher, C. N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis, Food & Agriculture Org.

Roistacher, M. (1987). "Aphid transmission of citrus tristeza virus: a review." Phytophylactica **19**(2): 163-168.

Roossinck, M. J. (1997). "Mechanisms of plant virus evolution." Annual review of phytopathology **35**(1): 191-209.

Roossinck, M. J. (2003). "Plant RNA virus evolution." Current opinion in microbiology **6**(4): 406-409.

Roossinck, M. J. (2008). Plant virus evolution, Springer.

Rosner, A. and M. Bar-Joseph (1984). "Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences." Virology **139**(1): 189-193.

Rosner, A., R. Lee and M. Bar-Joseph (1986). "Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus." Phytopathology (USA).

Roth, B. M., G. J. Pruss and V. B. Vance (2004). "Plant viral suppressors of RNA silencing." Virus research **102**(1): 97-108.

Roy, A. and R. Brlansky (2010). "Genome analysis of an orange stem pitting Citrus tristeza virus isolate reveals a novel recombinant genotype." Virus research **151**(2): 118-130.

Roy, A., P. Ramachandran and R. Brlansky (2003). "Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns." Archives of virology **148**(4): 707-722.

Rubio, L., Y. Abou-Jawdah, H.-X. Lin and B. W. Falk (2001). "Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene." Journal of General Virology **82**(4): 929-933.

RUBIO, L., M. AYLLONI, J. GUERRI, H. PAPPU, C. NIBLETT and P. MORENO (1996). "Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene." Annals of applied biology **129**(3): 479-489.

Rubio, L., M. a. A. Ayllón, P. Kong, A. Fernández, M. Polek, J. Guerri, P. Moreno and B. W. Falk (2001). "Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination." Journal of Virology **75**(17): 8054-8062.

Rubio, L., J. Guerri and P. Moreno (2013). "Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae." Frontiers in microbiology **4**.

Ruiz Ruiz, S. (2009). "El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz."

Ruiz-Jarabo, C. M., A. Arias, E. Baranowski, C. Escarmís and E. Domingo (2000). "Memory in viral quasispecies." Journal of virology **74**(8): 3543-3547.

Ruiz-Medrano, R., B. Xoconostle-Cazares and F. Kragler (2004). "The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses." Current opinion in plant biology **7**(6): 641-650.

Ruiz-Ruiz, S., P. Moreno, J. Guerri and S. Ambros (2006). "The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of Citrus tristeza virus from Spain: comparison with isolates from different origins." Archives of Virology **151**(2): 387-398.

Ruiz-Ruiz, S., P. Moreno, J. Guerri and S. Ambrós (2007). "A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues." Journal of Virological Methods **145**(2): 96-105.

Ruiz-Ruiz, S., B. Navarro, A. Gisel, L. Pena, L. Navarro, P. Moreno, F. Di Serio and R. Flores (2011). "Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21–24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile." Plant molecular biology **75**(6): 607-619.

Ruiz-Ruiz, S., N. Soler, J. Sánchez-Navarro, C. Fagoaga, C. López, L. Navarro, P. Moreno, L. Peña and R. Flores (2013). "Citrus tristeza

virus p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis." Molecular Plant-Microbe Interactions **26**(3): 306-318.

Sablowski, R., D. C. Baulcombe and M. Bevan (1995). "Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(15): 6901-6905.

Salonen, A., T. Ahola and L. Kääriäinen (2004). Viral RNA replication in association with cellular membranes. Membrane trafficking in viral replication, Springer: 139-173.

Sambade, A., S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri and P. Moreno (2007). "Preferential accumulation of severe variants of Citrus tristeza virus in plants co-inoculated with mild and severe variants." Archives of virology **152**(6): 1115-1126.

Sambade, A., K. Brandner, C. Hofmann, M. Seemanpillai, J. Mutterer and M. Heinlein (2008). "Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata." Traffic **9**(12): 2073-2088.

Sambade, A., C. López, L. Rubio, R. Flores, J. Guerri and P. Moreno (2003). "Polymorphism of a specific region in gene p23 of Citrus tristeza virus allows discrimination between mild and severe isolates." Archives of Virology **148**(12): 2325-2340.

Sambade, A., L. Rubio, S. Garnsey, N. Costa, G. Müller, M. Peyrou, J. Guerri and P. Moreno (2002). "Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection." Plant pathology **51**(3): 257-265.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press.

Sanjuan, R., M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky and R. Belshaw (2010). "Viral mutation rates." Journal of virology **84**(19): 9733-9748.

Sanjuán, R., P. Agudelo-Romero and S. F. Elena (2009). "Upper-limit mutation rate estimation for a plant RNA virus." Biology letters **5**(3): 394-396.

Sanjuán, R., J. M. Cuevas, V. Furió, E. C. Holmes and A. Moya (2007). "Selection for robustness in mutagenized RNA viruses." PLoS Genet **3**(6): e93.

Sanz, A. I., A. Fraile, J. M. Gallego, J. M. Malpica and F. García-Arenal (1999). "Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus." Journal of molecular evolution **49**(5): 672-681.

Sanz, A. I., A. Fraile, F. García-Arenal, X. Zhou, D. J. Robinson, S. Khalid, T. Butt and B. D. Harrison (2000). "Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan." Journal of General Virology **81**(7): 1839-1849.

Saponari, M., K. Manjunath and R. K. Yokomi (2008). "Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®)." Journal of Virological Methods **147**(1): 43-53.

Sasaki, A. (1981). "Further evidence of protective interference between citrus vein-eneation and tristeza viruses [in Hassaku, Citrus hassaku]." Bulletin of Fruit Tree Experiment Station of Hiroshima Prefecture (Japan).

Sasikumar, A. N., W. B. Perez and T. G. Kinzy (2012). "The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA **3**(4): 543-555.

Sasvari, Z., L. Izotova, T. G. Kinzy and P. D. Nagy (2011). "Synergistic roles of eukaryotic translation elongation factors 1By and 1A in stimulation of tombusvirus minus-strand synthesis." PLoS Pathog **7**(12): e1002438.

Satyanarayana, T., M. Bar-Joseph, M. Mawassi, M. Albiach-Martí, M. Ayllón, S. Gowda, M. Hilf, P. Moreno, S. Garnsey and W. Dawson (2001). "Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees." Virology **280**(1): 87-96.

Satyanarayana, T., S. Gowda, M. A. Ayllón, M. R. Albiach-Martí, S. Rabindran and W. O. Dawson (2002). "The p23 protein of Citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation." Journal of virology **76**(2): 473-483.

Satyanarayana, T., S. Gowda, M. A. Ayllón and W. O. Dawson (2003). "Frameshift mutations in infectious cDNA clones of Citrus tristeza virus: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to Escherichia coli." Virology **313**(2): 481-491.

Satyanarayana, T., S. Gowda, M. A. Ayllón and W. O. Dawson (2004). "Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(3): 799-804.

Satyanarayana, T., S. Gowda, M. a. A. Ayllón, M. a. R. Albiach-Martí and W. O. Dawson (2002). "Mutational analysis of the replication signals in the 3'-nontranslated region of Citrus tristeza virus." Virology **300**(1): 140-152.

Satyanarayana, T., S. Gowda, V. Boyko, M. Albiach-Martí, M. Mawassi, J. Navas-Castillo, A. Karasev, V. Dolja, M. Hilf and D. Lewandowski (1999). "An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(13): 7433-7438.

Satyanarayana, T., S. Gowda, M. Mawassi, M. R. Albiach-Martí, M. A. Ayllón, C. Robertson, S. M. Garnsey and W. O. Dawson (2000). "Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly." Virology **278**(1): 253-265.

Scherbakov, D. and M. Garber (2000). "Overlapping genes in bacterial and phage genomes." Molecular Biology **34**(4): 485-495.

Schneider, H. (1957). The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. Citrus virus diseases. Proc. Conf. Citrus Virus Diseases, Riverside, Calif.

Scholthof, H. B. (2005). "Plant virus transport: motions of functional equivalence." Trends in plant science **10**(8): 376-382.

Scholthof, H. B., V. Y. Alvarado, J. C. Vega-Arreguin, J. Ciomperlik, D. Odokonyero, C. Brosseau, M. Jaubert, A. Zamora and P. Moffett (2011). "Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*." Plant physiology **156**(3): 1548-1555.

Scholthof, H. B., K. Scholthof and A. O. Jackson (1995). "Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector." The Plant Cell **7**(8): 1157-1172.

Schuster, P. and J. Swetina (1988). "Stationary mutant distributions and evolutionary optimization." Bulletin of mathematical biology **50**(6): 635-660.

Schwach, F., F. E. Vaistij, L. Jones and D. C. Baulcombe (2005). "An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal." Plant physiology **138**(4): 1842-1852.

Schwartz, M., J. Chen, W.-M. Lee, M. Janda and P. Ahlquist (2004). "Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(31): 11263-11268.

Sekiya, M. E., S. D. Lawrence, M. McCaffery and K. Cline (1991). "Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus." Journal of general virology **72**(5): 1013-1020.

Sentandreu, V., J. Castro, M. Ayllon, L. Rubio, J. Guerri, F. Gonzalez-Candelas, P. Moreno and A. Moya (2006). "Evolutionary analysis of genetic variation observed in Citrus tristeza virus (CTV) after host passage." Archives of virology **151**(5): 875-894.

Senthil-Kumar, M. and K. S. Mysore (2011). "New dimensions for VIGS in plant functional genomics." Trends in plant science **16**(12): 656-665.

Serva, S. and P. D. Nagy (2006). "Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication." Journal of virology **80**(5): 2162-2169.

Sharma, P., R. K. Gaur and M. Ikegami (2011). "Subcellular localization of V2 protein of Tomato leaf curl Java virus by using green fluorescent protein and yeast hybrid system." Protoplasma **248**(2): 281-288.

Sharma, P. and M. Ikegami (2009). "Characterization of signals that dictate nuclear/nucleolar and cytoplasmic shuttling of the capsid protein of Tomato leaf curl Java virus associated with DNA β satellite." Virus research **144**(1): 145-153.

Shaw, J., A. J. Love, S. S. Makarova, N. O. Kalinina, B. D. Harrison and M. E. Taliany (2014). "Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa." Nucleus **5**(1): 85-94.

Shaw, P. and J. Brown (2012). "Nucleoli: composition, function, and dynamics." Plant physiology **158**(1): 44-51.

Shi, B.-J., J. Miller, R. H. Symons and P. Palukaitis (2003). "The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses." Molecular plant-microbe interactions **16**(3): 261-267.

Shirasu, K. and P. Schulze-Lefert (2003). "Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways." Trends Plant Sci **8**(6): 252-258.

Shyu, Y. J., C. D. Suarez and C.-D. Hu (2008). "Visualization of AP-1–NF- κ B ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(1): 151-156.

Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. Plasterk and A. Fire (2001). "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing." Cell **107**(4): 465-476.

- Silva, G., N. Marques and G. Nolasco (2012). "The evolutionary rate of Citrus tristeza virus ranks among the rates of the slowest RNA viruses." Journal of General Virology **93**(2): 419-429.
- Siomi, H. and G. Dreyfuss (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." Journal of Cell Biology **129**(3): 551-560.
- Sirover, M. A. (1999). "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1432**(2): 159-184.
- Sirover, M. A. (2005). "New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells." Journal of cellular biochemistry **95**(1): 45-52.
- Smith, G. P. and V. A. Petrenko (1997). "Phage display." Chemical reviews **97**(2): 391-410.
- Smith, J. R., P. A. Clarke, E. de Billy and P. Workman (2009). "Silencing the cochaperone CDC37 destabilises kinase clients and sensitises cancer cells to HSP90 inhibitors." Oncogene **28**(2): 157.
- Soitamo, A. J., B. Jada and K. Lehto (2011). "HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers." BMC plant biology **11**(1): 68.
- Soler, N., M. Plomer, C. Fagoaga, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña (2012). "Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus." Plant biotechnology journal **10**(5): 597-608.
- Song, J. J. and L. Joshua-Tor (2006). "Argonaute and RNA--getting into the groove." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 5-11.
- Song, P., X. Chen, B. Wu, L. Gao, H. Zhi and X. Cui (2016). "Identification for soybean host factors interacting with P3N-PIPO protein of Soybean mosaic virus." Acta physiologiae plantarum **38**(6): 131.

Song, X., H. Yu, X. Chen, Y. Lasanajak, M. M. Tappert, G. M. Air, V. K. Tiwari, H. Cao, H. A. Chokhawala and H. Zheng (2011). "A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses." Journal of Biological Chemistry **286**(36): 31610-31622.

Soosaar, J. L., T. M. Burch-Smith and S. P. Dinesh-Kumar (2005). "Mechanisms of plant resistance to viruses." Nat Rev Microbiol **3**(10): 789-798.

Spoel, S. H. and X. Dong (2012). "How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells." Nat Rev Immunol **12**(2): 89-100.

Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis and J. D. Jones (1995). "Molecular genetics of plant disease resistance." Science **268**(5211): 661-667.

Steinhauer, D., J. C. de la Torre, E. Meier and J. Holland (1989). "Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus." Journal of virology **63**(5): 2072-2080.

SUASTIKA, C., T. Natsuaki, H. Terui, T. Kano, H. Ieki and S. Okuda (2001). "Nucleotide sequence of Citrus tristeza virus seedling yellows isolate." Journal of General Plant Pathology **67**(1): 73-77.

Sun, L., B. Jing, I. B. Andika, Y. Hu, B. Sun, R. Xiang, H. Kondo and J. Chen (2013). "Nucleo-cytoplasmic shuttling of VPg encoded by Wheat yellow mosaic virus requires association with the coat protein." Journal of General Virology **94**(12): 2790-2802.

Supek, F., M. Bošnjak, N. Škunca and T. Šmuc (2011). "REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms." PloS one **6**(7): e21800.

Synkova, H., S. Semoradova, R. Schnablová, E. Witters, M. Husak and R. Valcke (2006). "Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic Pssu-ipt tobacco during plant ontogeny." Biologia plantarum **50**(1): 31-41.

Sánchez, R., F. Serra, J. Tárraga, I. Medina, J. Carbonell, L. Pulido, A. de María, S. Capella-Gutierrez, J. Huerta-Cepas and T. Gabaldón

(2011). "Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing." Nucleic Acids Research **39**(suppl 2): W470-W474.

Tada, Y., S. H. Spoel, K. Pajerowska-Mukhtar, Z. Mou, J. Song, C. Wang, J. Zuo and X. Dong (2008). "Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins." Science **321**(5891): 952-956.

Tajima, F. (1989). "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism." Genetics **123**(3): 585-595.

Takahashi, A., C. Casais, K. Ichimura and K. Shirasu (2003). "HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(20): 11777-11782.

Taliansky, M., J. Brown, M. Rajamäki, J. Valkonen and N. Kalinina (2010). "5 Involvement of the Plant Nucleolus in Virus and Viroid Infections: Parallels with Animal Pathosystems." Advances in virus research **77**: 119.

Tamura, K., M. Nei and S. Kumar (2004). "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(30): 11030-11035.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." Molecular biology and evolution **30**(12): 2725-2729.

Tan, Z., A. J. Gibbs, Y. Tomitaka, F. Sanchez, F. Ponz and K. Ohshima (2005). "Mutations in Turnip mosaic virus genomes that have adapted to *Raphanus sativus*." Journal of General Virology **86**(2): 501-510.

Tatineni, S. and W. O. Dawson (2012). "Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from Citrus tristeza virus." Journal of virology **86**(15): 7850-7857.

Tatineni, S., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, M. Bar-Joseph, S. Gowda and W. O. Dawson (2008). "Three genes of Citrus tristeza

virus are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees." Virology **376**(2): 297-307.

Tatineni, S., C. J. Robertson, S. M. Garnsey and W. O. Dawson (2011). "A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(42): 17366-17371.

Taylor, J. A. and R. S. Johnson (1997). "Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry." Rapid communications in mass spectrometry **11**(9): 1067-1075.

Thomas, C. L., V. Leh, C. Lederer and A. J. Maule (2003). "Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*." Virology **306**(1): 33-41.

Tiganis, T., A. J. Flint, S. A. Adam and N. K. Tonks (1997). "Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97." Journal of Biological Chemistry **272**(34): 21548-21557.

Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." Genes Dev **19**(5): 517-529.

Tomita, Y., T. Mizuno, J. Díez, S. Naito, P. Ahlquist and M. Ishikawa (2003). "Mutation of host DnaJ homolog inhibits brome mosaic virus negative-strand RNA synthesis." Journal of virology **77**(5): 2990-2997.

Torrance, L., I. A. Andreev, R. Gabrenaite-Verhovskaya, G. Cowan, K. Mäkinen and M. E. Taliany (2006). "An unusual structure at one end of potato potyvirus particles." Journal of molecular biology **357**(1): 1-8.

Tristan, C., N. Shahani, T. W. Sedlak and A. Sawa (2011). "The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments." Cellular signalling **23**(2): 317-323.

Tromas, N. and S. F. Elena (2010). "The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus." Genetics **185**(3): 983-989.

- Tromas, N., M. P. Zwart, G. Lafforgue and S. F. Elena (2014). "Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level." PLoS genetics **10**(2): e1004186.
- Trombetta, C., S. Piccirella, D. Perini, O. Kistner and E. Montomoli (2015). "Emerging influenza strains in the last two decades: a threat of a new pandemic?" Vaccines **3**(1): 172-185.
- Truant, R. and B. R. Cullen (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin β -dependent nuclear localization signals." Molecular and cellular biology **19**(2): 1210-1217.
- Truman, W. M., M. H. Bennett, C. G. Turnbull and M. R. Grant (2010). "Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds." Plant physiology **152**(3): 1562-1573.
- Truniger, V. and M. A. Aranda (2009). "Recessive resistance to plant viruses." Adv Virus Res **75**: 119-159.
- Truniger, V., C. Nieto, D. González-Ibeas and M. Aranda (2008). "Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a Carmovirus (Tombusviridae): cap-independent translation of a viral RNA controlled in cis by an (a) virulence determinant." The Plant Journal **56**(5): 716-727.
- Uhrig, J. F., T. Canto, D. Marshall and S. A. MacFarlane (2004). "Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the tomato bushy stunt virus P19 pathogenicity protein." Plant physiology **135**(4): 2411-2423.
- Vaistij, F. E., L. Jones and D. C. Baulcombe (2002). "Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase." Plant Cell **14**(4): 857-867.
- Valli, A., J. J. López-Moya and J. A. García (2009). "RNA Silencing and its Suppressors in the Plant-virus Interplay." eLS.

Van Damme, E. J., A. Barre, P. Rougé and W. J. Peumans (2004). "Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein." Plant J **37**(1): 34-45.

Vela, C., M. Cambra, E. Cortés, P. Moreno, J. Miguét, C. P. de San Román and A. Sanz (1986). "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis." Journal of general Virology **67**(1): 91-96.

Vives, M., L. Rubio, J. Navas-Castillo, M. Albiach-Mart, W. Dawson, J. Guerri, R. Flores and P. Moreno (1999). "The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus tristeza virus isolate." Journal of General Virology **80**(3): 811-816.

Vives, M. C., L. Rubio, A. Sambade, T. E. Mirkov, P. Moreno and J. Guerri (2005). "Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a Citrus tristeza virus isolate." Virology **331**(2): 232-237.

Vlot, A. C., D. M. A. Dempsey and D. F. Klessig (2009). "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease." Annual review of phytopathology **47**: 177-206.

Vlot, A. C., D. F. Klessig and S. W. Park (2008). "Systemic acquired resistance: the elusive signal(s)." Curr Opin Plant Biol **11**(4): 436-442.

Vlot, A. C., P. P. Liu, R. K. Cameron, S. W. Park, Y. Yang, D. Kumar, F. Zhou, T. Padukkavidana, C. Gustafsson, E. Pichersky and D. F. Klessig (2008). "Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*." Plant J **56**(3): 445-456.

Vogler, H., M.-O. Kwon, V. Dang, A. Sambade, M. Fasler, J. Ashby and M. Heinlein (2008). "Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing." PLoS Pathog **4**(4): e1000038.

Voinnet, O. (2001). "RNA silencing as a plant immune system against viruses." Trends Genet **17**(8): 449-459.

- Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." Nat Rev Genet **6**(3): 206-220.
- Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." Nature reviews. Genetics **6**(3).
- Voinnet, O., Y. M. Pinto and D. C. Baulcombe (1999). "Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(24): 14147-14152.
- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre and D. Baulcombe (2003). "Retracted: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." The Plant Journal **33**(5): 949-956.
- Waigmann, E., S. Ueki, K. Trutnyeva and V. Citovsky (2004). "The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses." Critical Reviews in Plant Sciences **23**(3): 195-250.
- Wallace, J. (1978). "Virus and viruslike diseases [of citrus]." Citrus Industry Berkeley. University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Wallis, C. M., A. L. Stone, D. J. Sherman, V. D. Damsteegt, F. E. Gildow and W. L. Schneider (2007). "Adaptation of plum pox virus to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages." Journal of general virology **88**(10): 2839-2845.
- Wang, A. (2015). "Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors." Annual review of phytopathology **53**: 45-66.
- Wang, H., X. Zhang, J. Liu, T. Kiba, J. Woo, T. Ojo, M. Hafner, T. Tuschl, N. H. Chua and X. J. Wang (2011). "Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions." The plant journal **67**(2): 292-304.
- Wang, R. Y.-L. and P. D. Nagy (2008). "Tomato bushy stunt virus coopts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis." Cell Host & Microbe **3**(3): 178-187.

- Wang, R. Y.-L., J. Stork and P. D. Nagy (2009). "A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes." Journal of virology **83**(7): 3276-3287.
- Wang, Y., M. Dang, H. Hou, Y. Mei, Y. Qian and X. Zhou (2014). "Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a mastrevirus." Journal of General Virology **95**(9): 2082-2088.
- Wang, Y., T. Tzfira, V. Gaba, V. Citovsky, P. Palukaitis and A. Gal-On (2004). "Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization." Journal of general virology **85**(10): 3135-3147.
- Ward, B. M. and S. G. Lazarowitz (1999). "Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay." The Plant Cell **11**(7): 1267-1276.
- Wassenegger, M. and G. Krczal (2006). "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases." Trends Plant Sci **11**(3): 142-151.
- Whitham, S. A. and Y. Wang (2004). "Roles for host factors in plant viral pathogenicity." Current opinion in plant biology **7**(4): 365-371.
- Whitham, S. A., C. Yang and M. M. Goodin (2006). "Global impact: elucidating plant responses to viral infection." Molecular plant-microbe interactions **19**(11): 1207-1215.
- Whitlock, M. C. (1996). "The red queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth." The American Naturalist **148**: S65-S77.
- Wilke, C. O. and C. Ronnewinkel (2001). "Dynamic fitness landscapes: Expansions for small mutation rates." Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **290**(3): 475-490.
- Woolhouse, M. E., L. H. Taylor and D. T. Haydon (2001). "Population biology of multihost pathogens." science **292**(5519): 1109-1112.
- Wright, K. M., N. T. Wood, A. G. Roberts, S. Chapman, P. Boevink, K. M. MacKenzie and K. J. Oparka (2007). "Targeting of TMV

movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network; evidence from FRAP." Traffic **8**(1): 21-31.

Wu, Y., D. Zhang, J. Y. Chu, P. Boyle, Y. Wang, I. D. Brindle, V. De Luca and C. Després (2012). "The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid." Cell reports **1**(6): 639-647.

Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen and J. C. Carrington (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." PLoS Biol **2**(5): e104.

Xiong, R., J. Wu, Y. Zhou and X. Zhou (2009). "Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by Rice stripe tenuivirus." Virology **387**(1): 29-40.

Xu, P. and M. J. Roossinck (2000). "Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato." Plant Cell **12**(7): 1079-1092.

Xu, P., H. Wang, F. Coker, J. Y. Ma, Y. Tang, M. Taylor and M. J. Roossinck (2012). "Genetic loci controlling lethal cell death in tomato caused by viral satellite RNA infection." Mol Plant Microbe Interact **25**(8): 1034-1044.

Yaakov, N., Y. Levy, E. Belausov, V. Gaba, M. Lapidot and Y. Gafni (2011). "Effect of a single amino acid substitution in the NLS domain of Tomato yellow leaf curl virus-Israel (TYLCV-IL) capsid protein (CP) on its activity and on the virus life cycle." Virus research **158**(1): 8-11.

Yamahara, T., T. Shiono, T. Suzuki, K. Tanaka, S. Takio, K. Sato, S. Yamazaki and T. Satoh (1999). "Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*." Journal of Biological Chemistry **274**(47): 33274-33278.

Yamaji, Y., T. Kobayashi, K. Hamada, K. Sakurai, A. Yoshii, M. Suzuki, S. Namba and T. Hibi (2006). "In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A." Virology **347**(1): 100-108.

Yang, G., M. Mawassi, L. Ashoulin, R. Gafny, V. Gaba, A. Gal-On and M. Bar-Joseph (1997). "A cDNA clone from a defective RNA of citrus tristeza virus is infective in the presence of the helper virus." Journal of general virology **78**(7): 1765-1769.

Yang, J., F. Zhang, N.-J. Cai, N. Wu, X. Chen, J. Li, X.-F. Meng, T.-Q. Zhu, J.-P. Chen and H.-M. Zhang (2017). "A furoviral replicase recruits host HSP70 to membranes for viral RNA replication." Scientific Reports **7**.

Yang, Z., Y. W. Ebright, B. Yu and X. Chen (2006). "HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide." Nucleic acids research **34**(2): 667-675.

Yang, Z.-N., D. M. Mathews, J. A. Dodds and T. E. Mirkov (1999). "Molecular characterization of an isolate of citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange." Virus Genes **19**(2): 131-142.

Yang, Z.-N., X.-R. Ye, S. Choi, J. Molina, F. Moonan, R. A. Wing, M. L. Roose and T. E. Mirkov (2001). "Construction of a 1.2-Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf." Genome **44**(3): 382-393.

Yang, Z.-N., X.-R. Ye, J. Molina, M. L. Roose and T. E. Mirkov (2003). "Sequence Analysis of a 282-Kilobase Region Surrounding the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene (Ctv) Locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf." Plant physiology **131**(2): 482-492.

Yates III, J. R., J. K. Eng, A. L. McCormack and D. Schieltz (1995). "Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database." Analytical chemistry **67**(8): 1426-1436.

Yokomi, R., S. Garnsey, E. Civerolo and D. Gumpf (1989). "Transmission of exotic citrus tristeza virus isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*." Plant disease **73**(7): 552-556.

Yokomi, R., R. Lastra, M. B. Stoetzel, V. Damsteegt, R. Lee, S. Garnsey, T. Gottwald, M. Rocha-Peña and C. Niblett (1994).

"Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus." Journal of Economic Entomology **87**(4): 1078-1085.

Yokomi, S. (1987). "Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* and *Aphis citricola* in Florida." Phytophylactica **19**(2): 169-172.

Yoshida, T. (1985). "Inheritance of susceptibility to Citrus tristeza virus in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.)." Bulletin of the Fruit Tree Research Station. Series B. Okitsu (Japan).

Yoshida, T. (1996). "Graft compatibility of Citrus with plants in the Aurantioideae and their susceptibility to citrus tristeza virus." Plant Disease **80**(4): 414-417.

Yu, B., Z. Yang, J. Li, S. Minakhina, M. Yang, R. W. Padgett, R. Steward and X. Chen (2005). "Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis." Science **307**(5711): 932-935.

Zablocki, O. and G. Pietersen (2014). "Characterization of a novel citrus tristeza virus genotype within three cross-protecting source GFMS12 sub-isolates in South Africa by means of Illumina sequencing." Archives of virology **159**(8): 2133-2139.

Zeenko, V. V., L. A. Ryabova, A. S. Spirin, H. M. Rothnie, D. Hess, K. S. Browning and T. Hohn (2002). "Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA." Journal of virology **76**(11): 5678-5691.

Zhang, X., Y.-R. Yuan, Y. Pei, S.-S. Lin, T. Tuschl, D. J. Patel and N.-H. Chua (2006). "Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense." Genes & development **20**(23): 3255-3268.

Zhao, J., X. Zhang, Y. Hong and Y. Liu (2016). "Chloroplast in Plant-Virus Interaction." Frontiers in microbiology **7**.

Zheng, L., Z. Du, C. Lin, Q. Mao, K. Wu, J. Wu, T. Wei, Z. Wu and L. Xie (2015). "Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote

virus systemic movement." Molecular plant pathology **16**(9): 921-930.

Zhu, S., F. Gao, X. Cao, M. Chen, G. Ye, C. Wei and Y. Li (2005). "The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms." Plant physiology **139**(4): 1935-1945.

Zilberman, D., X. Cao and S. E. Jacobsen (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." Science **299**(5607): 716-719.

Zilberman, D., X. Cao, L. K. Johansen, Z. Xie, J. C. Carrington and S. E. Jacobsen (2004). "Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats." Current Biology **14**(13): 1214-1220.

Zrachya, A., P. P. Kumar, U. Ramakrishnan, Y. Levy, A. Loyter, T. Arazi, M. Lapidot and Y. Gafni (2007). "Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus." Transgenic Research **16**(3): 385-398.

Zwart, M. P., J.-A. Daròs and S. F. Elena (2011). "One is enough: in vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus." PLoS Pathog **7**(7): e1002122.

Zwart, M. P., A. Willemsen, J.-A. Daròs and S. F. Elena (2014). "Experimental evolution of pseudogenization and gene loss in a plant RNA virus." Molecular biology and evolution **31**(1): 121-134.

ANEXO

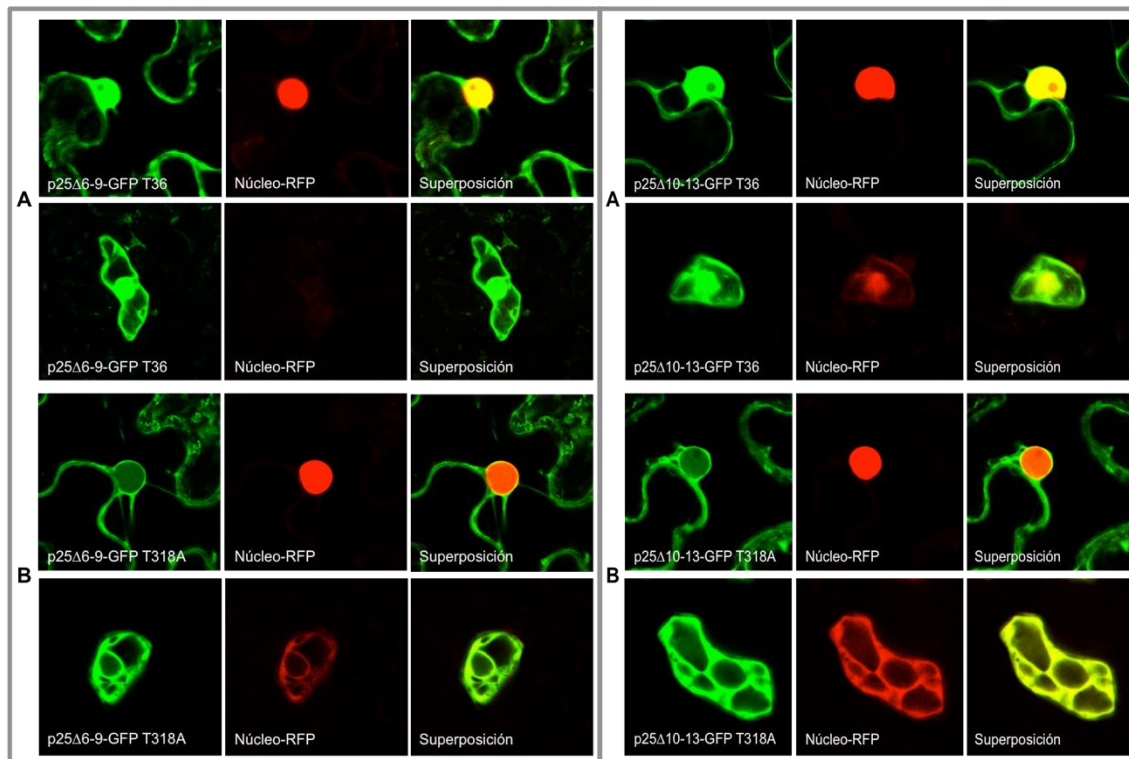


Fig. Anexa 1. Localización subcelular de los mutantes Δ NLS-R1a (panel de la izquierda) y Δ NLS-R1b (panel de la derecha) de p25-T36 (A) y p25-T318A (B).

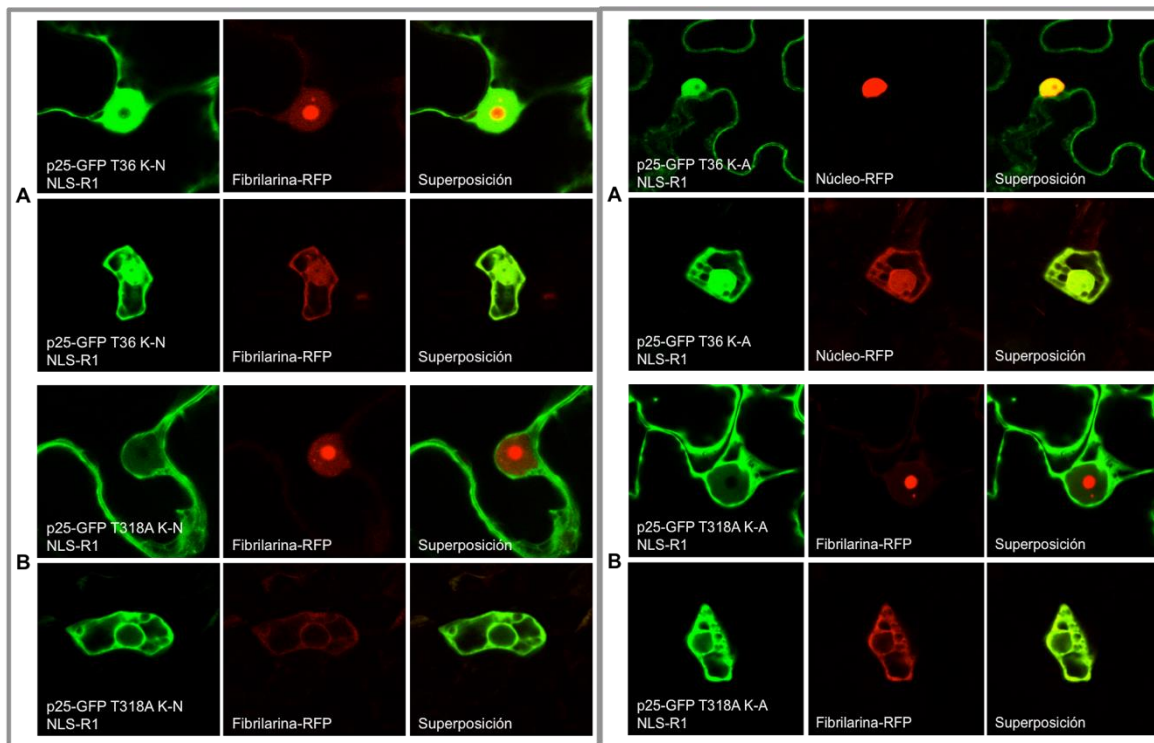


Fig. Anexa 2. Localización subcelular de los mutantes K-N NLS-R1 (panel izquierdo) o de los mutantes K-A NLS-R1 (panel de la derecha) de p25-T36 (A) y p25-T318A (B). No hay cambios de localización de p25 respecto a las proteínas salvajes correspondientes.

Tabla Anexa 1. Supresores de silenciamiento codificados por virus de plantas para los que se ha propuesto un mecanismo de supresión.

SUPRESOR	VIRUS	MECANISMO DE SUPRESIÓN	OTRAS FUNCIONES	REFERENCIA
p19	CIRV, TBSV	Unión a siRNAs	Movimiento, determinante de patogenicidad	Voinnet <i>et al.</i> , 1999 Silhavy <i>et al.</i> , 2002 Vargason <i>et al.</i> , 2003 Qu <i>et al.</i> , 2003
p38	TCV	Unión a dsRNAs, inhibición de DCL4 e interacción con AGO1	Proteína de cubierta	Thomas <i>et al.</i> , 2003 Deleris <i>et al.</i> , 2006 Mérai <i>et al.</i> , 2006 Azevedo <i>et al.</i> , 2010
CP	HCRSV	Actúa corriente abajo de RDR6	Proteína de cubierta	Meng <i>et al.</i> , 2008
p27/p88	RCNMV	Secuestra factores del huésped	Replicación	Takeda <i>et al.</i> , 2005
p14	PoLV	Unión a dsRNAs	Determinante de patogenicidad	Mérai <i>et al.</i> , 2005
p20	CTV	Suprime el silenciamiento intra- e intercelular	Transporte a larga distancia	
p23	CTV	Suprime el silenciamiento intracelular	Unión a ácidos nucleicos, determinante de patogenicidad	Lu <i>et al.</i> , 2004 Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013
p25	CTV	Suprime el silenciamiento intercelular	Proteína de cubierta	
p21	BYV	Unión a siRNAs	Potenciador de la replicación	Reed <i>et al.</i> , 2003 Lakatos <i>et al.</i> , 2006
NaBp	SPCFV	Suprime el silenciamiento intra- e intercelular	Determinante de patogenicidad	Deng <i>et al.</i> , 2015
RNAsa III	SPCSV	Degradación de siRNAs	Determinante de patogenicidad	Kreuze <i>et al.</i> , 2005 Cuellar <i>et al.</i> , 2009
2b	CMV, TAV	Interacción con AGO1 y AGO4, unión a siRNAs	Movimiento, especificidad de huésped	Zhang <i>et al.</i> , 2006 Goto <i>et al.</i> , 2007

Anexo

SUPRESOR	VIRUS	MECANISMO DE SUPRESIÓN	OTRAS FUNCIONES	REFERENCIA
				Chen <i>et al.</i> , 2008 Hamera <i>et al.</i> , 2012
p0	BWYV	Desestabilización de AGO1	Determinante de patogenicidad	Baumberger <i>et al.</i> , 2007 Bortolamiol <i>et al.</i> , 2007
HC-Pro	TEV, PVY	Unión a siRNAs, regulador negativo del PTGS	Transmisión por ácidos, movimiento, determinante de patogenicidad, procesamiento de poliproteínas	Anandalakshmi <i>et al.</i> , 2000 Lakatos <i>et al.</i> , 2006
p1	SPMMV	Interacción con AGO1	Proteasa de serina	Giner <i>et al.</i> , 2010
p1b	CVYV	Unión a siRNAs	Proteasa de serina	Valli <i>et al.</i> , 2008
S-CP	CPMV	Actúa corriente abajo de la producción de siRNAs	Proteína de cubierta	Liu <i>et al.</i> , 2004 Cañizares <i>et al.</i> , 2004
VPg	PVA	Inhibe la actividad del estabilizador de RNA (SGS3)	Replicación, movimiento	Rajamäki y Valkonen, 2009 Rajamäki <i>et al.</i> , 2014
p25	PVX	Interacción con AGO1 y degradación por vía del proteasoma	Movimiento	Voinnet <i>et al.</i> , 2000 Bayne <i>et al.</i> , 2005 Chiu <i>et al.</i> , 2010
p50	ACLSV	Inhibe el silenciamiento a larga distancia	Movimiento	Yaegashi <i>et al.</i> , 2007, 2008
p10	GVA	Unión a dsRNAs, siRNAs y siRNAs monocatenarios	Determinante de patogenicidad, movimiento, unión a RNA	Chiba <i>et al.</i> , 2006 Zhou <i>et al.</i> , 2006
p69	TYMV	Inhibe la RDR6	Movimiento, determinante de patogenicidad	Chen <i>et al.</i> , 2004
p126	TMV	Unión a siRNAs	Replicación	Harries <i>et al.</i> , 2008
16K	TRV	Actúa corriente abajo de la formación de dsRNAs	Desconocida	Martínez-Priego <i>et al.</i> , 2008
p122	Cr-TMV	Unión a siRNAs	Replicación	Csorba <i>et al.</i> , 2007

SUPRESOR	VIRUS	MECANISMO DE SUPRESIÓN	OTRAS FUNCIONES	REFERENCIA
p130	ToMV	Unión a siRNAs, interfiere en la metilación por parte de HEN1	Replicación	Kubola <i>et al.</i> , 2003 Vogler <i>et al.</i> , 2007
Yβ	BSMV	Unión a siRNAs	Determinante de patogenicidad	Yelina <i>et al.</i> , 2002 Mérai <i>et al.</i> , 2006
p15	PCV	Unión a siRNAs	Movimiento intercelular	Dunoyer <i>et al.</i> , 2002
NSs	TSWV	Inhibición del PTGS de secuencias sentido	Determinante de patogenicidad	Takeda <i>et al.</i> , 2002 Bucher <i>et al.</i> , 2003
p14	BNYVV, BSBMV	Actúa corriente abajo de la formación de siRNAs	Movimiento intercelular	Chiba <i>et al.</i> , 2013
NS3	RHBV, RSV	Unión a ssRNAs, siRNAs y miRNAs	Desconocida	Hemmes <i>et al.</i> , 2007, 2009 Xiong <i>et al.</i> , 2009 Shen <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2011
Pns10	RDV	Actúa corriente arriba de la formación de dsRNAs	Desconocida	Cao <i>et al.</i> , 2005
L2	BCTV	Inhibe la metilación	Determinante de patogenicidad	Wang <i>et al.</i> , 2003, 2005
AL2	TGMV	Inhibe la metilación	Sinergismo AC2-AC4	Wang <i>et al.</i> , 2005
AC2	ACMV, MYMV	Unión a ssRNAs, activa supresores endógenos	Trans-activador transcripcional	Voinnet <i>et al.</i> , 1999 Trinks <i>et al.</i> , 2005
AC4	ACMV	Unión a ssRNAs	Movimiento, determinante de patogenicidad	Chellappan <i>et al.</i> , 2005 Bisaro, 2006
V2	TYLCV	Inhibe la actividad del estabilizador de RNA (SGS3)	Desconocida	Glick <i>et al.</i> , 2008 Fukunaga y Doudna, 2009
p6	CaMV	Interacción con el factor DRB4	Trans-activador traduccional	Love <i>et al.</i> , 2007 Haas <i>et al.</i> , 2008

CIRV: virus de las manchas en anillos del clavel italiano; TBSV: virus del enanismo arbustivo del tomate; TCV: virus del arrugamiento del nabo; HCRSV: virus de las manchas cloróticas en anillo el hibisco; RCNMV: virus del mosaico necrótico del trébol rojo; PoLV: virus latente del Pothos; CTV: virus de la tristeza de los cítricos; BYV: virus del amarilleo de la

Anexo

remolacha; SPCSV: virus del enanismo clorótico de la batata; CMV: virus del mosaico del pepino; TAV: virus de la aspermia del tomate; BWYV: virus del amarilleo de la remolacha del oeste; TEV: virus del grabado el tabaco; PVY: virus Y de la patata; SPMMV: virus del moteado suave de la batata; CVYV: virus del amarillamiento de la venas del pepino; CPMV: virus del mosaico del chicharo; PVX: virus X de la patata; ACLSV: virus de las manchas cloróticas de la hoja del manzano; GVA: virus A de la vid; TYMV: virus del mosaico amarillo del nabo; TMV: virus del mosaico del tabaco; ToMV: virus del mosaico del tomate; BSMV: virus del mosaico rayado de la cebada; PCV: virus del macizo del cacahuete; TSWV: virus del bronceado del tomate; RHBV: virus de la hoja blanca del arroz; RSV: virus del rayado del arroz; RDV: virus del enanismo del arroz; BCTV: virus del rizado superior de la remolacha; TGMV: virus del mosaico dorado del tomate; ACMV: virus del mosaico de la yuca africana; TYLCV: virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate; MYMV: virus del mosaico amarillo del frijol mungo; CaMV: virus del mosaico de la coliflor; TRV: *tobacco rattle virus*; BNYVV: virus de las venas amarillentas necróticas de la remolacha; BSBMV: virus del mosaico de la remolacha transmitido por el suelo; PVA: virus A de la patata; SPCFV: virus de la mancha clorótica de la batata.

