



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ivi
instituto valenciano
de investigaciones agrarias

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

Estudio de la interacción diferencial entre aislados del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y sus huéspedes

Neus Gómez Muñoz



Directores:
Silvia Ambrós Palaguerri
José Guerri Sirera
Susana Ruiz Ruiz

Septiembre 2017

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en biotecnología

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología

ivia
Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Tesis doctoral

**Estudio de la interacción diferencial entre aislados del
virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y sus huéspedes**

NEUS GÓMEZ MUÑOZ

Directores:

Dra. Silvia Ambrós Palaguerra

Dr. José Guerri Sirera

Dra. Susana Ruiz Ruiz

Tutora:

Dra. Lynne Yenush

Valencia, septiembre de 2017

D. José Guerri Sirera, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Dña. Silvia Ambrós Palaguerra, 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 Dña. 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 la licenciada en Biología Neus Gómez Muñoz ha realizado bajo su dirección en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el trabajo que, con el título “Estudio de la interacción diferencial entre aislados del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y sus huéspedes”, presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 11 de septiembre de 2017.



Fdo.: Dr. José Guerri Sirera



Dra. Silvia Ambrós Palaguerra



Dra. Susana Ruiz Ruiz

“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede”

Jacques Yves Cousteau

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Aunque mi pasión por la ciencia llegó mucho antes de iniciar esta aventura en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), es justo en esta etapa de aprendizaje donde uno cultiva sus cimientos científicos, instruyéndose en la buena praxis y creciendo como profesional pero también como persona. Es justo en esta etapa, donde uno desarrolla casi con la misma intensidad, la capacidad de amar y maldecir las idas y venidas que te da la ciencia y que sin duda, son las que nos hacen avanzar.

Una aventura que no hubiera sido posible recorrer sin la sabiduría, instrucción y apoyo de mis tres directores de tesis. Gracias Silvia por permitir que iniciara este duro pero gratificante camino, que en ciertos momentos nos ha llevado por sendas tortuosas pero que con habilidad hemos logrado capear con satisfacción. Gracias Pepe por culminar junto a mí esta etapa, por rescatarme en los duros momentos y mostrarme el sentido más práctico y divertido de este pequeño mundo, llamado CTV. Gracias Susana por tu apoyo constante, tus consejos científicos, otros no tan científicos y por tu amistad.

No podría olvidar a Pedro Moreno, cuyo altruismo y fe en mí han hecho posible que tengamos entre las manos hoy esta tesis y quien me ha enseñado la elegancia del trabajo bien hecho. A Ricardo Flores, cuya infinita generosidad, entusiasmo y positivismo por la ciencia han resultado indispensables para recorrer, de una pieza, todo el camino. A José Antonio Darós, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio enseñándome el pragmatismo de la ciencia.

Durante todo este proceso, me he encontrado con grandes profesionales que siempre pensaban, como yo, que el trabajo del otro era mucho más interesante e ingenioso que el de uno mismo. Este sentimiento que a priori puede parecer desolador, en realidad, ha sido la maquinaria de engranaje de grandes amistades y la bomba propulsora para el camino de la autosuperación. Y en este sentido me gustaría agradecer muy especialmente a Josep Navarro, quien ha compartido conmigo no solo nuestro ya viejo amigo CTV, sino infinitas horas en el laboratorio, horas de rellenar macetas y regar plantitas, soportando siempre con una gratificante sonrisa mi adicción sin fin a las palabras. Quisiera agradecer el enorme apoyo de Bego y la amistad forjada durante todos estos años, nuestras pequeñas escapadas nos daban la fuerza suficiente para seguir empujando un poquito más y nos servían de un enorme desahogo!! De igual modo, la “piña”

formada por todos los becarios y postdoctorales del IVIA, los que todavía están y los que ya se marcharon, hacía que los momentos de almorzar, comer o simplemente decorar la sala de becarios fueran momentos especiales de desconexión y fraternidad, gracias a: Silvia B., Marta, Gabi, Edson, Dani, Vidal, Félix, Jose, Elena y Joaquín. ¡Sobre todo a ti Joaquín, por alimentarnos a todos al permitir que te robáramos, día tras día, los frutos secos! También me gustaría agradecer especialmente a Karelia, cuya generosidad y apoyo han resultado fundamentales para finalizar con éxito este trabajo. De igual modo, agradecer a Maru y Charo, por su ayuda y consejos.

En este proceso he realizado innumerables viajes al Instituto Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) del C.S.I.C, donde he tenido el enorme placer de poder desarrollar una parte importante de mi tesis doctoral y donde he compartido mucho más que horas de confocal, agroinfiltraciones y *Northern*, tras *Northern*, tras *Northern*.... Allí, tanto *las chicas Darós* como *las Flores* me han ayudado y facilitado mi trabajo en numerosas ocasiones, acoguéndome en sus laboratorios como una más del grupo y compartiendo momentos de risas y, por qué no decirlo, alguno que otro de llantos. Gracias a Sonia, Ame, Marcos, Pedro, Verónica, Lynne y especialmente a Amparo. Paradojas de la vida, me encontré un pececito entre tant@ fitopat@log@. Como bien nos decían: “*iremos al mar y no encontraremos agua*”, pues nuestras pasiones nos tentaban a pasar horas y horas hablando de buceo en el laboratorio y de la tesis en el mar. Gracias por compartir todos estos momentos y muchos más que nos quedan, sin dejar de recordarme como, en el último Congreso de Virología, unas sevillanas despistadas nos cantaban “*La tristeza no vale pa na*”.

Durante todo este trayecto han sido fundamentales los apoyos de mi familia y amigas más cercanas. Mis padres, a quienes les dedico especialmente esta tesis, pues su esfuerzo, constancia y sacrificio sin perder la ilusión es un ejemplo a seguir en todos los aspectos de mi vida. A mi hermano, quién bien sabe en primera persona lo que es pasar por todo esto y siempre ha estado ahí para apoyarme y aconsejarme. A mi tía Rosa, que durante todos estos años siempre ha mostrado su interés científico en entender los entresijos de cada experimento, felicitándome en los buenos momentos y aconsejándome en los difíciles. A las *biólogas en peligro de extinción* que desde que iniciamos hace ya 15 años la carrera hemos sido inseparables. A las “cordobesas” y a las que llevamos toda una vida juntas. Gracias a todas por aguantar las eternas explicaciones sobre la

Tristeza y los innumerables “No puedo, tengo que ir a regar las plantas” o “Lo siento. Estoy con la Tesis” cada vez que proponíais un plan tentador.

Y es que este recorrido, duro e incluso agotador en algunos momentos, ha permitido sacar la mejor biotecnóloga que llevo dentro. Pero además, me ha regalado un tesoro que a su vez constituye en sí mismo una aventura propia. Aventura en la cual dos fitopatólogos, a cuál más cabezota, pasan a compartir algo más que largas tardes de laboratorio. Gracias Pablo por todo lo ya recorrido, por los inolvidables momentos compartidos dentro y fuera del IVIA, por enseñarme a dejar correr los pequeños problemas absurdos sin solución, por tu ternura, todos tus consejos e incondicional apoyo pero sobre todo, por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía. Gracias de corazón, porque sin ti, este camino sería mucho más duro.

RESUMEN

La agricultura es un soporte importante de la economía española, siendo la citricultura la principal actividad agraria de la Comunidad Valenciana. La tristeza es la enfermedad viral más grave de este cultivo y su agente causal es el virus de la tristeza de los cítricos (CTV). El tipo e intensidad de los daños provocados por la tristeza en campo depende de las especies o combinación variedad-patrón infectadas, la cepa de CTV y las condiciones ambientales. CTV induce uno o más de los siguientes síndromes: I) decaimiento y muerte de los naranjos dulces (ND), pomelos y mandarinos injertados sobre el patrón naranjo amargo (NA), síndrome conocido como “tristeza”, II) enanismo, acanaladuras en la madera y fruta de pequeño calibre (*stem pitting*, SP), y III) enanismo y amarillamiento de plantas de semilla de limonero, pomelo y NA (*seedling yellows*, SY).

La gama de huéspedes de CTV es muy restringida y hasta hace poco no se conocía ningún huésped herbáceo experimental. Actualmente, se sabe que la agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*, una especie considerada no-huésped de CTV, con clones de DNA complementario (cDNA) del aislado T36 de CTV produce la infección sistémica de la planta, acompañada de síntomas similares a los inducidos en cítricos, si bien la infección no queda limitada al floema. El aislado T36 induce SY y SP de lima Mejicana (LM), pero no en otros huéspedes como pomelo o ND, por lo que el estudio de los determinantes genéticos responsables de la inducción del síndrome de SP requería desarrollar un sistema genético basado en clones agroinfectiosos de un aislado inductor de estos síntomas, como el aislado español T318A. Para ello, se partió de clones de cDNA de longitud completa de T318A previamente desarrollados en el laboratorio, capaces de replicarse en hojas de *N. benthamiana* pero incapaces de inducir infección sistémica y que presentaban varias mutaciones en su proteína de cápsida minoritaria p27. La corrección de dichas mutaciones y la construcción de nuevos clones de longitud completa de T318A marcados con el gen *gfp*, mostraron una correcta replicación en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, pero nuevamente resultaron incapaces de inducir infección sistémica en este huésped experimental.

La respuesta diferencial de *N. benthamiana* frente a distintas cepas de CTV permite estudiar los posibles factores implicados en la interacción virus-huésped, como paso preliminar para su estudio en cítricos que es más difícil de abordar.

Con este fin se analizó la interacción de las proteínas virales p20 y p25 de los aislados T36 y T318A con proteínas de *N. benthamiana* utilizando un abordaje proteómico consistente en: i) la expresión transitoria de p20/p25 marcadas con una etiqueta Strep-Tag en hojas de *N. benthamiana*, ii) purificación de los complejos proteína CTV-proteína huésped y análisis interactómico de los datos, y iii) estudio de la interacción directa entre p20/p25 y proteínas seleccionadas del huésped mediante análisis del doble híbrido en levadura y complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC). Este abordaje proteómico mostró claras diferencias entre aislados que pueden explicar, en parte, el comportamiento diferencial de los aislados T36 y T318A en dicho huésped experimental.

La inducción del síndrome de decaimiento por parte de CTV en cítricos y la subsiguiente muerte de árboles de diferentes variedades injertadas sobre el patrón NA, ha obligado a desarrollar una nueva citricultura basada en el uso de patrones tolerantes al decaimiento. Sin embargo, dichos patrones son agrónomicamente menos adecuados para las condiciones ambientales españolas y su uso ha conllevado la aparición de nuevos problemas patológicos. Las plantas de cítricos propagadas sobre NA e infectadas por CTV muestran necrosis en los tubos cribosos y disminución del floema funcional, lo que impide la apropiada translocación de fotoasimilados a las raíces. Éstos desórdenes podrían ser consecuencia de la activación de los mecanismos de defensa del NA como la reacción de hipersensibilidad (*hypersensitive reaction*, HR), desencadenada por la ruta del ácido salicílico (AS), o el silenciamiento génico mediado por RNA (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS), para prevenir o retrasar la invasión y acumulación de CTV. Con el objetivo de avanzar en el mecanismo molecular de la resistencia del NA a la infección por CTV, se estudió el papel de diferentes genes implicados en las rutas del AS o del PTGS silenciando dichos genes de la planta mediante el uso de un vector viral (*virus-induced gene silencing*, VIGS) basado en el genoma del virus del manchado foliar de los cítricos (*citrus leaf blotch virus*, CLBV). El silenciamiento génico de las rutas del AS o del PTGS en plantas NA de semilla o propagadas sobre limonero rugoso y la posterior inoculación de tres aislados de CTV patogénicamente diferentes (T36, T318A y T385) mostró la implicación de ambas rutas en la defensa del NA frente a CTV con distinta intensidad según los aislados y los tejidos de la planta. El análisis de las proteínas p20, p23 y p25 como posibles supresores de la ruta del AS mostró el carácter multifuncional de estas proteínas virales e indicó que los aislados más virulentos de CTV poseen supresores más potentes.

RESUM

L'agricultura és un dels suports principals de l'economia espanyola, sent la citricultura la principal activitat agrària de la Comunitat Valenciana. La Tristesa és la malaltia viral més greu d'aquest cultiu i el seu agent causal es el virus de la tristesa dels cítrics (CTV). El tipus e intensistat dels danys provocats per la tirstesa al camp depenen de les espècies cítriques infectades, de la combinació patró-varietat empeltada, de l'aïllat de CTV i de les condicions ambientals. CTV induïx un o més de les síndromes següents: I) decaïment i mort de taronger dolç (ND), pomelo i mandariner empeltats sobre el patró taronger amarg (NA), síndrome conegut com "Tristesa", II) nanisme, estries en la fusta i fruita de xicotet calibre (SP) i III) nanisme i tonalitat groguenta de plantes de llavor de llimera, pomelo i taronger amarg (SY).

El rang d'hostes de CTV és molt restringit i fins fa poc no es coneixia cap hoste herbaci experimental. Actualment es sap que la infecció sistèmica en *Nicotiana benthamiana*, una espècie no-hoste d'este virus, amb clons de DNA complementari (cDNA) de l'aïllat de T36 provoca la infecció sistemàtica de la planta, acompanyada de símptomes similars als induïts en cítrics, si be la infecció no queda llimitada al floema. L' aïllat T36 induïx SY i estries en la fusta de Lima Mexicana (LM), però no en altres hostes com a pomelo, ND o NA, pel que l'estudi dels determinants genètics responsables de la inducció de la síndrome de SP requeria desenvolupar un sistema genètic basat en clons agroinfecciosos d'un aïllat inductor d'estos símptomes, com l'aïllat espanyol T318A. Per a això, es va partir de clons de cDNA longitud completa de T318A prèviament desenvolupats al laboratori, capaços de replicar-se en fulls de *N. benthamiana* però incapaços d'induir infecció sistèmica i que presentaven varies mutacions en la seua proteïna de càpsida minoritativa p27. La correcció d'aquestes mutacions i la construcció de nous clons T318A de longitud completa marcats amb el gen *gfp*, van mostrar una correcta replicació en fulls agroinfiltradas de *N. benthamiana* però novament van resultar incapaços d'induir infecció sistèmica en aquest hoste experimental.

La resposta diferencial dependent d'aïllat en *N. benthamiana* front CTV permet estudiar els possibles factors de la interacció virus- hoste com a pas preliminar al seu estudi posterior en cítrics, un abordatge molt més difícil. En aquest sentit, es va dur a terme l'estudi de la funció de les proteïnes virals p20 i p25 dels aïllats T36 i T318A amb proteïnes de *N. benthamiana* utilitzant un abordatge proteòmic

consistent en: i) l'expressió transitòria de les dues proteïnes p20/p25 marcades amb una etiqueta Strep-Tag en fulls de *N. benthamiana*, ii) purificació dels complexos proteïna CTV-proteïna hoste i anàlisi interactòmic de les dades, i iii) estudi de la interacció directa per mitjà de doble híbrid en llevat i complementació bimolecular de fluorescència (BIFC) de les proteïnes virals i determinades proteïnes de *N. benthamiana*. Aquest abordatge proteòmic va mostrar clares diferències entre aïllats que poden explicar, en part, el comportament diferencial dels aïllats T36 i T318A en aquest hoste experimental.

La inducció de la síndrome de decaïment per part de CTV en cítrics i la consegüent mort d'arbres de diferents varietats empeltades sobre el patró NA, ha obligat a desenvolupar una nova citricultura basada en l'ocupació de patrons tolerants al decaïment. No obstant això, aquests patrons són agronòmicament menys adequats per a les condicions ambientals espanyoles i la seva utilització ha comportat l'aparició de nous problemes patològics. Les plantes de cítrics propagades sobre NA i infectades per CTV mostren necrosi als tubs cribosos i disminució del floema funcional, la qual cosa impedeix l'apropiada translocació de fotoassimilats a les arrels. Aquests símptomes poden ser conseqüència de l'activació de les rutes de defensa de la planta com la reacció d'hipersensibilitat (*hypersensitive reaction* HR), desencadenada per la ruta de l'àcid salicílic (AS) o el silenciament gènic mediat per RNA (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) per a previndre o retrasar la invasió i acumulació de CTV. Amb l'objectiu d'analitzar la implicació d'aquestes rutes en la defensa del NA front la infecció per CTV, es va estudiar el paper de diferents gens implicats en la ruta de l'AS i del PTGS per mitjà de l'ús del silenciament gènic induït per virus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) basat en el genoma del tacat foliar dels cítrics (*citrus leaf blotch virus*, CLBV). El silenciament gènic de les rutes AS o PTGS en plantes NA de llavor o propagades sobre Llimera rugosa i la posterior inoculació de tres aïllats de CTV patogènicament diferents (T36, T318A i T385) va mostrar la implicació de les dues rutes en la defensa del NA front CTV amb diferent intensitat segons els aïllats i els teixits de la planta. L'anàlisi de les proteïnes p20, p23 i p25 com a possibles supressors de la ruta de l'AS va mostrar el caràcter multifuncional d'aquestes proteïnes virals i va indicar que els aïllats més virulents de CTV posseïen supressors més potents.

ABSTRACT

The agriculture is an important support of Spanish economy, being the citriculture the main agricultural activity in the Valencia area. Tristeza is the most important viral disease affecting citrus plants and *Citrus tristeza virus* (CTV) is the causal agent of this disease. In Spain, this disease caused the death of more than 50 million citrus trees. The type and intensity of the damage caused by Tristeza depends on the citrus species, the combination varieties-rootstock, the CTV strain and the environmental conditions. CTV induces at least one of this syndromes: I) decline and death of sweet orange (SwO), grapefruits and mandarin trees grafted on sour orange (SO) rootstock, this syndromes is known as “tristeza”, II) stunting, stem pitting (SP) and small fruits, and III) stunting and leaf chlorosis of lemon, grapefruit and SO seedlings (*seedling yellows*, SY).

The host range of CTV is restricted and until recently no experimental herbaceous host was known. *Nicotiana benthamiana* is not considered as a CTV host but the agroinoculation with clones of complementary DNA (cDNA) from the CTV isolate T36 cause the systemic infection of the plant and similar symptoms to those observed in citrus, although the infection is not limited to the phloem. T36 isolate induces SY and SP of Mexican lime (ML), but not in other hosts such as grapefruit and SwO. Therefore, to study the genetic determinants responsible of the SP syndrome induction was necessary to develop a genetic system based on agroinoculated clones from an isolate able to induce these symptoms, such as the Spanish isolate T318A. To do this, full length cDNA clones from T318A were obtained. They are able to replicate in *N. benthamiana* leaves but unable to induce systemic infection and showed several mutations in their protein of the minor coat, p27. The correction of these mutations and the construction of new clones of complete length from T318A labeled with the *gfp* gene, showed a proper replication in agroinoculated leaves of *N. benthamiana*, but they were still unable to induce systemic infection in this experimental host.

The differential response of *N. benthamiana* to different CTV strains allows the study of the potential factors involved in the virus-host interaction, as a preliminary step for their study in citrus. The aim of this work was study the interaction between the viral proteins p20 and p25 from the isolates T36 and T318A with *N. benthamiana* proteins with a proteomic analysis consisted in: I) the transitory expression of p20/p25 fused to Strep-Tag in *N. benthamiana* leaves, II)

purification of the CTV protein-host protein complex and interatomic analysis of the data, and III) the study of the direct interaction between p20/p25 and selected plant proteins by the analysis of the double hybrid in yeast and bimolecular complementation of fluorescence (BIFC). The proteomic analysis showed strong differences between isolates that may partially explain the differential behavior of the T36 and T318A isolates in this experimental host.

The induction of decline syndrome by CTV in citrus and the subsequent death of the trees of different varieties grafted in SO rootstock, has led to the development of a new citriculture based on the use of tolerant rootstocks to decline. However, the use of such rootstocks is not suitable according to the Spanish environmental conditions, leading to the appearance of new pathogenic problems. Citrus plants propagated on SO rootstock and infected by CTV show phloem necrosis below the bud union that reduces the flow of carbohydrates to the roots, resulting in loss of feeder roots that cannot sufficiently uptake water and nutrients. These symptoms may be a consequence of the activation of defense pathways in the plant, such as the hypersensitive reaction (HR), hormone salicylic acid (SA) pathways or the RNA mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS). Their relation is essential to know their implication in the decline of the varieties propagated on SO rootstock. Therefore, the role of different genes involved in SA and PTGS has been studied by the silencing of plant genes using a viral vector (*virus-induced gene silencing*, VIGS) based in the genome of the citrus leaf blotch virus (CLBV). The gene silencing of the SA and PTGS in SO or SO propagated on rough lemon rootstock and the subsequent inoculation of three different pathogenicity CTV isolates (T36, T318A and T385) showed that both pathways are involved in the SO defense against CTV with different intensity. This intensity depends on the isolates and the plant tissues. The analysis of the proteins p20, p23 and p25 as possible suppressors of the AS showed the multifunctional character of these viral proteins indicating that the more virulent CTV isolates possess the more powerful suppressors.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Interacción virus-planta.....	3
1.1. Mecanismos de defensa de las plantas	4
1.1.1. Defensa basal o inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos.....	5
1.1.2. Inmunidad activada por efectores	5
1.1.3. Respuesta sistémica adquirida	7
1.1.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis	8
1.1.5. Producción de fitohormonas con implicación en las defensas de la planta.....	9
1.1.5.1. Ruta de señalización del ácido salicílico	9
1.1.5.2. Ruta del ácido jasmónico.....	13
1.1.5.3. Ruta del etileno.....	14
1.1.5.4. Ruta del ácido abscísico.....	15
1.1.5.5. Ruta de las auxinas	16
1.1.5.6. Ruta de las citoquininas.....	17
1.1.5.7. Ruta de las giberelinas.....	18
1.1.5.8. Ruta de los brasinoesteroides	19
1.1.6. Sistema Ubiquitina-proteosoma.....	19
1.1.7. Silenciamiento génico post-transcripcional	20

1.1.8. Respuesta viral frente a las defensas de la planta.....	23
1.1.9. Interacción entre distintas rutas de defensa de la planta.....	24
1.2. Estudio de la interacción virus-planta mediante el estudio del transcriptoma	26
1.3. Estudio de la interacción virus-planta mediante análisis proteómico.....	27
1.4. Estudio de la función de genes de la planta mediante el silenciamiento génico inducido por virus	29
1.5. Estudio de la función de genes virales mediante el desarrollo de clones infecciosos	31
2. El cultivo de los cítricos.....	32
3. La Tristeza de los cítricos	34
3.1. Gama de huéspedes y síntomas	35
3.2. Transmisión de CTV.....	38
3.3. Diagnóstico.....	39
3.4. Control de la enfermedad.....	41
3.5. El virus de la tristeza de los cítricos: viriones y organización del RNA genómico	42
3.6. Expresión del genoma viral.....	46
3.7. Variabilidad genética	50
3.8. Interacción virus-planta	51
3.8.1. Movimiento viral.....	52

3.8.2. Genes de resistencia (R) de la planta.....	53
3.8.3. Supresores del silenciamiento génico	54
3.9. Clones infecciosos de CTV.....	55

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	65
---------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1: CONSTRUCCIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL AISLADO T318A, MARCADO CON EL GEN *green fluorescent protein*.

1. INTRODUCCIÓN	71
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
2.1. Corrección de la secuencia del clon de cDNA del aislado T318A de CTV e inserción del gen <i>gfp</i> C3	77
2.2. Reconstrucción de un clon de cDNA con el genoma completo de T318A	80
2.2.1. Construcción del clon 3' T318A-GFP.....	80
2.2.2. Obtención de un clon de longitud completa restaurado del genoma de T318A	80
2.2.3. Obtención de clones T318A-GFP en vectores de expresión <i>in planta</i> pCH20	82
2.2.4. Obtención de clones de T318A-GFP en vectores de expresión <i>in planta</i> pCLEAN-G181	82
2.2.5. Incorporación de un supresor de silenciamiento (p22) en el vector de expresión <i>in vivo</i> pCLEAN-G181	83

2.3. Ensayos de infectividad de clones de cDNA de longitud completa del genoma de T318A.....	84
2.3.1. Transformación de los clones de longitud completa de T318A en <i>A. tumefaciens</i> y agroinoculación en hojas de <i>N. benthamiana</i>	84
2.3.2. Visualización y seguimiento de la infección en plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas con los clones T318A-GFP	86
2.3.3. Cuantificación del gRNA expresado por los clones de cDNA de longitud completa de T318A-GFP y detección serológica de la proteína p25	78
3. RESULTADOS.....	88
3.1. Obtención de clones de cDNA con la longitud completa del genoma del aislado T318A de CTV en vectores de expresión <i>in planta</i>	88
3.2. Análisis de la infectividad de los clones de longitud completa de T318A-GFP.....	90
4. DISCUSIÓN	98
 CAPÍTULO 2: ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE LA P20 Y P25 DE DOS AISLADOS DE CTV PATOGÉNICAMENTE DISTINTOS Y EL HUÉSPED EXPERIMENTAL <i>N. benthamiana</i>.	
1. INTRODUCCIÓN	107
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	110
2.1. Obtención e identificación de los complejos proteicos <i>N. benthamiana</i> -p20-CTV	110
2.1.1 Fusión de la proteína p20 de los aislados T36 y T318A con	

la etiqueta One-STrEP-tag.....	110
2.1.2. Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i> y purificación de complejos proteicos <i>N. benthamiana</i> -p20 CTV.....	111
2.2. Identificación y análisis bioinformático de los complejos proteicos <i>N. benthamiana</i> -p20	114
2.2.1. Análisis molecular	114
2.2.2. Análisis bioinformático	115
2.3. Estudio de la interacción directa entre proteínas de <i>N. benthamiana</i> y las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A de CTV	119
2.3.1. Análisis de las interacciones proteínas CTV-proteínas del huésped mediante la técnica de doble híbrido en levadura.....	119
2.3.2. Análisis de la interacción mediante complementación bimolecular por fluorescencia (BIFC).....	120
3. RESULTADOS.....	123
3.1. Obtención e identificación de los complejos proteicos <i>N. benthamiana</i> -p20 CTV	123
3.1.1. Purificación de complejos proteicos <i>N. benthamiana</i> -p20 CTV	123
3.1.2. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	126
3.2. Análisis bioinformático de los complejos proteicos purificados	126
3.2.1. Agrupación de las proteínas por categorías funcionales.....	126
3.2.2. Interacción coincidente entre las proteínas de T36 y T318A y las de <i>N. benthamiana</i>	133

3.2.3. Interacción diferencial entre las proteínas de T36 y T318A y las de <i>N. benthamiana</i>	135
3.3. Estudio de la interacción directa entre las proteínas p20 y p25 de los aislados de CTV T36 y T318A y las de la planta	145
3.3.1. Análisis de la interacción mediante doble híbrido en levadura	145
3.3.2. Análisis de la interacción mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC)	147
4. DISCUSIÓN	151

CAPÍTULO 3: IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO POST-TRANSCRIPCIONAL EN LA DEFENSA DEL NARANJO AMARGO FRENTE A LA INFECCIÓN POR CTV.

1. INTRODUCCIÓN	163
2. MATERIAL Y MÉTODOS	167
2.1. Utilización de VIGS con un vector viral basado en el genoma completo de CLBV para analizar la implicación de las rutas del AS y el PTGS en la defensa del NA frente a CTV	167
2.1.1. Obtención de los vectores virales basados en el genoma de CLBV	167
2.1.2. Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i> con las construcciones derivadas de <i>clbv3'</i> e inoculación en cítricos de los viriones producidos	168

2.2. Estudio de los síntomas y distribución viral en plantas de NA infectadas con distintos aislados de CTV	170
2.3. Efecto de las proteínas supresoras del silenciamiento de CTV en la ruta de señalización del ácido salicílico	172
2.3.1. Construcción de los <i>cassettes</i> de expresión de las proteínas p20, p23 y p25 de CTV en el vector binario pCAMBIA para su expresión <i>in planta</i>	172
2.3.2. Ensayos de la actividad supresora de la ruta de señalización del AS en un huésped experimental	173
2.3.2.1. Retraso de la reacción de HR mediada por la ruta de señalización del AS.....	173
2.3.2.2. Expresión de <i>PR1a</i> , gen indicador de respuesta al AS	174
3. RESULTADOS	177
3.1. Intensidad de los síntomas y distribución viral en NA de semilla infectado con distintos aislados de CTV	177
3.2. Estudio de los síntomas y distribución viral en plantas de semilla de NA con los genes <i>RDR1</i> , <i>NPR1</i> y <i>DCL2-4</i> silenciados	179
3.3. Efecto del silenciamiento de los genes <i>RDR1</i> , <i>NPR1</i> , <i>DCL2-4</i> y <i>NPR3-4</i> en el crecimiento y acumulación viral de plantas de NA propagadas sobre un patrón de limonero rugoso infectado con CTV	189
3.4. Estudio de la implicación de la ruta de señalización del AS en la mala unión inducida por CTV entre variedades de cítricos y el patrón NA.....	192
3.5. Análisis de las proteínas p20, p23 y p25 de CTV como supresores	

de la ruta de señalización del AS en un huésped experimental	194
3.5.1. Retraso de la necrosis asociada a la HR mediada por la ruta de señalización del AS	194
3.5.2. Análisis de la expresión del gen <i>PR1a</i>	197
4. DISCUSIÓN	199
DISCUSIÓN GENERAL	207
CONCLUSIONES GENERALES	215
ANEXO	221
BIBLIOGRAFÍA	241

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

ACN: acetonitrilo

AD: dominio de activación de la transcripción

ADF: factores de despolimerización de la actina

AGO: proteínas Argonautas

AJ: ácido jasmónico

AOS: “Allene Oxide Synthase”

ARFs: factores de respuesta a auxinas

AS: ácido salicílico

ASG: ácido salicílico glicosilado. Forma inactiva del ácido salicílico

AUX: auxinas

Avr: factores de avirulencia

BAC: cromosoma bacteriano artificial

BaMV: *Bamboo mosaic virus*

BD: dominio de unión al DNA

BCTV: *Beet curly top virus*

BIFC: complementación bimolecular por fluorescencia

BR: brasinoesteroides

BYV: *Beet yellow virus*

CaLCuV: *Cabbage leaf curl virus*

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*

cDNA: DNA complementario

CDC48C: proteína de división celular 48C

CE: elemento controlador de la transcripción de los sgRNA

CfMV: *Cocksfoot mottle virus*

CKs: citoquininas

CLBV: *Citrus leaf blotch virus*

CMV: *Cucumber mosaic virus*

CNV: *Cucumber necrosis virus*

CP: proteína de la cápsida

CPm: proteína de la cápsida minoritaria

CTV: *Citrus tristeza virus*

Cul: culina

D: decaimiento

DCL: proteínas Dicer-like

DO: densidad óptica

dpi: días post inoculación

dRNA: RNA defectivos

dsDNA: DNA de doble cadena

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ELISA-DASI: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas mediante sándwich de doble anticuerpo indirecto

ET: etileno

ETI: inmunidad activada por efectores

FA: ácido fórmico

FL: longitud completa (*Full Length*)

GABA: ácido amino butírico

GAD: glutamato descarboxilasa

GAs: giberelinas

GFP: proteína verde fluorescente

GOX: glicolato oxidasa

gRNA: RNA genómico

HCRSV: *Hibiscus chlorotic ringspot virus*

HDV: *Hepatitis virus Delta*

HR: reacción de hipersensibilidad

HEL: Dominio viral helicasa

HSP: proteína de choque térmico

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa genérica

IP-ELISA: inmunoprecipitación-ELISA

LC/MS-MS: cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem

LM: lima mejicana

LMTs: *Low molecular weight tristeza*

LRR: regiones ricas en residuos de leucinas

LysM: motivo de lisina

MAPKs: proteínas quinasas de activación mitógena

meJA: metil-jasmónico. Forma inactiva del ácido jasmónico

MET: Dominio viral metilasa

meSA: metil-salicilato. Forma inactiva del ácido salicílico

MP: proteínas de movimiento viral

mRNA: RNA mensajero

miRNA: micro RNA de interferencia

MS: técnica de espectrometría de masas

NA: naranjo amargo

NB: dominio de unión a ácidos nucleicos

ND: naranjo dulce

NES: señal de exportación nuclear

NOS-T: región terminadora del gen de la nopalina sintasa

NPR: “non-expresser of pathogenesis-related gene”

nt: nucleótidos

ON: óxido nítrico

ORFs: marcos de lectura abiertos

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PCD: muerte celular programada

PDR: resistencia derivada del patógeno

pepLCV: *Pepper leaf curl virus*

PMMoV: virus del moteado suave del pimiento

PoPit: terminador del inhibidor de proteasa de la patata

PPV: *Plum pox virus*

PR: proteínas relacionadas con la patogénesis

PRO: Dominio viral proteasa

PRR: proteínas receptoras de reconocimiento

Pst: *Pseudomas syringae pv. tomato*

PTGS: silenciamiento genómico post-transcripcional

PTI: Inmunidad activada por PAMPs

PVX: *Potato virus X*

PVY: *Potato virus Y*

R: fenómeno de resistencia de la planta

Rbz: ribozima

RDR: RNA polimerasas RNA dependientes

RCA: rubisco activasa

RdRp: Dominio viral RNA polimerasa RNA dependiente

RDV: *Rice dwarf virus*

RE: fenómenos de resistencia extrema

Rep: replicasas virales

RH: helicasa

RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNA^t: RNA total

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: retro-transcripción

RT-PCR: retro-transcripción seguida de una reacción de amplificación en cadena (PCR)

RT-qPCR: retro transcripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real

SABP: proteína de unión al ácido salicílico

SAHH: enzima s-adenosilhomocisteína hidrolasa

SAM: S-Adenosilmetionina sintetasa

SAR: respuesta sistémica adquirida

SDR: deshidrogenasa reductasa de cadena corta

sgRNA: RNA subgenómico

siRNA: pequeños RNA de interferencia

SKP: ligasa ubiquitina E3

SP: “Stem Pitting” (acanaladuras en la madera)

SqLCV: *Squash leaf curl virus*

SY: “Seedling Yellowing” (síndrome de amarillamiento)

SYTA: sinaptotagmina A

TBSV: *Tomato bushy stunt virus*

TCV: *Turnip crinkle virus*

T-DNA: DNA de transferencia

TFA: ácido trifluoroacético

TKL: Transquelotasa

TMV: *tobacco mosaic virus*

TNV: *Tobacco necrosis virus*

ToCV: *Tomato chlorosis virus*

ToMV: *Tomato mosaic virus*

ToRSV: *Tomato ringspot virus*

TSWV: *Tomato spotted wilt virus*

TRX-H9: tioredoxina h-9

TuMV: *Turnip mosaic virus*

TVCV: *Turnip vein clearing virus*

TYMV: *Turnip yellow mosaic virus*

UFP: beta amilasa *low-level*

UPS: sistema ubiquitina proteosómico

UTR: regiones no codificantes

VIGS: silenciamiento génico inducido por virus

vRNP: complejos ribonucleoproteicos virales

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los virus son microorganismos compuestos por una o más moléculas de ácido nucleico (DNA o RNA, de cadena sencilla o doble, circular o abierta), normalmente protegida/s por una o más proteínas capsídicas y en ocasiones por una envuelta lipoproteica, capaces de dirigir su propia replicación en el interior de células vivas de distintos tipos (animales, plantas, hongos o bacterias), usando la maquinaria y componentes celulares de sus huéspedes. Son por tanto, parásitos obligados de otros organismos que para completar su ciclo biológico y perpetuarse han de ser capaces de penetrar en una célula, interactuar apropiadamente con ésta para efectuar su replicación, moverse a otras células del organismo infectado y finalmente pasar a un nuevo individuo. En ocasiones, la interacción virus-huésped produce, en éste último, alteraciones fisiológicas importantes que dan lugar a enfermedades con distintos síntomas.

1. Interacción virus-planta

Dado que las células vegetales están protegidas por una gruesa pared celular, los virus sólo pueden entrar en éstas a través de daños causados en la pared celular o ser introducidos por organismos vectores (generalmente insectos, pero también ácaros y hongos). Una vez dentro de la célula vegetal, se replican y se mueven a corta distancia pasando a las células vecinas a través de los plasmodesmos como complejos ribonucleoproteicos virales (vRNP) o viriones, y a larga distancia, a través del floema. Los virus codifican en su genoma las proteínas necesarias para su replicación (Rep), encapsidación (CP) y movimiento (MP) dentro de la planta, y en algunos casos, proteínas que ayudan a su transmisión por vectores a nuevas plantas. Cada una de estas proteínas, especialmente las implicadas en la replicación y movimiento del virus, debe interactuar con factores del huésped para poder completar adecuadamente las etapas señaladas. Esta interacción es específica para cada combinación virus-planta y determina que un virus pueda o no colonizar una especie o variedad concreta. La relación entre el virus y el huésped puede ser compatible o incompatible. En el primer caso, el virus es capaz de entrar en la planta, multiplicarse y moverse a través de ella, lo que da lugar a una infección sistémica que puede o no ir acompañada de la producción de síntomas. Mientras que el segundo caso, puede ser debido bien a que el virus no reconozca la maquinaria de la planta necesaria para su multiplicación, o que el reconocimiento del virus por parte de la planta implique la inducción de una

reacción de hipersensibilidad (HR) con el fin de limitar la replicación y el movimiento del virus (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

1.1. Mecanismos de defensa de las plantas

Una vez que el virus penetra en la planta y se replica en las células iniciales, para que se establezca la infección sistémica es crucial la interacción entre factores del virus y del huésped (Gilberston y Lucas, 1996; Folimonova *et al.*, 2008). Se sabe que la infección sistémica ocurre en dos fases sucesivas. La primera es el movimiento del virus célula a célula a través de los plasmodesmos que conectan con las células vecinas. La segunda, es el movimiento a larga distancia que se da cuando el virus alcanza los tubos cribosos del floema y se desplaza a través de ellos para alcanzar zonas distales de la planta (Waigmann *et al.*, 2004).

Los plasmodesmos consisten en complejos túneles citoplasmáticos que conectan células vecinas (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Ruiz-Medrano *et al.*, 2004; Scholthof, 2005). Para llevar a cabo el movimiento célula a célula, muchos virus codifican proteínas de movimiento (MP) que modifican el límite de exclusión molecular de los plasmodesmos, favoreciendo el paso de los viriones o vRNP a través de los mismos (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Herranz y Pallás, 2004; Haupt *et al.*, 2005; Boevink y Oparka, 2005; Herranz *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). El mecanismo de acción de las MP depende del tipo de virus. Algunas pueden interactuar con proteínas del citoesqueleto celular, modificándolo y facilitando el tráfico de viriones o proteínas virales por el citoplasma celular; otras, localizan su acción directamente sobre los plasmodesmos y son transportadas a los mismos vía el retículo endoplasmático (Boevink y Oparka, 2005; Liu *et al.*, 2005). Aparte de las MP, otras proteínas virales podrían también tener una función importante en el movimiento de los virus. Así, se ha descrito que la CP de algunos virus resulta esencial para atravesar los tubos cribosos y establecer la infección sistémica (Gilberston y Lucas, 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999).

1.1.1. Defensa basal o inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos

A diferencia de los animales, las plantas no tienen unas células inmunológicas especializadas, sin embargo, las células vegetales parecen tener una habilidad innata para reconocer a los patógenos y activar una respuesta defensiva adecuada (Jones y Dangl, 2006). Independientemente de su vía de entrada y tras la superación de las primeras barreras de la planta, el virus queda expuesto a la detección por parte de un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern recognition receptors*, PRRs) (Chisholm *et al.*, 2006). Estos receptores, tienen la capacidad de identificar un agente externo al reconocer una serie de patrones moleculares presentes en los patógenos pero ausentes en las plantas (Boller y Felix, 2009) que reciben el nombre genérico de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Los PAMPs son moléculas muy conservadas, esenciales para el ciclo vital de los microorganismos (Segonzac y Zipfel, 2011) y que pueden incluir desde estructuras extracelulares como la quitina de los hongos a estructuras intracelulares como el factor Tu de elongación bacteriano o proteínas virales (He *et al.*, 2007; Schwessinger y Zipfel, 2008).

Al ser detectados los PAMPs por los PRRs se induce la denominada inmunidad activada por PAMPs o PTI (*PAMPs-triggered immunity*), también conocida como defensa basal (Jones y Dangl, 2006). Como resultado, se inician múltiples eventos de fosforilación y se activan varias cascadas de señalización mediadas por proteínas quinasas de activación mitógena (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), las cuales activan determinados factores de transcripción que inducen la expresión de genes de defensa. Como consecuencia, se limita la proliferación del patógeno (Asai *et al.*, 2002; Segonzac y Zipfel, 2011).

1.1.2. Inmunidad activada por efectores

Para que la infección progrese es indispensable que el patógeno sea capaz de suprimir esta primera respuesta de defensa basal de la planta o PTI. Para ello y mediante un proceso de co-evolución con la planta, los patógenos han desarrollado factores de avirulencia (Avr), conocidos como efectores. Estos representan un amplio abanico molecular que va desde las enzimas hidrolíticas

fúngicas o las toxinas bacterianas, hasta proteínas virales como las de la cápsida (Keen, 1990; Grabel y Rolfe 1990; Ellis *et al.*, 2000b).

Para defenderse contra estos efectores, las plantas han desarrollado mecanismos más específicos que se engloban dentro de la denominada inmunidad activada por efectores (*Effector-triggered immunity*, ETI). La respuesta ETI suele ser más eficaz y presenta una duración más prolongada que la respuesta PTI (Boller y Felix, 2009). En la respuesta ETI están involucrados los genes de resistencia (genes R) de la planta. Los productos codificados por estos genes, activados mediante una interacción gen a gen, detectan directa o indirectamente las moléculas efectoras sintetizadas por el propio patógeno (Flor, 1942, 1971; Bent, 1996; Ellis *et al.*, 2000b; Albar *et al.*, 2006; Moffet, 2009). La respuesta ETI, modula la interacción entre diversos complejos proteicos y las proteínas R para desencadenar una HR caracterizada por una muerte celular programada (*Programmed cell death*, PCD) que induce lesiones necróticas (Mandadi y Scholthof, 2013). Esta necrosis se localiza alrededor de la zona de infección y puede incluir lesiones cloróticas o necróticas de las hojas, frutos o tallos. Las lesiones asociadas a virus son manifestaciones sintomáticas de la respuesta inmune de la planta y son desencadenadas por las células infectadas con la finalidad de limitar la acumulación viral a unos pocos cientos de células (Staskawicz *et al.*, 1995; Heath, 2000; Shirasu y Shulze-Lefert, 2003; Soosaar *et al.*, 2005; Albar *et al.*, 2006; Moffet, 2009).

Se han caracterizado 5 clases de proteínas R (Dangl y Jones, 2001; Lehmann, 2002), la mayoría de las cuales presentan dominios de unión a ácidos nucleicos (*Nucleotide binding sites*, NBs) y su estructura es rica en residuos de leucina (*Leucine-rich regions*, LRR) (Maule *et al.*, 2007; Collier y Moffett, 2009; Moffett, 2009; Gururani *et al.*, 2012). Los dominios LRR están implicados en el reconocimiento de los efectores y pequeñas variaciones en sus residuos de leucina confieren distinta especificidad frente al patógeno (Farnham y Baulcombe, 2006). Las regiones LRR y los extremos funcionales N-terminales de las proteínas R son cruciales para la interacción con otras proteínas de la planta formando complejos proteicos que median el reconocimiento de los efectores de los patógenos (Collier y Moffett, 2009; Moffett, 2009).

Una diferencia fundamental entre los PAMPs y los efectores radica en que los primeros están muy conservados evolutivamente, mientras que los segundos,

están sometidos a una constante co-evolución con los procesos de defensa de la planta, modificándose según su interacción con las proteínas R de la planta.

La HR produce un cambio en los niveles de las hormonas de defensa de la planta e induce la producción de ácido salicílico (AS) o ácido jasmónico (AJ) y la acumulación de óxido nítrico (ON) o especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS) y H₂O₂, tanto en los tejidos infectados como en los no infectados de la planta (Culver y Padmanabhan, 2007; Carr *et al.*, 2010; Pallas y García, 2011; Mandadi y Scholthof, 2012). A nivel celular, la HR afecta al ion homeostático Ca²⁺ y altera el potencial de membrana, lo que modifica la permeabilidad celular (Mur *et al.*, 2008). Así mismo, induce la deposición de calosa en los plasmodesmos (lo que dificulta el movimiento de los virus a corta distancia) y activa la síntesis de proteasas como caspasas, enzimas implicadas en el procesamiento de proteínas vacuolares relacionadas con la PCD o la necrosis (Mur *et al.*, 2008). La activación de la HR induce una cascada de señalización genética que conduce a la expresión de múltiples proteínas como las proteínas MAPKs (Mue *et al.*, 2008) o proteínas relacionadas con la defensa fúngica como glucanasas y quitinasas que activarán la expresión de los genes de defensa.

1.1.3. Respuesta sistémica adquirida

La activación de las defensas de la planta a nivel local puede llegar a inducir una respuesta sistémica adquirida (*Systemic acquired resistance*, SAR) resultado de la acumulación de fitohormonas como el AS o el AJ en los tejidos distales (Vlot *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2011).

La SAR es una respuesta inmune que protege los tejidos alejados de la zona de infección frente a una infección posterior, pudiendo persistir hasta 3 semanas tras la primera infección (Ross, 1961b). Se piensa que las modificaciones epigenéticas como determinadas metilaciones del DNA y la re-estructuración de la cromatina podrían ser críticas para el mantenimiento estable de la señal SAR (Spoel y Dong, 2012) e incluso podrían ser transmitidas a la siguiente generación (Luna *et al.*, 2012). La SAR constituye una respuesta de defensa ampliamente conservada e inducida por diversos patógenos bacterianos, fúngicos y víricos. En contraste con la HR, representa un mecanismo de defensa más amplio y duradero para diversos tipos de patógenos simultáneamente (Mandadi y Scholthof, 2013).

La activación de la SAR implica la síntesis de diversas moléculas como el glicerol-3-fosfato (Chanda *et al.*, 2011), derivados del indol (Truman *et al.*, 2010) y ácido azelaico que a su vez inducen la síntesis del AS (Jung *et al.*, 2009), del metil-salicilato (MeSA), que es un derivado inactivo de AS (Park *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008b), de glicero-lípidos (Chaturvedi *et al.*, 2008) o de proteínas transportadoras de lípidos (Liu *et al.*, 2011).

Diversos estudios con el virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX,) (Bendahmane *et al.*, 1999), el virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) (Chu *et al.*, 2000), el virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) (Cole *et al.*, 2001) o el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) (Ishibashi *et al.*, 2007, 2009) revelan que, aunque la HR y la SAR son rutas estrechamente relacionadas, son dos procesos claramente diferenciados (Mandadi y Scholthof, 2013).

1.1.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis

La activación de las defensas de la planta induce toda una batería de proteínas relacionadas con la patogénesis (*Pathogenesis related*, PR) que constituyen un grupo heterogéneo dividido en 17 familias. Estas proteínas, dependientes de la especie vegetal y del tipo de patógeno, se concentran principalmente en los tejidos infectados, aunque en ocasiones pueden encontrarse en tejidos alejados de la zona de infección y son capaces de mantener su actividad varias semanas.

Entre las proteínas PR cabe destacar las PR1 y PR5, asociadas con una actividad anti-viral, o la PR6, cuya activación altera el ciclo de replicación de los virus y lo inhibe (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999). La PR2, con actividad β -1-3-glucanasa, junto con la PR3 y la PR8 (con actividad quitinasa) están asociadas a la respuesta antifúngica (Van Loon *et al.*, 2006). El tratamiento de plantas con AS induce la expresión de genes PR y la resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Vlot *et al.*, 2009).

1.1.5. Producción de fitohormonas con implicación en las defensas de la planta

El reconocimiento del patógeno, independientemente de que éste se haya producido vía PRRs o vía ETI, desencadena una serie de respuestas defensivas por parte de la planta que, en cualquier caso, provoca la biosíntesis de fitohormonas implicadas en los procesos de defensa (Dang y Jones, 2001; de Wit, 2007). Las rutas de señalización activadas en mayor medida son las del AS, el AJ y el etileno (ET), pero también se activan las del ácido abscísico (ABA), las citoquininas (CKs), las giberelinas (GAs), las auxinas (AUX) o los brasinoesteroides (BR).

La vía dependiente del AS está principalmente relacionada con los procesos infectivos de patógenos biótrofos y virus, mientras que las del AJ y el ET combaten fundamentalmente infecciones cursadas por patógenos necrótrofos e insectos. Por lo tanto, existe una dependencia entre el tipo de patógeno y la activación de las rutas de señalización defensivas (Glazebrook, 2005; López *et al.*, 2008). Además, existe una relación antagonista entre estas rutas, por la que una elevada resistencia a patógenos biótrofos está correlacionada con una mayor susceptibilidad a la infección por microorganismos necrótrofos y viceversa (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Se ha descrito que algunos patógenos son capaces de provocar la alteración de la homeostasis hormonal de la planta produciendo fitohormonas o moléculas que las mimetizan o incluso induciendo activamente la producción de dichas hormonas en el huésped como estrategia para aumentar su virulencia (López *et al.*, 2008; Robert-Selaniantz *et al.*, 2011).

1.1.5.1. Ruta de señalización del ácido salicílico

Los compuestos fenólicos de la planta participan en numerosos procesos metabólicos que van desde la síntesis de lignina hasta su implicación en la actividad alelopática de la planta. El AS lo hace en la síntesis de fitoalexinas involucradas en la defensa de la planta. Se ha descrito que el AS participa en la formación de semillas, en el crecimiento celular, en el cierre de estomas, en la expresión de genes asociados a senescencia y en la resistencia local y sistémica frente a patógenos biótrofos (Raskin, 1992; Métraux y Raskin, 1993; Humphreys y

Chapple, 2002; Loake y Grant 2007; Vlot *et al.*, 2009). De igual modo, se ha descrito que el AS puede alterar la síntesis de otras hormonas defensivas que participan en las rutas de señalización del AJ, el ET y las AUX (Lorenzo y Solano 2005; Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant 2007; Balbi y Devoto 2008).

En plantas, la mayor parte de la síntesis del AS tiene lugar en los cloroplastos, desde donde es liberado al citoplasma para ser glicosilado en su forma inactiva (AS O- β -glucósido, ASG) y almacenado en las vacuolas. Tras un fenómeno de infección, el ASG puede ser rápidamente hidrolizado para generar la forma libre AS bioactiva. La HR conlleva un aumento de la concentración del AS en la zona de infección, una parte de este AS es inactivado mediante metilación (meSA) y transportado hasta tejidos lejanos, donde nuevamente será activado, gracias a la eliminación del grupo metilo (Sánchez *et al.*, 2010).

La acumulación de esta fitohormona está principalmente regulada por la proteína NPR1 (*Non-expresser of pathogenesis-related genes 1*). Esta proteína se encuentra en el citosol de la célula en su forma inactiva, formada por oligómeros asociados mediante puentes disulfuro. El aumento del AS en la región infectada induce la reducción de la proteína citoplasmática NPR1 en monómeros, los cuales son transportados al interior del núcleo celular (Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008). Una vez en el interior nuclear, los monómeros de NPR1 interactúan con diversos factores de transcripción, responsables de la activación de los genes de defensa o ETI y a la muerte celular (Fu *et al.*, 2012).

Las proteínas parálogas NPR3 y NPR4 actúan como receptores de la ruta de señalización del AS mediando la degradación de NPR1. Estas proteínas, presentan dominios de unión específicos al AS pero con diferente afinidad, siendo mayor la de NPR4 que la de NPR3. Ello sugiere que la degradación de NPR1 ocurre mediante un proceso diferente según la concentración del AS. NPR4 degrada NPR1 en bajas concentraciones de AS, mientras que, NPR3 lo hace a elevadas concentraciones. Esta degradación se lleva a cabo mediante el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) gracias a la interacción específica de NPR3/NPR4 con la ligasa culina E3 (CUL3). Así, el AS controla la accesibilidad de la ligasa CUL3 por los reguladores NPR3 o NPR4. De este modo, en ausencia de una infección, NPR4 es la proteína encargada de eliminar NPR1 mediante su interacción con el complejo CUL3-NPR4. Esta interacción produce el marcaje de NPR1 con residuos de ubiquitina (ubiquitinación), lo que induce su degradación por parte del

proteosoma 26S. Dicha regulación, es importante para prevenir una falsa activación de las defensas de la planta. Aunque, es necesaria una concentración basal de AS para romper parcialmente la interacción NPR1-NPR4, permitiendo la acumulación de parte del NPR1 nuclear, con el fin de evitar una elevada susceptibilidad de la planta frente a enfermedades. Tras un proceso de infección, los niveles de AS aumentan a nivel local y sistémico, dando lugar a un gradiente de concentración decreciente desde la zona de infección hasta los tejidos distales. Este aumento del AS, en las células infectadas, induce la degradación de NPR1 por la CUL3-NPR3 lo que desencadena la respuesta ETI y el fenómeno de necrosis (consecuencia de una PCD) que limitará el movimiento del patógeno. La menor presencia de AS en zonas distales limita la interacción de NPR1 y la CUL3-NPR3, lo induce la SAR (Figura 1). Por lo tanto, la acumulación nuclear de NPR1 es necesaria para la defensa basal, su degradación por parte de NPR3 es necesaria para la inducción de los genes de defensa y la PCD. Pero sólo la acumulación de NPR1 posterior a dicha degradación por NPR3 es requerida para el establecimiento de la SAR. Además, NPR3 y NPR4 forman homo y heterodímeros en presencia de AS pero no en su ausencia, lo que sugiere que ambas proteínas no sólo regulan la estabilidad de la proteína NPR1 sino que también presentan auto-regulación. NPR3 y NPR4 degradan la proteína NPR1, pero no alteran los niveles de su RNA mensajero (mRNA) (Fu *et al.*, 2012).

Como se ha indicado, la degradación de NPR1 mediada por NPR3/NPR4 representa un regulador positivo de la SAR. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *npr3* y *npr3-npr4*, al no ser capaces de degradar la proteína NPR1 presentan comprometida la respuesta SAR y ETI pero ven aumentada su defensa basal, lo que produce una reducción significativa del patógeno (Santner *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012). Estos mismos resultados se observaron en plantas mutantes *cul3a-cul3b*, lo que refuerza el papel de NPR3 y NPR4 en la degradación de NPR1 mediada por Culina E3 (UPS). Las respuestas SAR y ETI están consideradas dos respuestas de defensa diferentes. Sin embargo, podrían estar relacionadas entre sí. Además, el doble mutante *npr3-npr4* es incapaz de inducir la PCD bajo condiciones de infección bacteriana (Fu *et al.*, 2012). Este fenotipo no se observa en plantas triple mutante *npr1-npr3-npr4* infectadas, lo que sugiere que la deficiencia en la inducción de la PCD y la ETI es consecuencia del aumento de la proteína NPR1 al no poder ser degradada por NPR3 ni NPR4. Estos resultados refuerzan la idea de que la proteína NPR1 actúa como represora de la PCD (Rate *et al.*, 2001).

La implicación del AS en la respuesta de defensa frente a virus está extensamente documentada. En plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) se produjo un incremento significativo del AS tanto en las hojas inoculadas como en los tejidos distales y paralelamente, se incrementó la expresión de los genes PR (revisado en Vlot *et al.*, 2009). Resultados similares se obtuvieron en plantas de patata infectadas con el virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) (Baebler *et al.*, 2014). De este modo, la sobre-expresión de genes responsables de la biosíntesis del AS, o la aplicación exógena del mismo, aumenta la inmunidad basal de la planta y retrasa el inicio de la infección viral y el establecimiento de la enfermedad (Ishihara *et al.*, 2008; Mayers *et al.*, 2005). Así mismo, se ha observado que la mutación de determinadas proteínas del huésped implicadas en la ruta de señalización del AS afecta a la capacidad defensiva de las plantas haciéndolas susceptibles a las infecciones virales, incluso en plantas que contienen genes R (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Baebler *et al.*, 2014).

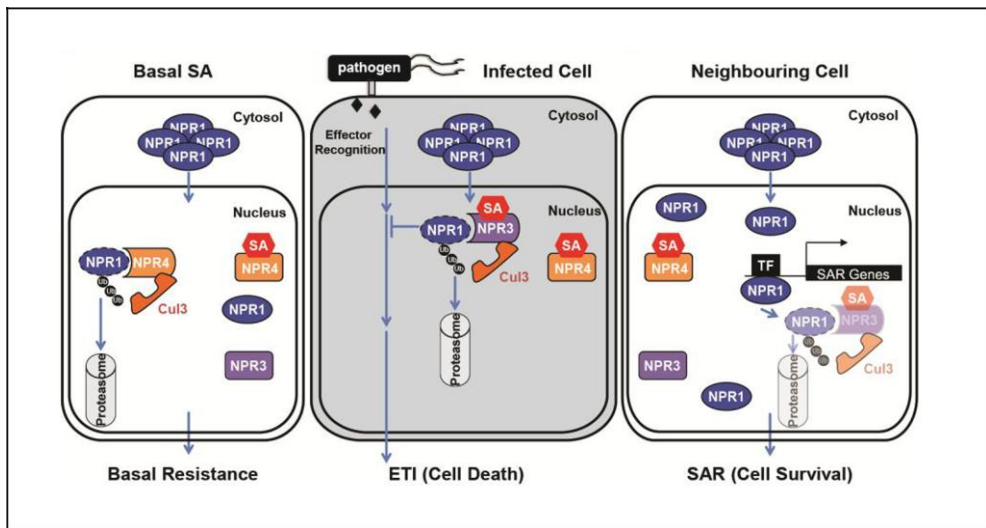


Figura 1: Modelo de acción de NPR3 y NPR4 como receptores de señalización del AS (representado como SA, de sus siglas en inglés) en la respuesta basal, la ETI y la SAR. La degradación de NPR1 mediante acción de NPR3/NPR4 es dependiente de la concentración del AS y la inducción de la ETI/PCD o SAR es dependiente de la concentración de la proteína NPR1. TF: Factores de transcripción. Ub: residuos de ubiquitina (tomado de Fu *et al.*, 2012).

1.1.5.2. Ruta del ácido jasmónico

El AJ es una fitohormona lipídica, derivada de la oxidación de los ácidos grasos linolénicos, que actúa como molécula de señalización en numerosas situaciones de estrés y procesos de desarrollo de la planta (Gasperini *et al.*, 2015). La ruta de señalización del AJ se suele asociar con la defensa frente a patógenos necrótrofos, es decir, patógenos que obtienen los nutrientes de la descomposición de las células del huésped, por lo que conllevan la muerte de las mismas desde el inicio de la infección. El daño en la membrana celular libera los ácidos α -linolénicos, los cuales son utilizados en la biosíntesis del AJ. Una vez sintetizado y liberado en el citoplasma, el AJ activa el sistema de degradación de proteínas, mediante el sistema UPS, que a su vez induce la expresión de los genes de defensa (Nagels-Durand *et al.*, 2016).

Si bien se ha descrito que las rutas del AS y AJ/ET son antagonistas, en casos puntuales se ha observado sinergismo entre ambas vías (Lorenzo y Solano, 2005). Aunque este antagonismo parece ser bidireccional, se ha observado que hay más genes dependientes del AJ reprimidos por la ruta de señalización del AS, que el fenómeno contrario (Glazebrook *et al.*, 2003). De hecho, infecciones de *A. thaliana* con patógenos biotrófos, necrótrofos e insectos, indicaron una priorización por parte de la planta en la activación de la vía de señalización del AS frente a la del AJ (Koornneef *et al.*, 2008).

Algunos estudios han relacionado el AJ con la defensa frente a virus. De hecho, la proteína C2 de algunos geminivirus (virus de DNA circular) interacciona con un complejo del sistema UPS que actúa modulando negativamente la vía de señalización del AJ, así como la del ABA y las AUX. Además, tratamientos con AJ indujeron un descenso en la acumulación del virus del rizado apical de la remolacha (*Beet curly top virus*, BCTV) (Lozano-Duran *et al.*, 2011). Sin embargo, plantas de *Nicotiana tabacum* silenciadas para AOS (*Allene oxide synthase*, un gen implicado en la biosíntesis del AJ) e infectadas con TMV, mostraron un aumento de la resistencia a TMV que fue localmente reducida mediante la aplicación de metil-jasmónico (MeJA). Esta reducción de la resistencia local permitió el movimiento sistémico de TMV. Los autores consideraron que el incremento de la resistencia observada en las plantas silenciadas para AOS era consecuencia del aumento de AS observado en dichas plantas (Oka *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que la aplicación de AJ en fases tardías de la infección provoca un

descenso de la resistencia frente a virus (García-Marcos *et al.*, 2013; Pacheco *et al.*, 2012). Por todo ello, la comprensión del efecto del AJ en las infecciones virales necesita más estudios que involucren a hormonas defensivas con función antagonista o sinérgica que puedan estar involucradas en los procesos iniciales de la infección.

1.1.5.3. Ruta del etileno

El ET está directamente implicado en distintos estadios del desarrollo de la planta, participa en el proceso de senescencia y en la defensa frente a patógenos necrótrofos (Pieterse *et al.*, 2012). Al no pertenecer los virus a este tipo de patógenos, el ET no parece estar muy implicado en los procesos de defensa frente a virus. No obstante, existen algunos estudios que muestran una alteración de los niveles de ET en la aparición de síntomas relacionados con infecciones virales.

Hace años se describió el ET como posible responsable de la aparición de los síntomas inducidos en pepino por el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Marco y Levy, 1979). Más recientemente, Geri y sus colaboradores (2004) utilizaron una línea transgénica de *A. thaliana* que expresaba la proteína p6 de CaMV para identificar aislados mutantes que no produjeran o disminuyeran los síntomas asociados a p6 (enanismo y clorosis foliar) en *A. thaliana*. Al comparar las infecciones cursadas en plantas control y plantas transgénicas para p6, observaron que estas últimas no desarrollaban síntomas y eran totalmente insensibles al ET, por lo que, los autores dedujeron que los síntomas de CaMV en estas plantas podrían depender de la interacción de p6 con determinados componentes de la ruta del ET (Geri *et al.*, 2004). Además, se ha encontrado que determinados precursores del ET se acumulan localmente alrededor de las áreas necróticas en plantas de *N. tabacum* resistentes a TMV, lo que indica la posible contribución del ET a la formación de estas lesiones (Delaat y Vanloon, 1983; Ohtsubo *et al.*, 1999). Al igual que el AJ endógeno, el ET presenta una relación de antagonismo con la ruta del AS en la mediación de las defensas frente a virus.

1.1.5.4. Ruta del ácido abscísico

El ABA es una fitohormona sesquiterpenoide (terpeno de 15 carbonos) que regula numerosos procesos de desarrollo de la planta y está implicado en la germinación de semillas o la maduración de los frutos. EL ABA es considerado como la hormona clave en la modulación de la respuesta a estrés abiótico (Atkinson y Urwin, 2012; Rajjou *et al.*, 2012; Sung y Luan, 2012). Se ha descrito su papel antagonista de otras rutas hormonales de defensa como la del AS o AJ, siendo capaz de suprimir la inducción de ROS y la expresión de los genes regulados por las rutas de señalización del AS o AJ. De este modo, el ABA representa un regulador negativo de las defensas de la planta controladas por estas rutas (Asselbergh *et al.*, 2008; Ton *et al.*, 2009). No obstante, en diversos estudios, se ha observado el incremento simultáneo del ABA y del AS en infecciones cursadas por TMV (Frase y Whenham, 1989; Alazem *et al.*, 2014).

En procesos de infección virales, esta fitohormona puede presentar diferentes funciones frente a un mismo patógeno dependiendo del momento de la infección en el que participe. Así, es capaz de regular las defensas de la planta en las fases iniciales de la infección mediando la oclusión de los estomas, lo que limita la invasión del patógeno. En cambio, si el patógeno es capaz de vencer las primeras defensas de la planta, el ABA puede inducir la deposición de residuos de calosa y de este modo, dificultar el movimiento del mismo. De hecho, la primera interacción virus-ABA fue descrita en infecciones de *N. tabacum* y plantas de tomate por TMV, en las que el incremento de la fitohormona ABA producía la deposición de calosa y la consecuente limitación del movimiento del virus (Whenham *et al.*, 1986; Frase y Whenham, 1989). Además, se sabe que la respuesta del ABA en la defensa frente a virus está mediada por la inhibición de la enzima β -1-3-glucanasa, que es responsable de la degradación del β -1-3-glucano (calosa), lo que da lugar a la deposición de calosa en los plasmodesmos (Mauch-Mani y Mauch, 2005). Sin embargo, el ABA también puede actuar en fases posteriores de la infección. Así, la aplicación exógena de ABA en plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas con el virus de la necrosis del tabaco (*Tobacco necrosis virus*, TNV) produjo una disminución de los síntomas y un descenso del título viral (Iriti y Faoro, 2008).

El ABA también parece jugar un importante papel en el PTGS mediado por RNA e interacciona, directa o indirectamente, con este sistema, por ejemplo, mediante

la modulación de los niveles del argonauta 1 (AGO1) (Li *et al.*, 2012). Por tanto, esta fitohormona parece influenciar la repuesta de defensa frente a virus a distintos niveles que incluyen el procesamiento de mRNAs, la biosíntesis de pequeños RNAs interferentes (*small interfering RNA*, siRNA) (Papp *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2008; Pieczynski *et al.*, 2013) o la regulación de otras hormonas implicadas en los procesos de defensa, como el AS. Sin embargo, aún no se dispone de un modelo claro sobre la actuación del ABA en el proceso de defensa de las plantas frente a los virus.

1.1.5.5. Ruta de las auxinas

Las AUX son fitohormonas implicadas principalmente en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la dominancia apical de las plantas. Plantas mutantes para genes implicados en las vías de señalización de las AUX presentan fenotipos aberrantes y malformaciones en el crecimiento (Benjamins y Scheres, 2008) similares a los síntomas inducidos por infecciones virales (Andrade *et al.*, 1981; Pratap *et al.*, 2012). Además, algunos virus interactúan con ciertos factores de respuesta a AUX (*Auxin response factors*, ARFs) involucrados en la dominancia apical y alteran su localización subcelular, así como sus funciones, lo que promueve la replicación y diseminación de algunos virus, como el TMV (Padmanabhan *et al.*, 2005; 2008). La manipulación de los factores ARFs conlleva fenotipos aberrantes. Esto sugiere que algunas infecciones virales comprometen la ruta de señalización o la biosíntesis de las AUX (Kazan y Manners, 2009).

En diversos estudios se ha descrito una relación cruzada entre las AUX y la ruta de señalización del AS. Así, la activación de la vía dependiente de las AUX inducida en infecciones causadas por patógenos biótropos (como las bacterias o virus, entre otros) está relacionada con una mayor susceptibilidad e inhibe la HR al suprimir la expresión de PR1 (Park *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) y reprimir la ruta de señalización del AS (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Benjamin y Scheres, 2008).

1.1.5.6. Ruta de las citoquininas

Las CKs son un grupo de hormonas producidas en el meristemo de las raíces y translocadas a zonas aéreas de la planta, donde participan en diferentes procesos como la proliferación y elongación celular, la movilización de nutrientes, la longevidad de las hojas y el retraso de la senescencia (Aloni *et al.*, 2005; Sakakibara, 2006). El establecimiento de una conexión entre las CKs y las rutas de defensa de la planta ha sido reciente. Actualmente, se sabe que algunos patógenos, como bacterias y hongos, producen CKs o son capaces de activar su producción en la planta, de este modo, consiguen alterar las defensas, producir el desvío de nutrientes hacia tejidos infectados (Choi *et al.*, 2011) o retrasar la senescencia de las células infectadas (Walters y McRoberts, 2006). Además, en infecciones cursadas por el patógeno bacteriano *Pseudomonas savastanoi*, las CKs son capaces de suprimir defensas de la planta como la HR (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Este fenómeno no ha sido observado en virus puesto que no son capaces de producir CKs. No obstante, algunos estudios sugieren la implicación de estas hormonas en la defensa frente a virus. Así, diversos experimentos fundamentados en la acción de la enzima S-adenosilhomocisteina hidrolasa (SAHH), la cual lleva a cabo la metilación del extremo 5' terminal de algunos virus necesaria para su replicación, mostraron que virus dependientes de la SAHH encontraban una mayor resistencia para infectar plantas desreguladas para dicha enzima. Sorprendentemente, virus que no requieren de la acción de SAHH para su replicación también vieron aumentada dicha resistencia en las mismas plantas. Los autores consideraron que este fenómeno podría producirse al tener lugar un aumento significativo de CKs en los exudados procedentes de las raíces como consecuencia de la desregulación de SAHH y que estas CKs podrían jugar un importante papel en la resistencia de las plantas frente a virus (Choi *et al.*, 2011; Masuta *et al.*, 1995).

Este aumento de resistencia por parte de las plantas está apoyado por otros estudios que revelan una correlación entre la síntesis de CKs y la activación de la ruta de señalización del AS. Se ha observado que algunas CKs activan el factor de transcripción *ARR2* (*Arabidopsis response regulator 2*), el cual modula positivamente la ruta del AS mediante la interacción con otro factor de regulación para la transcripción de los genes *PR1* y *PR2*. De este modo, se ha observado que plantas que sobre-expresan *ARR2* incrementan la transcripción de los genes

implicados en la biosíntesis del AS, así como, la ruta de señalización del mismo (Choi *et al.*, 2011).

Aunque se piensa que puede existir una interacción entre las CKs y la expresión de los genes R, el estudio de esta interacción aún no ha sido debidamente abordado.

1.1.5.7. Ruta de las giberelinas

Las GAs son hormonas producidas en la zona apical de la planta, en frutos o en semillas. Están implicadas en la germinación de las semillas, en la floración, en la inducción del desarrollo de yemas o frutos y en el crecimiento longitudinal del tallo (Sun y Gubler, 2004). Estas hormonas promueven el crecimiento de la planta mediante la degradación de las proteínas DELLA, las cuales actúan como reguladores negativos del crecimiento (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Jiang y Fu, 2007). La pérdida de función de las proteínas DELLA en plantas mutantes, aumentó la resistencia a patógenos biótrofos y mostró una hipersensibilidad frente a patógenos necrótrofos (Navarro *et al.*, 2008), lo que sugiere que las proteínas DELLA modulan la resistencia de la planta frente a patógenos necrótrofos, mientras que las GAs lo hacen frente a biótrofos, al mismo tiempo que promueven la susceptibilidad frente a patógenos necrótrofos. Esta regulación de la resistencia se lleva a cabo mediante la modulación del balance entre las rutas de señalización del AS y del AJ/ET. Las GAs aumentan la acumulación de AS y ROS e inhiben las vías de señalización de AJ/ET (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; 2011).

En el caso del virus del enanismo del arroz (*Rice dwarf virus*, RDV), la implicación de las GAs en la defensa antiviral de las plantas parece seguir un modelo en el cual la proteína p2 de la cápsida de RDV interaccionaría con el factor clave de la biosíntesis de las giberelinas, la Ent-Kaurene oxidase (Helliwell *et al.*, 1998), reduciendo los niveles de dicha enzima durante el proceso de infección (Zhu *et al.*, 2005). Se cree además que esta interacción podría interferir también con la biosíntesis de AUX y promover la replicación viral, aunque esta hipótesis todavía necesita de comprobación experimental (Zhu *et al.*, 2005; Pallás y García, 2011).

1.1.5.8. Ruta de los brasinoesteroides

Los BR son un grupo de hormonas polihidroxiesteroideas que afectan a un gran número de procesos celulares como la elongación, proliferación y diferenciación celular así como al bombeo de protones y a la polarización de la membrana (Clouse y Sasse, 1998; Xia *et al.*, 2010). Pero también pueden estar implicados en la resistencia frente a virus en determinadas especies como la patata, el arroz o el tabaco (Nakashita *et al.*, 2003). Incluso se ha observado que tratamientos con BR exógeno disminuye el título viral en plantas de tabaco infectadas con TMV (Hayat *et al.*, 2011). Esta defensa inducida por BR es independiente del AS, pues no afecta a los niveles de AS ni de las proteínas implicadas en la SAR (PR-1, PR-2 y PR-5) (Nakashita *et al.*, 2003). Sin embargo, la SAR es inducida por el tratamiento con BR 24 horas después de la infección por TMV (Hayat *et al.*, 2011).

1.1.6. Sistema Ubiquitina-proteosoma

El sistema UPS juega un importante papel en la interacción virus–huésped y en la defensa antiviral (Gao y Luo, 2006). Este sistema, regula diversas actividades celulares como el ciclo de división celular, la transcripción y las señales de traducción (Hershko y Ciechanover, 1998). Las principales enzimas involucradas en este proceso son la enzima activadora de ubiquitina E1, la enzima conjugadora de ubiquitina E2 y la ligasa ubiquitina E3 (SKP). Estas tres enzimas conforman un complejo proteico, que junto con las proteínas culina y F-box, está especializado en la poli-ubiquitinación de las proteínas celulares. Ello conlleva la degradación de dichas proteínas por parte del proteosoma 26S (Hua y Vierstra, 2011). Estos procesos de regulación constituyen un mecanismo de control de la señalización hormonal en plantas, común a casi todas las rutas hormonales descritas, que en algunos casos explica cómo se regula molecularmente la interacción entre diversas rutas.

Actualmente, existe cierta controversia sobre si la planta emplea el sistema UPS para defenderse de la infección viral o si el virus utiliza este sistema para promover su virulencia. Así, durante la infección de plantas de *N. tabaccum* por TMV, los complejos mediados por los genes de resistencia *N* interaccionan con el UPS para marcar las proteínas celulares y disminuir el crecimiento y desarrollo de la planta, aumentando la virulencia (Nezames y Deng, 2012). También TBSV

necesita niveles óptimos de su proteína p33 poli-ubiquitinada para activar la expresión de una proteína del huésped (Vps23p), que interviene en el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, la cual juega un papel decisivo en la replicación e invasión del virus (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, otros estudios refuerzan la implicación del UPS en la respuesta inmune antiviral. Por ejemplo, las proteínas de movimiento del virus del mosaico amarillo del nabo (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) presentan una elevada susceptibilidad para el marcaje sus proteínas y consecuente degradación mediante la maquinaria del sistema UPS, lo que resulta en un descenso de la virulencia y capacidad patogénica del virus (Reichel y Beachy, 2000; Drugeon y Jupin, 2002). De igual modo, el factor de patogenicidad C2, codificado por BCTV, interacciona con el sistema UPS para promover la degradación de la proteína del huésped S-adenosil-metionina que metila las moléculas de dsDNA sintetizadas *de novo* durante el proceso de replicación del BCTV y facilita la degradación de las mismas, impidiendo la proliferación del virus (Zhang *et al.*, 2011).

1.1.7. Silenciamiento génico post-transcripcional mediado por RNA

El PTGS mediado por RNA, engloba un conjunto de procesos que regulan la estabilidad del genoma de la planta (Baulcombe, 2004; Chan *et al.*, 2004; Ekwall, 2004; Wassenegger, 2005; Vaucheret, 2006), la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de la misma (Carrington y Ambrós, 2003; Bartel, 2004; Baulcombe, 2004; Dugas y Bartel, 2004; Chen, 2005; Carthew, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007) y la defensa de la planta frente a elementos transponibles de DNA o frente a virus (Voinnet, 2001, 2005; Waterhouse *et al.*, 2001, Ding *et al.*, 2004; Lecellier y Voinnet, 2004; Dunoyer y Voinnet, 2005; Li y Ding, 2005; Ding y Voinnet, 2007). Este proceso consiste en la producción de pequeñas moléculas de RNA de dos tipos, los micro RNA (miRNA) o los siRNA, a partir de moléculas de dsRNA derivadas de transcritos endógenos o exógenos, respectivamente.

A diferencia de los genes R, la defensa antiviral mediada por PTGS, presenta una elevada capacidad para adaptarse a cualquier patógeno potencial, puesto que su especificidad no está genéticamente codificada por el huésped, sino que depende únicamente de la secuencia viral procesada (Voinnet, 2001). En virus, este mecanismo se activa como consecuencia del reconocimiento de moléculas de

dsRNA foráneo, generadas durante la replicación del RNA genómico (gRNA), por estructuras secundarias del gRNA o por RNAs subgenómicos (sgRNAs). Las moléculas de dsRNA son reconocidas y escindidas por las enzimas de tipo Dicer (*Dicer like*, DCL) (Liu *et al.*, 2009) que poseen dominios RNasa III y que producen fragmentos de entre 21 y 24 nucleótidos (nt), los siRNA. Las moléculas de siRNA son incorporadas al complejo ribonucleoproteico denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC). La unión de este complejo con una de las cadenas de siRNA guía la degradación específica del RNA homólogo mediante la enzima RNasa H, conocida como Argonauta (AGO). Así mismo, los siRNAs pueden ser utilizados como cebadores en la síntesis de nuevas moléculas de dsRNA mediante RNA polimerasas dependientes de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDR) de la planta. En virus este fenómeno es producido por la RDR1 y la RDR6 (Baulcombe, 2004). Estas nuevas moléculas de dsRNA serán degradadas por enzimas DCL, lo que conlleva la acumulación de siRNAs secundarios y a la amplificación de la señal de silenciamiento. (Qu *et al.*, 2005; 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010) (Figura 2).

La activación del PTGS se produce inicialmente en una única célula para, posteriormente, extenderse a células vecinas mediante el movimiento de los siRNA de 21 nt a través de los plasmodesmos (Hamilton, 2002; Himber *et al.*, 2003; Dunoyer y Voinnet 2005; Schawch *et al.*, 2005). Los siRNA secundarios son transportados a través del floema hacia otros tejidos de las plantas, constituyendo la señal móvil encargada de extender el silenciamiento al resto de la planta (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2001; Mlostshwa *et al.*, 2002; Voinnet, 2005; Kalantidis *et al.*, 2008). El número de genes que codifican proteínas participantes en cada una de las distintas etapas del proceso de silenciamiento depende de la especie, por ejemplo, *A. thaliana* codifica 4 proteínas DCL, 10 genes AGO y 6 RDRs.

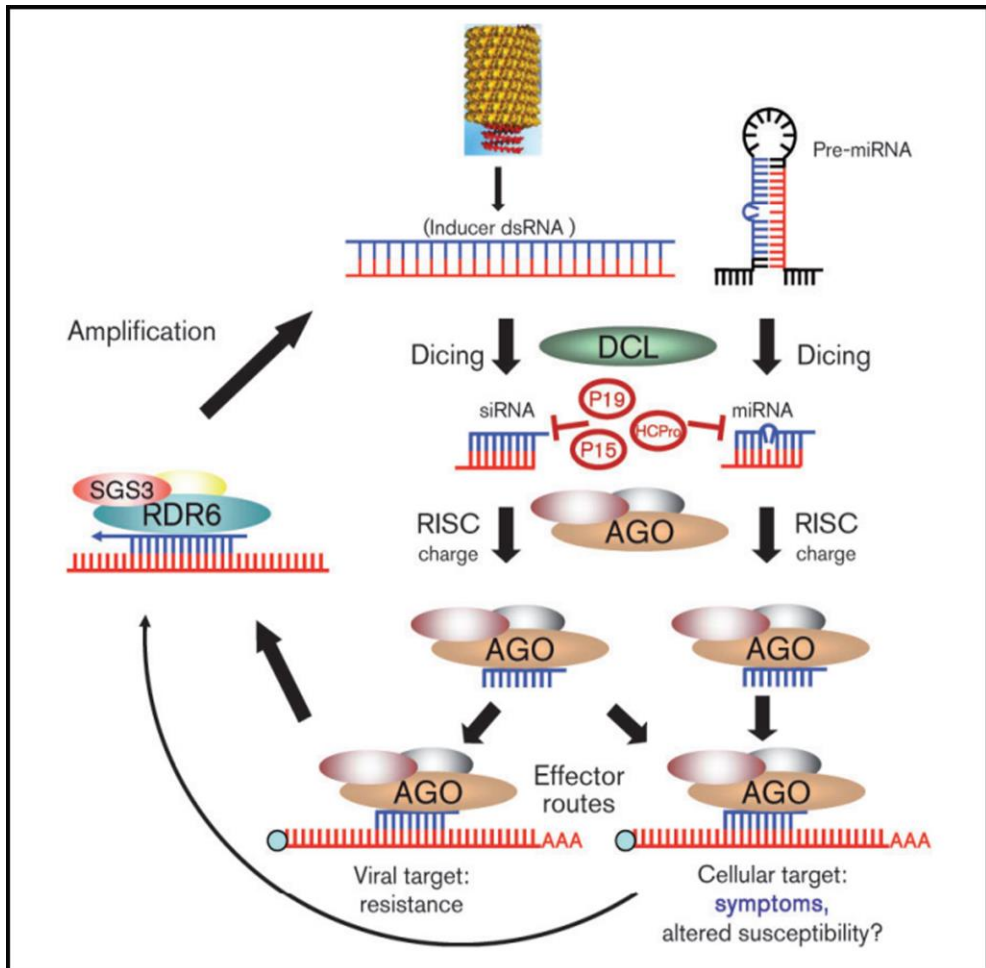


Figura 2: Representación esquemática del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) mediado por RNA. Las moléculas de dsRNA viral y los pre-miRNA celulares son cortadas por las enzimas Dicer (**DCL**), lo que genera siRNAs y miRNAs, respectivamente. Los siRNAs y miRNAs son cargados en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (**RISC**) que contiene las proteínas argonautas (**AGO**), responsables de la degradación de los RNAs diana. Los productos resultantes pueden ser amplificados por un complejo proteico formado por las RNA polimerasas dependientes de RNA RDR1 y RDR6 que luego darán lugar a los siRNAs secundarios que amplificarán la señal de silenciamiento. Algunos complejos RISC cargados con siRNAs virales pueden procesar miRNAs lo que puede dar lugar a la producción de determinados síntomas de la enfermedad. Síntomas que también pueden ser provocados por los supresores de silenciamiento p19 de tomosvirus, Hc-Pro de potyvirus o p15 de pecluvirus (Tomado de Pallás y García, 2011).

1.1.8. Respuesta viral frente a las defensas de la planta

El PTGS representa una potente estrategia de defensa antiviral que induce la destrucción del genoma viral e impide su multiplicación y la invasión de otros tejidos de la planta. Sin embargo, como contra-defensa, muchos virus de plantas codifican proteínas capaces de suprimir este fenómeno. Estas proteínas se denominan supresores del silenciamiento y pueden afectar a distintas etapas del PTGS, dando lugar a un incremento de la carga viral y a la eliminación del silenciamiento sistémico (Raja *et al.*, 2010). Los supresores del silenciamiento pueden bloquear el procesamiento de dsRNAs por las enzimas DCL, impedir la unión de los siRNAs al complejo RISC, el procesamiento de los siRNAs por las RDR o secuestrar los siRNAs directamente. Todo ello, altera el metabolismo de los siRNAs, imposibilita su acción o impide su movimiento a otras partes de la planta (Roth *et al.*, 2004).

Se han identificado numerosas proteínas virales con capacidad supresora, tanto en virus de RNA como de DNA. Muchas de estas proteínas además de actuar como supresores del silenciamiento también son determinantes de patogenicidad y/o proteínas de movimiento viral (Li y Ding, 2006). Los supresores de silenciamiento se han agrupado en tres familias bien diferenciadas (Díaz-Pendón y Ding, 2008) que presentan una escasa similitud de secuencia o de estructuras secundarias, indicando un origen evolutivo independiente (Carrington *et al.*, 2001). La primera familia, actúa en los pasos iniciales del silenciamiento intracelular de las células infectadas, impidiendo la metilación de los siRNAs, su procesamiento por DCL, la degradación de AGO1 o inhibiendo la generación de dsRNA por unión a RDR6. Entre estos supresores encontramos las proteínas Hc-Pro de potyvirus, p126 de tobamovirus, V2 de begomovirus, la proteína p21 de algunos closterovirus como el virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellow virus*, BYV) o la p6 del CaMV que interacciona directamente con DCL4 (Haas *et al.*, 2008). La segunda familia, está compuesta por proteínas esenciales para el movimiento célula a célula del virus pero que no afectan a la acumulación viral en la célula infectada, es decir, no afectan a la síntesis de siRNAs pero si a su movimiento a corta distancia. Este es el caso de la p25 de potexvirus (Chiu *et al.*, 2010) o de la proteína de cubierta del virus de la mancha anular del tomate (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) (Karran y Sanfacon, 2014). Finalmente, las proteínas de la tercera familia, facilitan el movimiento del virus a larga distancia o intensifican los síntomas en los tejidos distales, dificultando el movimiento de los

siRNAs a larga distancia, pero no afectan al movimiento célula a célula ni son imprescindibles para la replicación del virus. Los supresores más conocidos de esta última familia son las proteínas 2b de cucumovirus, p38 de carmovirus y p19 de tombusvirus. Éstas interceptan las moléculas de siRNAs de 21 nt (Díaz-Pendón y Ding, 2008). Sin embargo, el mismo supresor podría actuar en distintas etapas del PTGS. Así, la proteína 2b del CMV, además de impedir el movimiento de los siRNAs a larga distancia, se une específicamente a AGO1, degradándola e impidiendo el procesamiento de los siRNA en su fase inicial (Zhang *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2007; Ghosal y Sanfaçon, 2015).

Como mecanismo de contra-defensa frente a la ruta de señalización del AS, algunos virus son capaces de producir proteínas con capacidad supresora para dicha ruta. Es el caso de la proteína p6 de CaMV, que suprime la ruta de señalización del AS mediante la regulación de la proteína de defensa PR1a o mediante su interacción con la proteína NPR1. Dicha interacción tiene lugar cuando NPR1 se encuentra formando oligodímeros en el citoplasma (Love *et al.*, 2012; Laird *et al.*, 2013), lo que impide su degradación en monómeros y posterior traslocación al núcleo para activar los genes de defensa.

1.1.9. Interacción entre distintas rutas de defensa de la planta

Finalmente, se ha observado una relación positiva entre la defensa mediada por el AS y la maquinaria de PTGS (Alamilla *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2013; Baebler *et al.*, 2014). Existen evidencias que sugieren que el AS refuerza el silenciamiento antiviral en plantas de tabaco (Alamilla *et al.*, 2006). Así, el tratamiento con AS incrementa los niveles de la RDR1 en plantas de *N. tabacum* o *A. thaliana* (Alamilla *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2013; Jovel *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003). Mientras que en la resistencia de *A. thaliana* mediada por PTGS los genes que codifican las proteínas DCLs no dependen del AS (Lewsey y Carr, 2009), en plantas de tomate la expresión de DLC1, DLC2, RDR1 y RDR2 fue inducida por AS en infecciones cursadas por ToMV (Campos *et al.*, 2014), lo que indica que la relación entre la rutas de señalización del AS y PTGS no está todavía clara.

En resumen, la respuesta defensiva de la planta frente a patógenos implica la activación de un amplio grupo de rutas metabólicas como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o las rutas reguladas por el AS, AJ, ET, ABA o

la mediada por PTGS. Estas rutas están interconectadas entre sí presentando fenómenos de sinergismo y antagonismo entre ellas dependiendo del huésped y del patógeno (Mandadi y Scholthof, 2013; Alazem y Lin, 2015) (Figura 3).

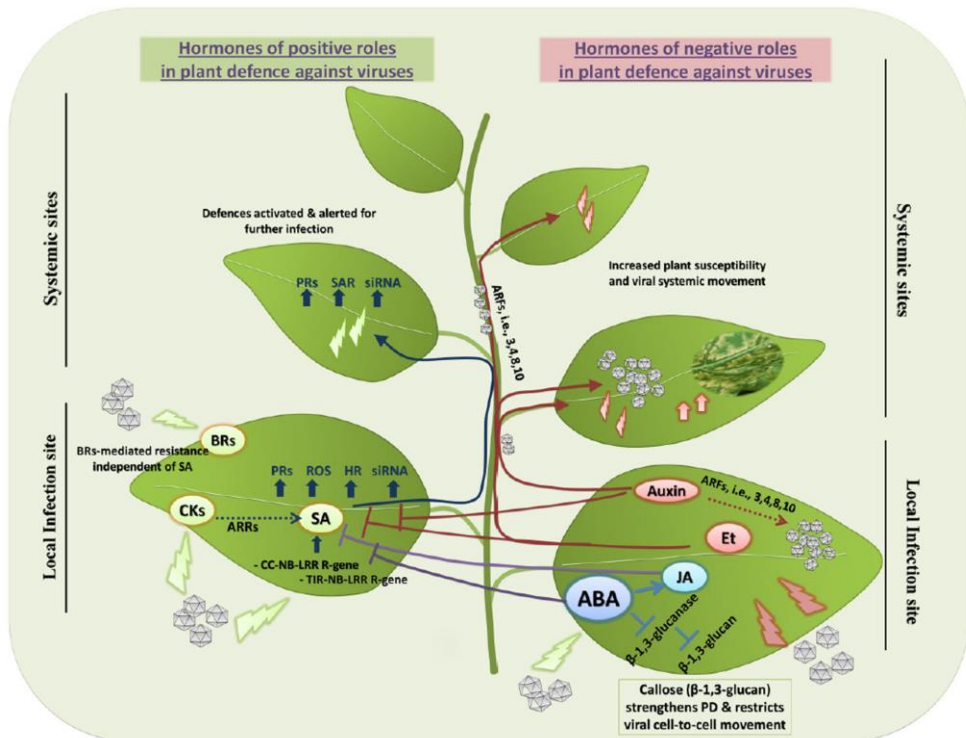


Figura 3: Representación general del efecto de las hormonas de la planta en la respuesta defensiva frente a virus. Las hormonas representadas en círculos verdes tienen una regulación positiva en la defensa antiviral. La activación de la ruta del ácido salicílico, (representado como SA, de sus siglas en inglés) mediante el reconocimiento de los efectores virales por los productos de los genes R (CC-NB-LRR y TIR-NB-LRR) y citoquininas (CKs), promueve la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la reacción de hipersensibilidad (HR) y la activación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) en la zona de infección. Éstas son transportadas hasta tejidos distales donde se da la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR). Las hormonas en círculos rojos presentan una regulación negativa en las defensas antivirales, como las auxinas (Auxin) o el etileno (Et). Las hormonas en círculos azules, como el ácido jasmónico (JA) y el abscísico (ABA), presentan efectos que pueden tanto favorecer como comprometer las defensas de la planta frente a virus (tomado de Alazem y Lin, 2015).

1.2. Estudio de la interacción virus-planta mediante el estudio del transcriptoma

Una de las técnicas genómicas utilizadas para la identificación de los genes del huésped expresados durante un proceso de infección viral, es el uso de micromatrices de DNA copia. Éstas permiten un análisis de los perfiles de expresión global de la planta y suponen una potente herramienta para el estudio de los procesos biológicos que ocurren en la interacción entre la planta y el patógeno durante la infección (Ramonell y Somerville, 2002; Koltai y Volpin, 2003; Gandía *et al.*, 2007).

Una micromatriz de DNA consiste en un conjunto de secuencias de DNA inmovilizadas sobre una superficie sólida y organizadas en cuadrículas microscópicas mediante un sistema robotizado (Alba *et al.*, 2004). Los datos de expresión génica se obtienen mediante la hibridación de la micromatriz con una población de DNA complementario (cDNAs) procedentes de la muestra problema (planta infectada) y de la muestra control (planta no infectada) marcadas cada una con fluoróforos diferentes, de modo que se obtiene una señal de fluorescencia para cada sonda cuya intensidad representa el nivel de expresión de dicho gen en la muestra (Busch y Lohmann, 2007). Así, esta tecnología facilita el análisis del transcriptoma de la planta infectada en comparación con el de una planta sana y permite detectar los genes con expresión modificada y por tanto, directa o indirectamente, implicados en la interacción virus-planta durante el proceso de infección (Whitham *et al.*, 2003).

Choi y sus colaboradores (2015) emplearon recientemente esta metodología para analizar el transcriptoma del crisantemo en respuesta a la infección cursada por tres virus diferentes: CMV, el virus de la marchitez del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) y PVX en la etapa temprana de la infección. En este estudio se identificaron un total de 125, 70 y 124 genes diferencialmente expresados en plantas infectadas por CMV, TSWV y PVX, respectivamente, en comparación con la planta sana. De estos genes, 33 fueron regulados por los tres virus y codificaban proteínas relacionadas con la respuesta a estrés, respuesta a quitina o proteínas implicadas en la vía de señalización del etileno, lo que indica su participación en la activación del sistema inmune del huésped. Por el contrario, se observó una disminución de los genes que codificaban para proteínas implicadas en la

replicación del DNA, en la organización de la cromatina, en la modificación de las histonas y en la citocinesis (Choi *et al.*, 2015).

Otro ejemplo del empleo de micromatrices es el estudio de la interacción virus-planta llevado a cabo por Rai Ved Prakash y sus colaboradores (2016), donde estudiaron el perfil de expresión génica del pimiento frente a la infección por dos aislados del virus del rizado de la hoja del pimiento (*Pepper leaf curl virus*, PepLCV) que dan lugar a una relación patógeno-huésped resistente o susceptible. En este estudio se identificaron un total de 319 genes expresados diferencialmente. De ellos, 234 mostraron sobre-expresión en la interacción resistente respecto a la susceptible, lo que indica que la respuesta resistente conlleva mayor expresión génica tras la infección. Este estudio abre las puertas a la identificación de los genes implicados en la resistencia del pimiento frente al PepLCV (Prakash *et al.*, 2016).

Recientemente estos estudios del transcriptoma se realizan mediante secuenciación masiva (Fu *et al.*, 2017).

1.3. Estudio de la interacción virus-planta mediante análisis proteómico

Hasta el momento, los estudios de la interacción virus-planta basados en la genómica funcional se han limitado fundamentalmente al análisis transcriptómico de la planta. No obstante, recientemente los enfoques proteómicos han comenzado a tener importancia. El análisis proteómico permite estudiar cualitativa y cuantitativamente las diferencias en la abundancia de las proteínas presentes como consecuencia del proceso de infección. Este análisis presenta algunas dificultades en el caso de las plantas, como es la propia extracción de proteínas, debido a la alta concentración de polifenoles y polisacáridos vegetales que pueden interferir en los subsiguientes pasos de separación e identificación de las mismas. A esta dificultad, se suma la escasa información del proteoma de muchas especies de plantas. No obstante, el desarrollo de potentes herramientas proteómicas (como el análisis mediante cromatografía líquida y/o espectrometría de masas, (*Liquid chromatography-Mass spectrometry*, LC/MS o MS, respectivamente) y eficaces plataformas bioinformáticas, han potenciado un aumento de los estudios centrados en la interacción virus-planta. Esto ha permitido la identificación de un gran número de proteínas del huésped

implicadas en los procesos de defensa antiviral y la mejor comprensión de los mecanismos que determinan la relación de compatibilidad/incompatibilidad entre el virus y su huésped.

Esta aproximación ha permitido estudiar las alteraciones a nivel proteico producidas durante el proceso de defensa del tomate frente a CMV (Di Carli *et al.*, 2010), donde el 38, 18 y 14% de las proteínas identificadas mostraron una relación directa con los procesos de fotosíntesis, metabolismo primario y defensa de la planta, respectivamente. Más concretamente, se observó la disminución, en plantas infectadas respecto a plantas sanas, de la RubisCO, proteínas relacionadas con el fotosistema II, enzimas implicadas en la glucólisis y la gluconeogénesis como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo como la dehidroascorbato y la L-ascorbato peroxidasa (Di Carli *et al.*, 2010; 2012).

Diversos estudios han abordado la interacción del virus TMV con diferentes huéspedes. El estudio de la infección de plantas de tomate asintomáticas, reveló la implicación directa de peptidasas, glucanasas y quitinasas en el proceso de infección cursado por TMV (Casado-Vela *et al.*, 2006). Mientras que, el análisis proteómico comparativo entre proteínas nucleares del pimiento durante la infección por un aislado de TMV virulento (que induce HR) y otro asintomático en plantas de pimiento, permitió la identificación de 6 proteínas inducidas en la interacción incompatible. Una de estas proteínas, la subunidad RPN7 del proteosoma 26S (CaRPN7) mostró un significativo aumento durante la interacción incompatible. La sobre-expresión transitoria de CaRPN7 mediada por *Agrobacterium* en hojas de pimiento reveló que dicha proteína podría estar involucrada en la PCD (Lee *et al.*, 2006).

El estudio comparativo del mecanismo de defensa del pimiento frente a dos aislados del virus del moteado suave del pimiento (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV), uno de origen español y otro italiano, que establecen con su huésped interacciones incompatible y compatible, respectivamente, reveló la acumulación diferencial de las proteínas PR. Así las PR1, PR2 y PR5 presentaron significativamente mayor acumulación durante la infección cursada por el aislado español. Esta fuerte acumulación de proteínas PR está estrechamente relacionada con la inducción de la HR característica en las interacciones incompatibles. Por otra parte, los mecanismos de defensa alteraron la actividad fotosintética del

huésped, produciendo el aumento de proteínas relacionadas con el fotosistema II (como la PsbO), lo que sugiere su posible implicación en la defensa basal del pimiento frente a PMMoV (Elvira *et al.*, 2008).

1.4. Estudio de la función de genes de la planta mediante el silenciamiento génico inducido por virus

El mayor conocimiento de los mecanismos moleculares en las relaciones de interacción virus-planta ha permitido el desarrollo de importantes tecnologías biotecnológicas basadas en la modificación genética de virus para silenciar genes o expresar proteínas de interés. En el primer caso, se utiliza el silenciamiento génico inducido por virus (*Virus-induced gene silencing*, VIGS). Esta tecnología se basa en la utilización del genoma del virus como un vector en el que se introducen genes o fragmentos de genes de la planta con el fin de estudiar su función mediante genética reversa al inducirse en la planta el silenciamiento del gen de interés. Para ello, es necesaria la introducción del virus modificado portador del gen a silenciar en la planta mediante diferentes técnicas. La técnica más comúnmente empleada es la agroinoculación, la cual consiste en la clonación del virus portador del gen a silenciar en el T-DNA (Lee and Gelvin, 2008) de un plásmido binario capaz de replicarse tanto en *Echerichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*. Al inocular plantas con un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con dicho plásmido, el T-DNA es transferido al núcleo de las células vegetales gracias a la presencia de los genes de virulencia *vir*. Este T-DNA que incluye el cDNA del genoma viral modificado, es transcrito a RNA y comienza a expresarse y replicarse (Grimsley *et al.*, 1986; Turpen *et al.*, 1993). La agroinfiltración puede realizarse directamente sobre las hojas, mediante el empleo de una jeringa, o sobre la planta entera por inmersión de la misma en el cultivo bacteriano. No obstante, la agroinoculación de plantas leñosas puede resultar difícil, poco eficaz o incluso imposible. Para solventar este problema, primero se agroinoculan plantas herbáceas con la finalidad de que el virus se multiplique fácilmente en este huésped y conseguir de esto modo, una infección sistémica. Posteriormente, a partir del material vegetal infectado, se obtendrá un

extracto de viriones, los cuales portarán el gen a silenciar, con el que se inoculan mecánicamente plantas del huésped leñoso.

Tras la inoculación del virus, tiene lugar la degradación del genoma viral y del gen insertado, con la consecuente producción de siRNAs como sistema de defensa de la planta mediante PTGS. Estos siRNAs dirigen la degradación del mRNA del gen homólogo al clonado en el virus, lo que propicia que la planta muestre el fenotipo de silenciamiento o pérdida de función de dicho gen.

En plantas, la formación de dsRNAs derivados de transgenes, virus, transposones y elementos repetitivos depende de las RDRs celulares (Voinnet, 2008). En *Arabidopsis* se ha demostrado que RDR6 regula la acumulación de algunos virus (Mourrain *et al.*, 2000) y en *Nicotiana benthamiana* se ha observado que esta polimerasa está implicada en la amplificación de la señal de VIGS (Schwach *et al.*, 2005). La actividad de RDR6 es necesaria para que las células infectadas respondan a la señal inicial de silenciamiento y generen siRNAs secundarios, los cuales activan una respuesta VIGS antiviral más eficiente.

El primer vector que se usó en VIGS se desarrolló a partir del RNA genómico de TMV y se utilizó para silenciar el gen de la fitoeno desaturasa (*pds*), una enzima implicada en la biosíntesis de carotenoides que protegen a la clorofila de la foto-oxidación, en plantas de *N. benthamiana*. Las plantas silenciadas mostraron un fenotipo de blanqueamiento de los distintos tejidos tras la infección con transcritos del vector viral (Kumagai *et al.*, 1995). Desde entonces, son muchos los virus que se han modificado para desarrollar vectores VIGS, algunos de los cuales pueden silenciar genes en distintos huéspedes, lo que permite utilizar el mismo vector para el estudio de genes en distintas especies.

Mediante la tecnología VIGS se ha estudiado la función de numerosos genes, principalmente relacionados con la respuesta de defensa a patógenos, los estreses abióticos o el crecimiento y desarrollo (Purkayastha y Dasgupta, 2009; Becker y Lange, 2010; Senthil-Kumar y Mysore, 2011; Huang *et al.*, 2012; Lange *et al.*, 2013). Sin embargo, esta tecnología también presenta algunos inconvenientes. Así, en la mayoría de los casos no se puede inhibir por completo la expresión del gen y la expresión residual puede ser suficiente para llevar a cabo su función.

Además, la eficiencia del silenciamiento y el fenotipo pueden variar entre plantas o réplicas de experimentos, por lo que es importante el uso de genes marcadores de silenciamiento con un fenotipo visible. Algunos de los genes más utilizados como marcadores son la *pds*, el gen *sulfur* (*su*), que codifica una subunidad de la quelatasa de magnesio necesaria para la producción de clorofila; o la chalcona sintetasa (*chs*), que es una enzima de la ruta de biosíntesis de pigmentos flavonoides. Finalmente, el nivel de expresión de un gen y el tamaño del fragmento introducido (generalmente 250-300 pb) son factores importantes en la susceptibilidad de dicho gen al silenciamiento (Cutter *et al.*, 2003; Bleys *et al.*, 2006).

1.5. Estudio de la función de genes virales mediante el desarrollo de clones infecciosos

La obtención de clones de cDNA del genoma completo de virus y la construcción de cDNAs híbridos con genes de distintos aislados ha permitido estudiar aspectos relacionados con la replicación viral y la expresión génica. Ésta técnica ha supuesto una herramienta muy útil en la identificación de los determinantes de patogenicidad de los virus.

La obtención de un clon infeccioso a partir de un virus de RNA implica necesariamente la síntesis previa del cDNA complementario al genoma completo del virus y la clonación de éste en un vector para su mantenimiento y amplificación en bacterias (Boyer y Haenni, 1994). Dependiendo de la estrategia a seguir, el cDNA del virus se puede clonar bajo un promotor inducible, como la RNA polimerasa DNA dependiente de un fago como T7 (Dunn y Studier, 1983) para obtener transcritos infecciosos del RNA viral, o clonarse bajo el control de un promotor constitutivo, como el promotor 35S de CaMV, para ensayar la inoculación directa del cDNA viral en la planta.

En el primer caso, los transcritos de RNA se sintetizan *in vitro* a partir del clon de cDNA y éstos se inoculan en la planta hospedadora mediante diversas técnicas como la inoculación mecánica, lipofección, bombardeo de partículas de oro o de tungsteno impregnadas con los transcritos, electroporación, etc. De este modo, los transcritos de RNA son introducidos en las células vegetales, donde pueden

actuar como mRNAs. Sin embargo, existen numerosos factores que pueden condicionar la infectividad de los transcritos de RNA (Sarnow, 1989; Hayes y Buck, 1990).

Por el contrario, las construcciones virales bajo el control del promotor 35S se transcriben en el núcleo de la célula mediante la acción de la RNA polimerasa II celular y los transcritos son transportados al citoplasma donde se traducirán e inducirán la replicación del genoma del virus mediante la replicasa viral. La técnica más utilizada para llevar a cabo esta estrategia consiste en la clonación del cDNA en un vector binario capaz de replicarse en *A. tumefaciens* y la utilización de los cultivos bacterianos portadores de dicho vector para infiltrar hojas de plantas. De este modo, y aprovechando la maquinaria de *A. tumefaciens*, el vector viral será translocado al núcleo de la célula huésped, donde dará comienzo su transcripción. La menor degradación del RNA, la mayor estabilidad de los clones virales con el paso del tiempo y la mejor infectividad de los mismos, hacen aconsejable esta metodología para estudios de la función génica y la patogenicidad viral en plantas

2. El cultivo de los cítricos

Los cítricos cultivados incluyen especies e híbridos de los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, incluidos en la familia *Rutaceae*, Subfamilia *Aurantiolioideae*. El cultivo de estas especies, originarias del sureste asiático, probablemente se inició en China, desde donde se diseminó a otras regiones del mundo, inicialmente mediante el movimiento de semillas y posteriormente como plantas completas o material propagativo, lo que a su vez facilitó la propagación de patógenos de unas regiones a otras. Actualmente, el cultivo de los cítricos se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales. En España, se cultivan principalmente en las zonas costeras del este y del sur peninsular. Las especies cultivadas se pueden englobar en 4 grupos: i) las naranjas dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb) y amargas (*C. aurantium* L.), ii) las mandarinas, principalmente satsumas (*C. unshiu* (Mak.) Marc) y clementinas (*C. clementina* Hort. Ex Tan.), iii) los limones (*C. limon* (L.) Burm. f.) y limas (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) y iv) las zambosas (*C. grandis* (L.) Osb.) y pomelos (*C. paradisi* Macf.).

El informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) de 2015 indica que la producción mundial de cítricos asciende

a más de 121 millones de toneladas anuales, siendo el mayor cultivo frutal. Del total de toneladas mundiales, aproximadamente, 6,5 millones son producidas en España, lo que la sitúa en la quinta posición entre los países productores, por detrás de China (30 mill.), Brasil (19 mill.), EEUU (9 mill.) y México (8 mill.) y la primera en exportación de fruta fresca, con más de 3 millones de toneladas anuales. España destina unas 300.000 hectáreas a este cultivo y la producción más importante es la de naranjas, que representa un 52%, seguida por las mandarinas con un 31% y los limones con 16%, sin embargo, la producción de pomelos (aprox. 1%), zamboas y limas (0.4 %) es irrelevante (Figura 4).

El cultivo de los cítricos se realiza mediante injerto de yemas de una variedad, seleccionada por sus características organolépticas, sobre un patrón cultivado a partir de semilla. Los patrones suelen ser poliembriónicos y al sembrar las semillas generalmente germina uno de los embriones nucelares (genéticamente idénticos a la planta madre) en vez del embrión zigótico, lo que genera la homogeneidad genética de los patrones en una misma plantación.

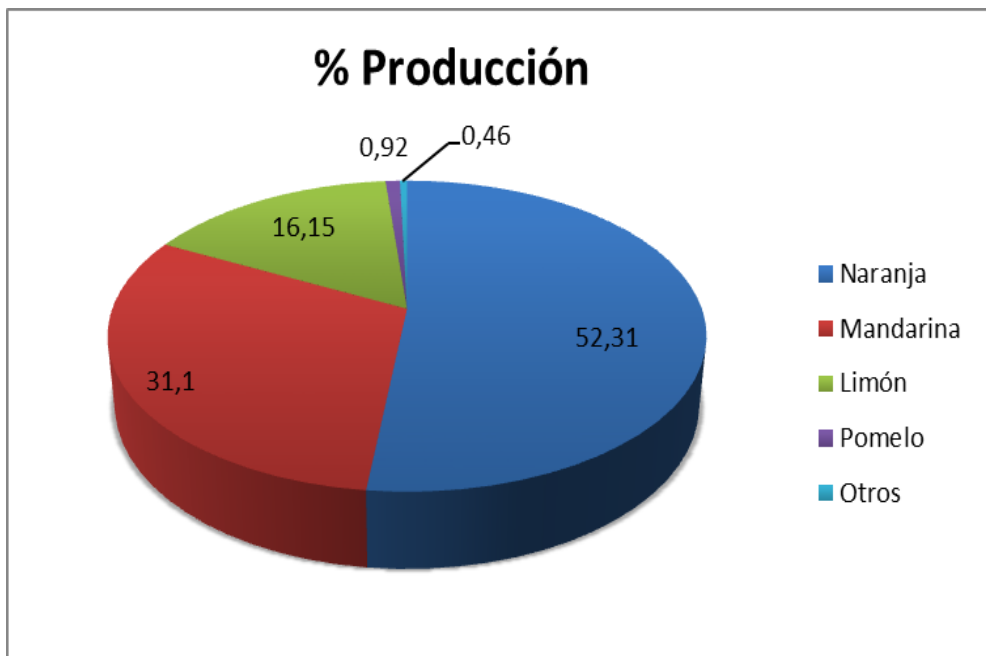


Figura 4: Representación del porcentaje de producción de los distintos tipos de cítricos en España en el año 2015. Datos del informe anual de FAO (2015).

La propagación vegetativa de la variedad de interés garantiza la homogeneidad genética de las copas. Este método permite escoger el patrón más adecuado para las condiciones locales de cultivo, así como la variedad de mayor interés, pero presenta dos graves inconvenientes: i) la disminución de la diversidad genética hace que el cultivo sea más vulnerable al ataque de patógenos y ii) el proceso de multiplicación vegetativo tiende a acumular y perpetuar los patógenos transmisibles por injerto que en algún momento hayan infectado la variedad. Este fenómeno causó, durante décadas, el deterioro sanitario de las variedades más utilizadas. Con el fin de revertir esta tendencia y mejorar la calidad y productividad de las plantaciones fue necesario la implantación de sistemas de cuarentena, saneamiento y certificación de plantas (Navarro, 1993).

Durante un siglo el patrón predominante en la citricultura española fue el naranjo amargo (NA), que presenta excelentes cualidades agronómicas como resistencia a la asfixia radical, salinidad, clorosis férrica o sequía, inducción de una buena producción y calidad del fruto, resistencia a los patógenos *Phytophthora spp*, *Armillaria mellea* y tolerancia a diversas enfermedades transmisibles por injerto como exocortis, psoriasis o caquexia. La aparición y dispersión del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) dio lugar a importantes epidemias que destruyeron masivamente estas plantaciones y obligó a reconvertir la citricultura con el uso de patrones tolerantes o resistentes a CTV como el citrange carrizo. Sin embargo, éste presenta problemas de tolerancia a la salinidad y al terreno calizo, que no muestra el NA y su utilización masiva como patrón supone un nuevo riesgo para la citricultura actual por la posible aparición de patógenos que pudieran afectarle.

3. La tristeza de los cítricos

La tristeza es la enfermedad viral más grave de este cultivo. Se estima que, tan sólo en España, más de 50 millones de árboles de naranjo dulce (ND), mandarino (*C. reticulata* Blanco) y pomelo injertados sobre NA han muerto como consecuencia de esta dolencia. A nivel mundial, los daños ascienden a más de 100 millones de árboles muertos. El agente causal de esta enfermedad, CTV, un miembro del género *Closterovirus* (Fawcett y Wallace, 1946; Kitajima *et al.*, 1963; Bar-Joseph *et al.*, 1970, 1972; Flores *et al.*, 1975; Garnsey *et al.*, 1977) probablemente procede, al igual que los cítricos, de países asiáticos en los que

estaría bien adaptado a las variedades locales. Con el intenso movimiento de yemas y material vegetativo que tuvo lugar a partir de la segunda mitad del s. XIX, CTV debió dispersarse a nuevas regiones, variedades y combinaciones variedad-patrón, vectores y condiciones climáticas, que probablemente favorecieron su evolución y la aparición de nuevas cepas del virus.

3.1. Gama de huéspedes y síntomas

CTV puede infectar la mayoría de especies y variedades del género *Citrus* y algunas especies de los géneros *Fortunella*, *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* y *Swinglea* (Bar-Joseph y Lee, 1989a; Bar-Joseph *et al.*, 1989b; Moreno *et al.*, 2008). CTV no se acumula en *P. trifoliata* (L.) Raf. o sus híbridos con ND o pomelo (Garnsey *et al.*, 1987), aunque sí se ha observado una replicación normal en protoplastos de *P. trifoliata* (Albiach-Martí *et al.*, 2004). Se ha descrito la transmisión experimental de viriones de CTV a algunas especies del género *Passiflora* (Müller *et al.* 1974; Yoshida *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000) y a *Nicotiana benthamiana* (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2003; Gowda *et al.*, 2005; Ambrós *et al.*, 2008; 2011; 2013). La intensidad y tipo de síntomas inducidos por CTV en campo depende de las variedades infectadas, del patrón sobre el cual están injertadas, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Grant y Costa, 1951; Aubert y Bové, 1984; Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993). Aunque algunos aislados de CTV son asintomáticos, la mayoría producen uno o más de los siguientes síntomas: i) Decaimiento de plantas injertadas sobre NA, un síndrome conocido como “tristeza”, ii) enanismo, acanaladuras en la madera y fruta pequeña en algunas variedades (*stem pitting*, SP) y iii) enanismo y amarilleo de plantas de semilla de limonero, pomelo o NA, un síndrome conocido como *seedling yellows* (SY) (Fraser, 1952).

El síndrome de decaimiento de las plantas injertadas sobre NA ha sido el causante de la muerte masiva de árboles en numerosas regiones citrícolas e inspiró el nombre de la enfermedad “tristeza” y el del propio virus. El decaimiento es consecuencia de la muerte del floema del NA por debajo de la línea de injerto (Schneider, 1959), lo que conlleva la desnutrición y muerte de las raicillas que da lugar al amarillamiento y progresiva defoliación de la copa (Figura 5A) (McClellan,

1974; Moreno *et al.*, 1983, 2008). No obstante, en ocasiones, este proceso puede ocurrir en unas pocas semanas y se conoce como colapso o “quick decline” (Ben-Ze`ev *et al.*, 1989). Normalmente, los árboles afectados muestran pequeñas proyecciones en la cara cambial de la madera, por debajo de la línea de injerto, que se corresponden con pequeños orificios en la corteza (Figura 5B), un síntoma frecuentemente utilizado para el diagnóstico de CTV en campo (Moreno *et al.*, 1983, 2008). La mayoría de especies cítricas injertadas sobre NA son sensibles al decaimiento por CTV, entre estas especies se incluyen ND, mandarinos y pomelos. Sin embargo, se han descrito aislados que causan infecciones asintomáticas en estas combinaciones (Bové *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1991; Borbón *et al.*, 1995; Albiach-Martí, *et al.*, 2000b). Así mismo, los limoneros injertados sobre NA no decaen.

El síndrome de SP lo producen algunos aislados de CTV en distintas especies y variedades de cítricos injertadas sobre cualquier patrón. Este síntoma se caracteriza por la aparición de acanaladuras o picado en la madera, a veces con deformación de las ramas y el tronco, enanismo, clorosis nervial en hojas jóvenes y acorchamiento de las nerviaciones en hojas adultas (Figura 5C y 5D) (Grant, 1959; McClean, 1974). Además, conlleva la disminución del tamaño y calidad del fruto (Figura 5E) (Müller y Costa, 1968; Sasaki, 1981; Da Graça *et al.*, 1984).

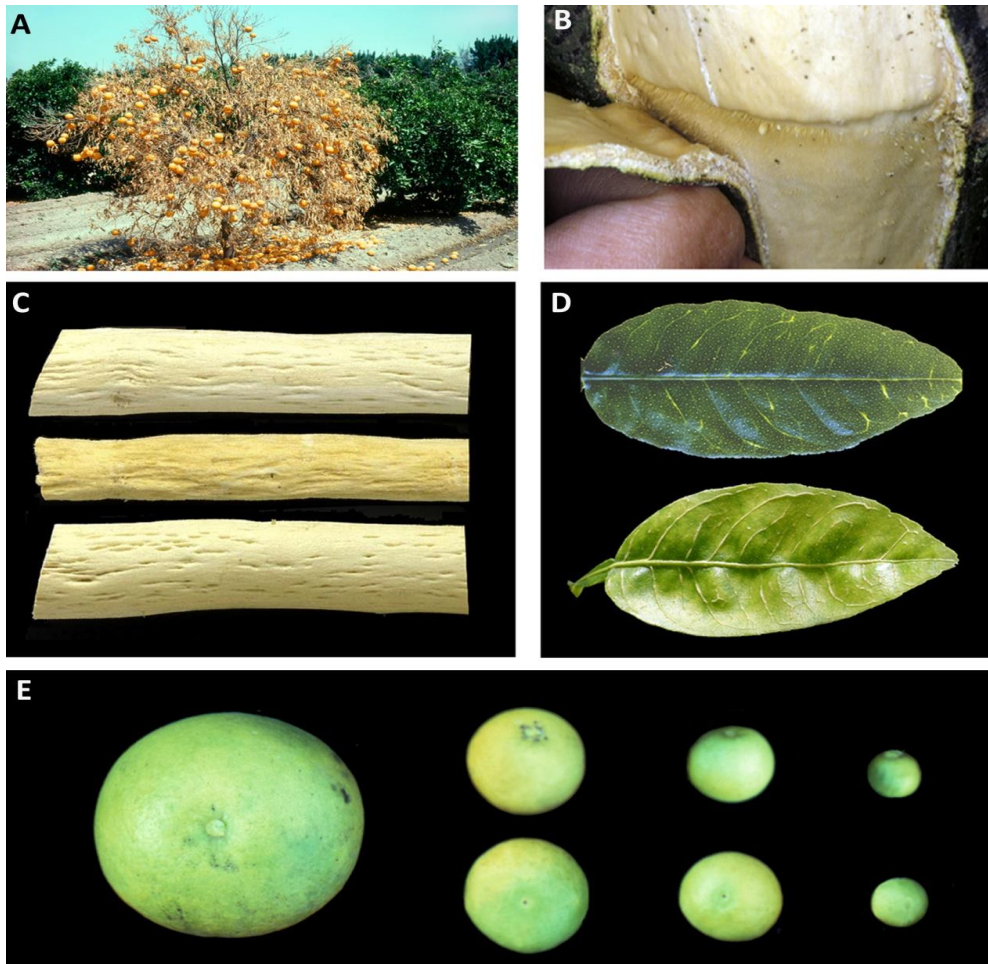


Figura 5: Sintomatología de CTV. A) Colapso de una planta de ND propagada sobre NA. B) Proyecciones en la cara cambial de la madera y orificios en la corteza por debajo de la línea de injerto. C) Acanaladuras en la madera. D) Clorosis nervial y acorchamiento de las nerviaciones de hojas de *C. macrophylla* y LM, respectivamente. E) Producción de frutos de pomelo de menor tamaño en comparación con un fruto de planta no infectada (izquierda), (modificado de Ruiz-Ruiz, 2007).

Finalmente, el síndrome de SY, no suele aparecer en campo y es producido por algunos aislados en NA, pomelo o limonero de semilla. Consiste en una clorosis generalizada de las nuevas brotaciones con reducción o incluso detención del crecimiento (Figura 6). Este síntoma, es utilizado en invernadero para caracterizar aislados de CTV (Fraser, 1952; Wallace, 1978).

Algunas especies como la lima Mejicana (LM), el cidro Etrog (*C. medica* L.) o *C. macrophylla* Wester son muy sensibles al virus y muestran los síntomas característicos con casi todos los aislados del virus (Grant, 1959; McClean, 1974). Por ello, estas especies han sido utilizadas como plantas indicadoras para el diagnóstico de tristeza. Por el contrario, otras especies, como los mandarinos, son muy tolerantes; mientras que, los pomelos, ND y kumquats (*Fortunella* spp.) entre otras, presentan una tolerancia intermedia, lo que conlleva la aparición de síntomas sólo con algunos aislados de CTV (Bitters, 1972).



Figura 6: Síndrome de *seedling yellows* (SY). Amarillamiento y enanismo de las nuevas brotaciones post-inoculación en plantas de NA (A) o pomelo (B) de semilla.

3.2. Transmisión de CTV

La diseminación de CTV a nuevas áreas geográficas se produce como consecuencia de la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión local está asociada a la transmisión del virus por pulgones. Esta transmisión (de modo semi-persistente) varía en eficiencia dependiendo de la especie transmisora, de los aislados de CTV, de las especies donante y receptora y de las condiciones ambientales (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Yokomi y Garnsey,

1987). El vector más eficiente en la transmisión de CTV es *Toxoptera citricida* (Yokomi, *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1968; McClean, 1975; Lastra *et al.*, 1991; Grisoni y Riviéri, 1993), un vector tradicionalmente distribuido en Asia, América del Sur y Central, islas del Caribe, Florida (EEUU), África Central y África del Sur. Hace unos 10 años se detectó en el Norte de España y Portugal (Ilharco *et al.*, 2005), lo que supone una amenaza para la citricultura de la cuenca mediterránea, donde el patrón NA sigue siendo predominante en muchas regiones y la incidencia de CTV sigue siendo comparativamente baja. El segundo vector más eficiente de CTV es *Aphis gossypii* (Norman *et al.*, 1968; Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher *et al.*, 1988), que es el vector más importante en América del Norte y la cuenca del Mediterráneo. Otras especies de pulgones como *A. spiraecola* y *T. aurantii* son menos eficientes (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Yokomi y Garnsey, 1987), sin embargo, en algunas regiones sus poblaciones son más abundantes, por lo que realmente tienen un papel en la dispersión de CTV (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984).

3.3. Diagnóstico

La observación directa de síntomas en campo es un procedimiento poco fiable para diagnosticar la presencia de CTV. La observación de proyecciones en la madera y orificios en la cara cambial de la corteza del NA por debajo de la zona de injerto es el método más utilizado en campo. Sin embargo, este síntoma no es totalmente específico de CTV puesto que no se observa en las infecciones recientes, ni sirve para diagnosticar la infección en plantas propagadas sobre patrones tolerantes al decaimiento, por lo que es necesario utilizar ensayos adicionales para confirmar la presencia del virus.

Tradicionalmente, el método más empleado es el ensayo de infectividad en invernadero inoculando por injerto plantas indicadoras de semilla sensibles a CTV (LM o *C. macrophylla*) (Roistacher, 1991; Garnsey *et al.*, 1995) y observando al cabo de varios meses la aparición de los síntomas característicos (clorosis nervial y SP). Aunque el método es específico y sensible para el diagnóstico de CTV, es un procedimiento muy lento y costoso y no permite análisis masivos de muestras, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos.

Tras la purificación de CTV y producción de anticuerpos contra la proteína de la cápsida del virus, el método más utilizado pasó a ser la detección serológica basada en enzimo-inmunoensayos con anticuerpos mono o policlonales (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) realizados en microplacas (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1979; Nikolaeva *et al.*, 1998; Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1986) o utilizando improntas de brotes o peciolos de hojas sobre una membrana de nitrocelulosa para inmovilizar el antígeno (ELISA-*immunoprinting*, inmunoimpresión-ELISA o IP-ELISA) (Garnsey *et al.*, 1993). IP-ELISA permite realizar las improntas directamente en campo, lo que evita la preparación de extractos vegetales, es más rápido y barato que el ensayo convencional en microplaca y tiene una sensibilidad mayor. Las membranas pueden ser almacenadas durante largos períodos y transportadas fácilmente para su procesamiento, lo que hace esta técnica muy adecuada para el análisis masivo de muestras.

Finalmente, tras obtener la secuencia nucleotídica completa del gRNA de varios aislados de CTV, se desarrollaron múltiples métodos basados en la detección específica del RNA viral como la hibridación molecular con sondas de cDNA o cRNA (Rosner y Bar-Joseph, 1984; Narváez *et al.*, 2000; Barbarossa y Savino, 2006), o mediante retro-transcripción y amplificación (RT-PCR) de secuencias virales (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Además, se han desarrollado métodos con una elevada sensibilidad para detectar CTV en pulgones como immuno-capture (IC) RT-PCR, en la que la reacción de amplificación se realiza en unos tubos donde los viriones han sido capturados previamente por anticuerpos específicos, o *nested*-PCR que incorpora una segunda ronda de amplificación con cebadores internos (Cambra *et al.*, 2002). En los últimos años, se han desarrollado protocolos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para la detección y cuantificación del virus en tejidos infectados (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Saponari *et al.*, 2008) o de variantes de secuencia presentes en aislados con diferente virulencia (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009).

La comparación de los síntomas inducidos en diferentes plantas indicadoras (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Garnsey *et al.*, 1991) es todavía el único método fiable para la caracterización patogénica de aislados de CTV; sin embargo, tras la secuenciación de múltiples aislados de CTV se han desarrollado algunos procedimientos para identificar grupos específicos de aislados e intentar asociarlos con características patogénicas mediante el uso de marcadores

moleculares (Permar *et al.*, 1990; Gillings *et al.*, 1993; Rosner y Bar-Joseph, 1984; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Narváez *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2003; Hilf *et al.*, 1999; Ayllón *et al.*, 2001; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2003; Ayllón *et al.*, 1999b; d'Urso *et al.*, 2000, 2003; Rubio *et al.*, 1996; Sambade *et al.*, 2002; Harper, 2013).

3.4. Control de la enfermedad

Existen distintas medidas para el control de la dispersión de CTV que varían según la incidencia, los aislados del virus y las variedades de cítricos predominantes en cada región (Garnsey *et al.*, 1998).

Las medidas preventivas para evitar la introducción del patógeno o su dispersión incluyen el control sanitario del material vegetal propagativo mediante programas de saneamiento, cuarentena y certificación, la erradicación de plantas infectadas o el control de vectores. En países donde CTV todavía no se ha establecido, los programas de cuarentena y certificación del material propagativo importado, complementado con un programa de saneamiento de las variedades locales, son de vital importancia (Navarro *et al.*, 2002). En países donde el virus está restringido a algunas zonas citrícolas con baja incidencia y el patrón predominante es el NA, se puede establecer un programa de erradicación de árboles infectados que retrase el avance o elimine la enfermedad. Estos programas se han implantado en zonas de California (Dodds y Lee, 1991), Israel (Bar-Joseph *et al.*, 1974) y Chipre (Kyriakou *et al.*, 1996). Cuando la erradicación ya no es posible, la única forma de evitar el decaimiento es la sustitución del NA por patrones tolerantes al decaimiento. Esta solución es efectiva en regiones donde predominan aislados de CTV poco agresivos, sin embargo, si predominan aislados virulentos que causan SP en variedades de ND o pomelo la utilización de patrones tolerantes es insuficiente y se hace preciso un programa de protección cruzada para evitar el debilitamiento de los árboles, la baja producción y la fruta de pequeño tamaño (Roistacher *et al.*, 1988; Koizumi *et al.*, 1991; Broadbent *et al.*, 1991). Éste consiste en la pre-inoculación de las plantas con aislados de CTV avirulentos que dificulten la infección y acumulación de los aislados virulentos (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987). No obstante, su aplicación en campo conlleva algunos riesgos, como la capacidad de evolución del aislado protector a formas agresivas (Fulton, 1986), por lo que únicamente se debe aplicar en

regiones donde la enfermedad de la tristeza es endémica y presenta aislados muy agresivos. Es el caso de Brasil, donde se han aplicado dichos programas de protección cruzada para proteger al ND Pera (Costa y Müller, 1980) o en Sudáfrica para proteger al pomelo Marsh (Van Vuuren *et al.*, 1993). Sin embargo, en otros países, estos programas han fracasado o la protección proporcionada sólo ha sido temporal (Thornton y Stubbs, 1976; Wallace y Drake, 1976; Bar-Joseph, 1978; Powell *et al.*, 1992; Folimonova *et al.*, 2010).

Una forma eficaz de protección de las plantas frente a las infecciones virales es la utilización de genes de resistencia. En algunas especies cítricas se han identificado genes de resistencia frente a CTV (Mestre *et al.*, 1997a, b y c; Fang y Roose, 1999; Yang *et al.*, 2001, 2003; Rai, 2006), pero su incorporación en variedades comerciales mediante cruzamientos convencionales no ha sido posible debido a i) la compleja biología reproductiva de los cítricos, ii) su elevada heterocigosis, iii) los largos períodos juveniles de las plantas de semilla y iv) el gran tamaño que alcanzan las plantas en estado adulto, que limita el número de híbridos a ensayar. Una alternativa interesante sería la obtención de plantas transgénicas con resistencia mediada por genes de CTV (Peña *et al.*, 1995a, b; Peña y Séguin, 2001). En los ensayos efectuados hasta el momento, las únicas plantas transgénicas con resistencia total a CTV se obtuvieron utilizando como transgén una construcción con complementariedad interna (tipo *intron-hairpin*) con secuencias no traducibles de los tres genes supresores del silenciamiento (Soler *et al.*, 2012). No obstante, la implantación de esta medida actualmente se ve dificultada por el rechazo generalizado e institucional de la utilización en campo de organismos transgénicos.

3.5. El virus de la tristeza de los cítricos: viriones y organización del RNA genómico

CTV es un miembro del género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph y Lee, 1989a; Martelli *et al.*, 2000). Los miembros de esta familia presentan viriones de morfología filamentosos (10-12 x 800-2000 nm) y flexuosa (Figura 7) y poseen genomas formados por 1-3 moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (Agranovsky, 1996; Bar-Joseph *et al.*, 1979; Karasev, 2000; Dolja *et al.*, 2006), encapsidadas por dos proteínas diferentes: la CP, que recubre la mayor parte del genoma, y la CPM, que cubre únicamente una

región reducida del extremo 5' terminal (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996; Satyanarayana *et al.*, 2004).

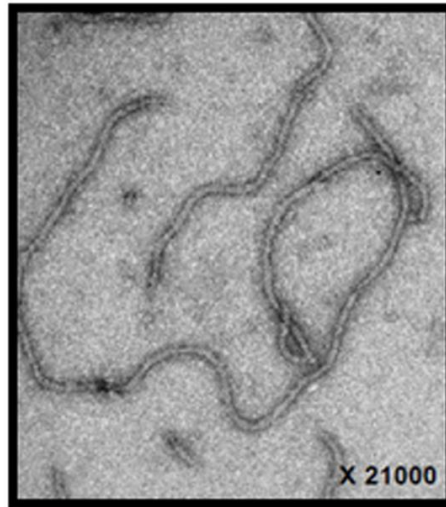


Figura 7: Micrografía electrónica de viriones de CTV purificados a partir de plantas de LM infectadas. La fotografía corresponde a una tinción negativa con acetato de uranilo al 1% y visualizada a 80 kV, realizada por la Dra. Silvia Ambrós.

El genoma de CTV está organizado en 12 pautas de lectura abierta (*open reading frames*, ORFs) que potencialmente codifican 17 proteínas y 2 regiones no codificantes (*untranslated terminal regions*, UTR) de 107 nt en el extremo 5' terminal y de 273 en el 3' terminal (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 2015). La mitad 5' terminal del genoma codifica el módulo de replicación, formado por las ORFs 1a y 1b. La primera, codifica para una poliproteína de 349 KDa que incluye dos dominios proteasa (PRO) con similitud a las proteasas tipo papaína (L-Pro) que podrían haberse generado por una duplicación en tándem y cuya función consistiría en la proteólisis de la poliproteína de este módulo de replicación; un dominio helicasa (HEL) y otro metiltransferasa (MET). La segunda, la ORF 1b, codifica una proteína de 57 KDa con los dominios típicos de las RNA polimerasa dependientes de RNA (RdRp) (Karasev *et al.*, 1995). En cambio, la mitad 3' presenta i) un módulo de cinco genes (p6, p65, p61, p27 y p25) característicos de los closterovirus, que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje y movimiento célula a célula de los viriones; ii) el gen p20, homólogo al gen p21 de BYV; y iii) cuatro genes que

codifican las proteínas p33, p18, p13 y p23, que representan proteínas únicas de CTV sin homología con otros closterovirus (Dolja *et al.*, 2006) (Figura 8).

La región 5' UTR podría participar en la unión a los ribosomas del huésped para facilitar la traducción de la ORF 1 y obtener la replicasa viral necesaria para amplificar el gRNA y transcribir las ORF 2 a 11. Además, esta región no codificante está relacionada con la unión de p27 (CPm) a dicho extremo 5' (Satyanarayana *et al.*, 2004). Por el contrario, la región 3' UTR podría estar implicada en el reconocimiento de la RNA polimerasa, como ocurre en otros virus de plantas (Gallie y Kobayashi, 1994).

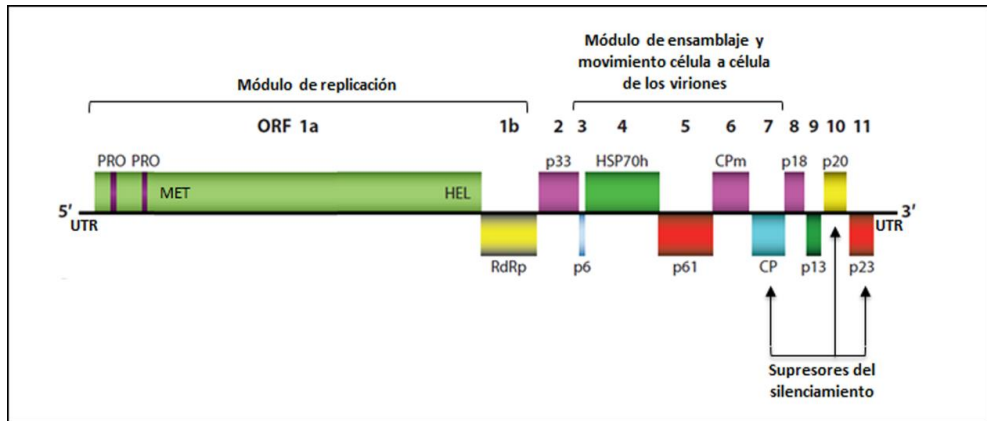


Figura 8: Representación gráfica de la organización genómica de CTV. Las cajas representan las 12 (1a, 1b, 2-11) ORFs y los dominios homólogos a la proteasa tipo papaina (PRO), metiltransferasa (MET) y helicasa (HEL). Las regiones 5' y 3' no traducibles están indicadas como UTR. RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA. Hsp70: proteína de choque térmico. CPm: proteína de cápsida minoritaria (p27). CP: proteína de cápsida (p25). Se indican los módulos de replicación, ensamblaje y movimiento célula a célula de los viriones, así como los tres supresores del silenciamiento descritos para CTV (Tomado de Dawson *et al.*, 2015).

Estudios realizados con el aislado T36 de Florida (GenBank AY170468), revelaron que la proteína p27 recubre los 627 nt del extremo 5', mientras que, la proteína p25 recubre el resto del genoma (18.669 nt) y que las proteínas p65 (Hsp70) y p61 intervienen en este ensamblaje específico, pues en ausencia de éstas, p27 es capaz de cubrir una proporción mayor del genoma, incluso el gRNA completo

(Satyanarayana *et al.*, 2004). La proteína p20 presenta una elevada afinidad consigo misma y se acumula formando cuerpos de inclusión amorfos en las células infectadas (Gowda *et al.*, 2000). La proteína p6, homóloga a la de BYV, actúa como proteína de movimiento viral (Peremyslov *et al.*, 2004). La proteína p23, una proteína específica de unión a RNA (López *et al.*, 2000), es la responsable del control de la acumulación asimétrica de los RNAs de ambas polaridades durante la replicación y transcripción del gRNA (Satyanarayana *et al.*, 2002). Además, constituye un determinante de patogenicidad de CTV, ya que plantas transgénicas de LM que expresaban el gen *p23* del aislado T36 de CTV mostraron síntomas foliares similares a los observados en plantas no-transgénicas infectadas por CTV, mientras que plantas transgénicas con una versión truncada de *p23* mostraron un fenotipo normal (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005). La expresión de *p23* bajo el control de un promotor específico del floema en plantas de LM provocó la aparición de síntomas idénticos a los de CTV, SP y clorosis nervial, sin las aberraciones observadas en la expresión constitutiva de dicho gen. La acumulación específica en el floema de una versión truncada de *p23*, mostró que los primeros 157 nt eran suficientes para inducir esta sintomatología, probando que la región N-terminal de *p23* es la responsable de la inducción de los síntomas de SP, clorosis nervial y posiblemente acorchamiento nervial en LM (Soler *et al.*, 2015).

Las proteínas p33, p18 y p13 están implicadas en la invasión sistémica de diversos huéspedes y en la inducción de SP. Diversos mutantes del aislado T36 con los genes *p33*, *p18* o *p13* deletados en distintas combinaciones, no sólo se replicaron y ensamblaron en algunas especies cítricas (Satyanarayana *et al.*, 1999; 2000; Tatineni *et al.*, 2008) sino que en ocasiones presentaron síntomas de SP más acusados que el clon de CTV no modificado (Tatineni *et al.*, 2012). El gen *p33* es necesario para que tenga lugar la infección sistémica de T36-CTV en NA y limonero, mientras que la presencia de los genes *p33* o *p18* es suficiente para la infección sistémica del pomelo y la presencia de *p33* o *p13* para la infección sistémica del calamondin (*C. mitis* Blanco). Esto sugiere que la adquisición de diversos genes no conservados (*p33*, *p18* y *p13*) aumentó la capacidad de CTV para interactuar con múltiples huéspedes, extendiendo así su gama de hospedadores a lo largo de la evolución (Tatineni *et al.*, 2011). Por otro lado, la expresión heteróloga de *p33* en plantas de *N. benthamiana* mostró su acumulación en vesículas citoplasmáticas asociadas a los plasmodesmos y la formación de túbulos protuberantes a través de los canales plasmodesmicos.

Además, su co-localización con la proteína de movimiento p6, sugiere que p33 presenta características típicas de una proteína de movimiento viral (Bak y Folimonova, 2015; Khang *et al.*, 2015).

3.6. Expresión del genoma viral

La expresión del genoma de CTV incluye tres estrategias ampliamente descritas en otros virus de RNA de polaridad positiva, necesarias para multiplicarse e invadir el huésped: i) procesamiento proteolítico, ii) deriva ribosomal tipo +1 y iii) producción de sgRNAs 3' co-terminales (Figura 9) (Hilf *et al.*, 1995; Karasev *et al.*, 1995, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2002a, b; Gowda *et al.*, 2001, 2003; Ayllón *et al.*, 2003, 2004). La replicación del gRNA de CTV implica la síntesis de una cadena de RNA complementaria de polaridad negativa que sirve como molde para generar nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva, que constituyen el genoma del virus. Las ORFs 1a y 1b se traducen directamente a partir del gRNA viral. Como se ha comentado, la primera codifica para una poliproteína de 349 kDa que se procesa proteolíticamente, mientras que la traducción de la segunda se da por un proceso de deriva ribosomal tipo +1 ocasional y codifica la RdRp de 57 kDa (Karasev *et al.*, 1995).

Los 10 genes restantes, localizados en la mitad 3' del gRNA de CTV, se expresan mediante la síntesis de sgRNAs 3' co-terminales. Estos actúan como mRNA para la traducción del gen situado en la posición 5' terminal (Hilf *et al.*, 1995) (Figura 9).

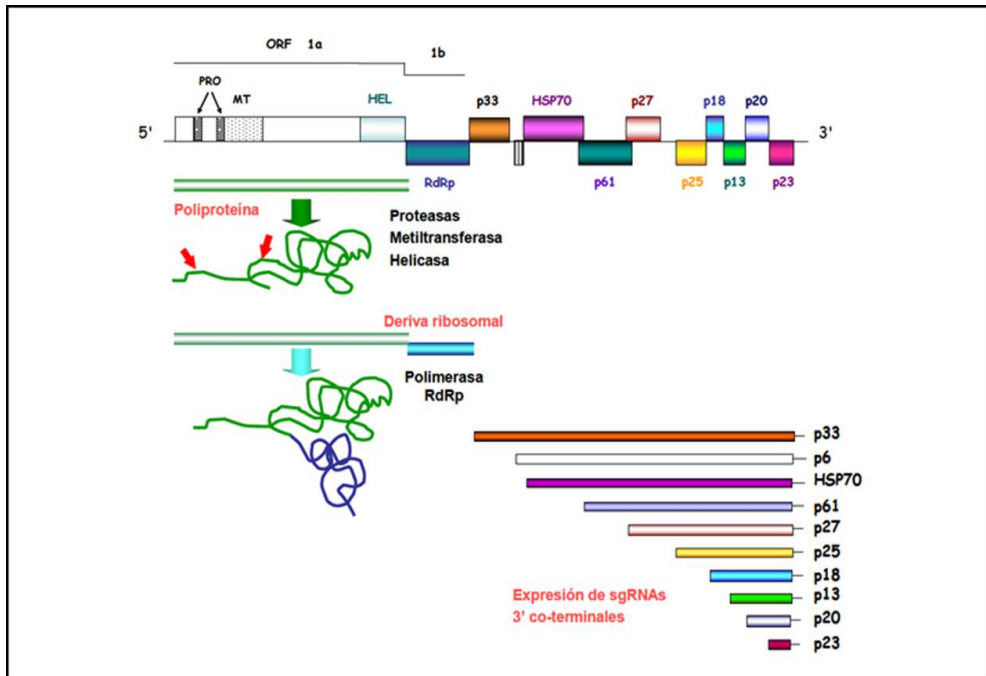


Figura 9: Representación gráfica del genoma de CTV y de las estrategias de expresión de las distintas ORFs del extremo 5' y 3' (tomado de la Tesis doctoral de Susana Ruiz-Ruiz, 2009).

La producción de sgRNAs permite al virus regular la expresión de cada gen de forma independiente al resto en cuanto a cantidad y tiempo (Navas-Castillo *et al.*, 1997). El primer sgRNA que se detecta tras un proceso de infección corresponde a la ORF 11 que codifica para la proteína p23, mientras que los más abundantes corresponden a las ORFs 7 y 10, que codifican para las proteínas p25 y p20, respectivamente (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004).

A lo largo del gRNA existen una serie de secuencias reguladoras, denominadas elementos controladores (*controller elements*, CE) (Figura 10), que se localizan en la posición 5' respecto al inicio de transcripción de cada sgRNA (Karasev *et al.*, 1995; Gowda *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2003).

El nombre de elementos controladores, hace referencia a la controversia sobre si se trata de secuencias promotoras en la cadena negativa del gRNA, a las que se unen la polimerasa y a partir de las cuales se da la síntesis de la cadena positiva, o por el contrario, se trata de secuencias terminadoras donde finalizan las copias de la cadena negativa, copias que posteriormente servirán de molde para la síntesis

de la cadena de polaridad positiva (Gowda *et al.*, 2001, 2003a; Ayllón *et al.*, 2004). Cada CE induce la formación de 3 sgRNAs diferentes: i) un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva utilizado como mRNA para la expresión del gen adyacente a dicho CE, ii) un RNA de polaridad negativa complementario al anterior pero cuya acumulación en la célula es mucho menor (Satyanarayana *et al.*, 2002b) y iii) un tercer RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que se extiende desde el extremo 5' del gRNA al extremo 5' del CE. Este último RNA podría generarse como consecuencia de una terminación prematura de la síntesis de nuevas copias de gRNA en las proximidades de cada CE. Además, se han caracterizado dos CE próximos al extremo 5' del genoma que generan dos RNAs 5' co-terminales de cadena simple y polaridad positiva, denominados LMTs (*Low molecular weight tristeza*). El tamaño del LMT1 oscila entre los 842 y 854 nt, mientras que el del LMT2 oscila entre 744 y 746 nt (Che *et al.*, 2001). LMT1 se produce durante la replicación (Gowda *et al.*, 2003a), mientras que LMT2 está asociado con el proceso de ensamblaje del virión (Gowda *et al.*, 2009).

Las células del huésped infectadas por CTV frecuentemente acumulan grandes cantidades de RNAs defectivos (*defective RNA*, dRNA) de cadena tanto positiva como negativa que contienen los extremos 5' y 3' del gRNA, pero carecen de una porción central variable. Los dRNA se generan por sucesos de recombinación no homóloga mediante diversos mecanismos como la rotura, ligación entre diferentes cadenas, cambio de molde en la replicación o por finalización del molde original (Nagy y Simon, 1997). La gran mayoría de los dRNA de CTV caracterizados hasta la fecha consisten en la fusión directa de fragmentos de tamaños variable de los extremos 5' y 3' (Mawassi *et al.*, 1995a, b; Yang *et al.*, 1997, 1999; Ayllón *et al.*, 1999a). La mayoría de aislados de CTV presentan uno o más dRNAs con tamaños que varían entre 2 y 5 Kb (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995a, b).

Los dRNA de pequeño tamaño, carecen de capacidad auto-replicativa, pero contienen las secuencias necesarias para ser correctamente transcritos por la maquinaria del virus y pueden ser encapsidados (Mawassi *et al.*, 1995). La replicación de estas moléculas de dRNAs puede interferir con la del gRNA y dar lugar a una disminución de la intensidad de los síntomas en plantas infectadas (Hillman *et al.*, 1987; Rochon, 1991; Burguán *et al.*, 1992; Scholthof *et al.*, 1995), a una intensificación de los mismos (Li *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1993) o no verse alterados (White *et al.*, 1991; Graves y Roosinck, 1995). En el caso de CTV, la

presencia de dRNAs provoca un efecto de interferencia y se ha sugerido que estos podrían modular la expresión de los síntomas (Yang *et al.*, 1999; Bar-Joseph y Mawassi, 2013).

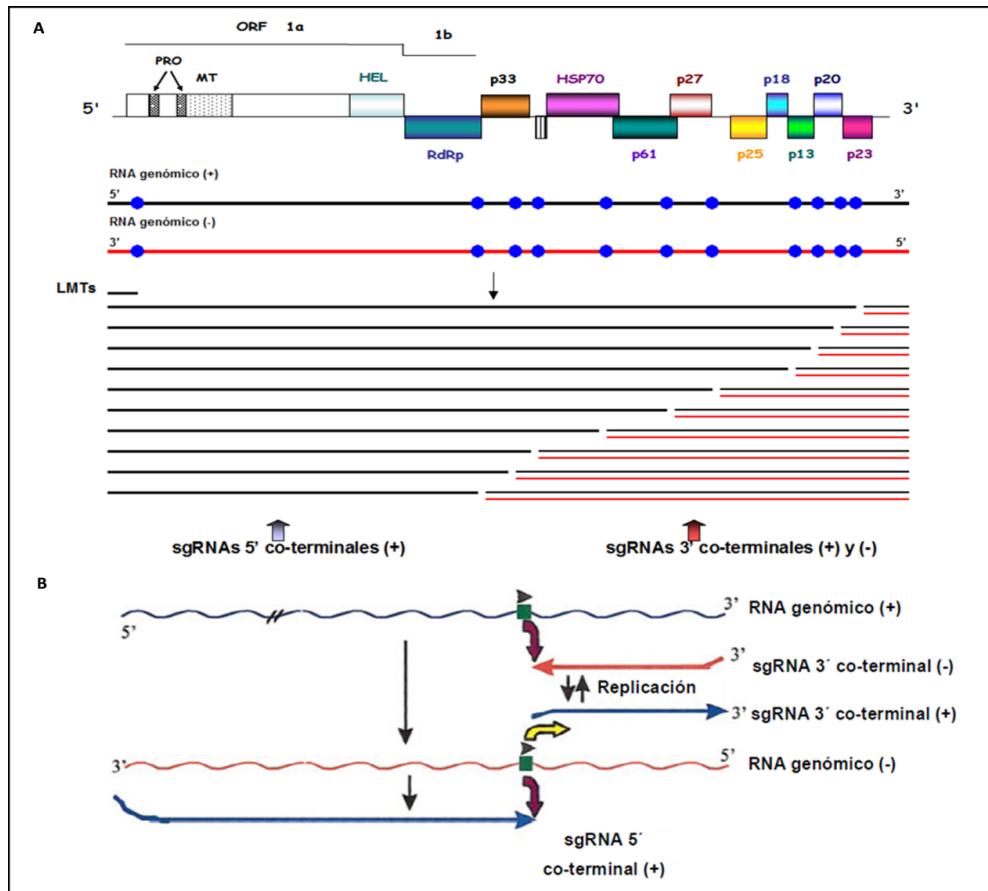


Figura 10: Modelo de replicación y formación de los distintos tipos de moléculas de RNA detectados en células infectadas. Las líneas negras indican las cadenas de polaridad positiva y las rojas de polaridad negativa. Las posiciones relativas de los CE, que inducen la formación de los diferentes sgRNAs, se indica con esferas azules sobre el gRNA. A) Expresión de las ORFs 2-11 mediante sgRNAs 3'co-terminales que actúan como mensajeros de la ORF presente en su extremo 5'. B) Modelo propuesto para la replicación de los sgRNAs por acción de los CE, las flechas granates o amarillas indican terminación o inicio de la transcripción en el CE, respectivamente (tomado de la Tesis doctoral de Susana Ruiz-Ruiz, 2009).

3.7. Variabilidad genética

Actualmente se dispone de la secuencia genómica completa de 92 aislados de CTV, con orígenes geográficos y características patogénicas diferentes (Pappu *et al.*, 1994; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 1999; Harper *et al.*, 2008; 2009; Harper, 2013). La variabilidad genética está distribuida a lo largo del genoma de CTV de manera irregular. El extremo 3' UTR es la región más conservada, con una identidad genética media del 95%; mientras que el extremo 5' UTR es la más variable, con valores de identidad incluso inferiores al 50% (López *et al.*, 1998). No obstante, todas las secuencias 5' UTR se agrupan en tres clases (I, II y III), con una identidad de secuencia intra-grupo en torno al 88% y con identidades inter-grupo del 55-57% entre la clase I y II, del 62-64% entre las clases II y III, y del 44-45% entre las clases I y III. Las secuencias 5' UTR más frecuentes son las del tipo III. Los aislados poco agresivos analizados sólo muestran secuencias de esta clase, mientras que los más virulentos contienen normalmente secuencias de las clases I, II o incluso ambas (López *et al.*, 1998, Ayllón *et al.*, 2001).

Sólo en el aislado virulento español T318A se detectó una secuencia única de la clase II (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006). Así mismo, se ha observado una distribución desigual en la variación genética entre regiones codificantes e incluso dentro de un mismo gen que posiblemente reflejen diferentes presiones de selección a lo largo del genoma (Rubio *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2009).

La comparación de secuencias entre aislados con características patogénicas y orígenes geográficos diferentes revelaron: i) un elevado grado de conservación entre genomas de CTV separados en tiempo y espacio (Vives *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009) y ii) que las poblaciones virales de los aislados de CTV están formadas en algunos casos por una variante de secuencia mayoritaria y varias minoritarias, estrechamente relacionadas entre sí (Albiach-Martí *et al.*, 2000b), mientras que en otros, muestran una estructura compleja con variantes de secuencia altamente divergentes (Vives *et al.*, 1999; Ayllón *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009).

Varios factores influyen en la variabilidad y estructura genética de las poblaciones de CTV en campo, entre ellas se encuentran la mutación, la deriva genética, la selección, los eventos de recombinación entre variantes de secuencias divergentes o el flujo génico como consecuencia de las repetidas inoculaciones en

los árboles de campo y al movimiento de las yemas infectadas entre distintas regiones geográficas. Los virus de RNA, como CTV, pueden evolucionar con rapidez mediante procesos de mutación debido a que las RdRp presentan una alta tasa de error, al carecer de función correctora (Domingo y Holland, 1997). La recombinación homóloga y no-homóloga podría ser un proceso rápido de evolución de CTV, pues esta segunda, ha sido ampliamente documentada en la generación de dRNAs (Guerra *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995a, b; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999a). Se han comprobado diferencias de secuencias compatibles con la deriva genética, asociadas con la disminución del tamaño eficaz en las poblaciones virales, causado por los cuellos de botella que suponen la transmisión por pulgones o el cambio de huésped (Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Ayllón *et al.*, 2006; Sentandreu *et al.*, 2006). Estos cambios, a veces van acompañados de diferentes comportamientos patogénicos (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Brlansky *et al.*, 2003).

En cuanto al flujo génico, las plantas de cítricos permanecen largos períodos de tiempo en campo, lo que facilita que el mismo árbol pueda sufrir repetidas inoculaciones por pulgones portadores de variantes de CTV con secuencias divergentes. Este hecho puede generar poblaciones virales complejas aumentando la diversidad genética dentro de un mismo aislado (Kong *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2006). Por otro lado, el movimiento de yemas infectadas con CTV, puede reducir la diversidad genética entre regiones geográficas, puesto que tiende a crear una única población de CTV. Un ejemplo de ello son las poblaciones de CTV de California y de España que pueden ser consideradas como una población única (Rubio *et al.*, 2001).

3.8. Interacción virus-planta

CTV es un virus floemático estricto cuya gama de huéspedes naturales está limitada al género citrus y especies relacionadas. La restricción al floema implica que el movimiento del virus ocurre principalmente por los vasos floemáticos, aunque también está presente en las células acompañantes o en el parénquima del floema. En la especie más susceptible, como *C. macrophylla* o LM, se observan agrupamientos de células infectadas, consecuencia de un movimiento célula a célula, mientras que este fenómeno no ocurre en NA o pomelo, en los que el virus se observa en células aisladas (Folimonova *et al.*, 2008).

El movimiento y acumulación de CTV dentro de un mismo huésped varía dependiendo del aislado (Comellas, 2009), lo que podría ser debido a diferencias en las proteínas supresoras del silenciamiento o en las proteínas p33, p18 y p13 que son necesarias para la infección de algunas especies huésped (Tatineni *et al.*, 2008). La proteína p23, implicada en la expresión de los síntomas (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Albiach-Martí *et al.*, 2010; Tatineni y Dawson, 2012), parece tener un papel en el movimiento y tropismo de CTV, ya que su expresión constitutiva en plantas transgénicas de ND y NA dio lugar a una mayor acumulación del virus en el caso del NA y al movimiento de éste a células del mesófilo en ambas especies. Además, en las plantas transgénicas de NA se observó el virus en grupos de células vecinas, lo que implica un movimiento célula a célula que no se observa en NA no transgénico (Fagoaga *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestro conocimiento de las interacciones CTV-huésped tanto para el movimiento dentro de la planta como para la expresión de síntomas es aún muy limitado.

3.8.1. Movimiento viral

El movimiento de los closterovirus en las plantas infectadas resulta algo más complejo que el de otros virus. Al menos en el miembro tipo del género, BYV, se han descrito 5 proteínas distintas que podrían estar implicadas en el movimiento célula a célula de sus viriones: CP, CPm, p6, HSP70h y p64 (Peremyslov *et al.*, 1999; Prokhnevsky *et al.*, 2002). La proteína HSP70h presenta distintas funciones: i) está relacionada con el ensamblaje de los viriones (Satyanarayana *et al.*, 2000), ii) está implicada en la unión a canales intercelulares (Alzhanova *et al.*, 2000) y iii) presenta unión a microtúbulos (Karasev *et al.*, 1992). En células infectadas se ha determinado su localización subcelular en los plasmodesmos (Medina *et al.*, 1999). De hecho, se ha propuesto un modelo para el ensamblaje y movimiento de los viriones de closterovirus, donde HSP70h media la unión de la CPm al extremo 5' terminal del RNA viral y gracias a la unión de la proteína HSP70h a los plasmodesmos celulares, es translocado a células vecinas (Alzhanova *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha descrito que la proteasa y la proteína p20 participan en el movimiento a larga distancia (Prokhnevsky *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003).

La identificación de las proteínas de movimiento de CTV es aún menos precisa. No obstante, diversas proteínas de CTV han sido relacionadas con el movimiento y la

capacidad de cursar infección sistémica. Así, la expresión transitoria de la proteína p23 del aislado T36 de CTV fusionada al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein, gfp*) en *N. benthamiana*, ha confirmado su localización en los plasmodesmos celulares, lo que sugiere de nuevo que esta proteína podría estar implicada en el proceso de movimiento célula a célula de los viriones de CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). La expresión heteróloga de p33 en *N. benthamiana* reveló la formación de vesículas agregadas localizadas en los plasmodesmos celulares, lo que también sugiere su implicación en el movimiento célula a célula durante el proceso de infección (Tatineni *et al.*, 2015).

Por otro lado, las proteínas p6 y p20, pero no p33, p18 o p13 de T36-CTV, son necesarias para establecer una infección sistémica en *C. marcophylla*. Sin embargo, estas últimas sí son necesarias para el movimiento del virus en NA y pomelo y en otros huéspedes (Tatineni *et al.*, 2008, 2011), lo que pone de manifiesto el papel crucial de la interacción específica entre los aislados de CTV y las distintas variedades de cítricos en el proceso de infección sistémica.

3.8.2. Genes de resistencia (R) de la planta

Algunas especies del género *Citrus*, muestran resistencia a ciertos aislados de CTV (Garnsey *et al.*, 1987; Fang y Roose, 1999; Asins *et al.*, 2004), pero este fenómeno es más común en especies de otros géneros de la subfamilia *Aurantioideae*, entre las que se encuentran algunas especies de *Fortunella*, *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia* y *Swinglea glutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987; Yoshida, 1996; Mestre *et al.*, 1997a). Protoplastos de *P. trifoliata* replican y acumulan viriones de CTV a niveles muy similares a los de huéspedes tolerantes como el ND, lo que sugiere que esta resistencia está asociada al movimiento del virus dentro de la planta y no a su multiplicación (Albiach-Martí *et al.*, 2004). *P. trifoliata* es resistente a la mayoría de aislados de CTV y esta resistencia, que se transfiere a algunos de sus híbridos (citranges y citrumelos), está asociada al gen dominante *Ctv*. Este gen se ha localizado en una región de 121 kb que incluye 9 genes más (Yoshida, 1985; Gmitter *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997 a, b; Fang *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Rai, 2006). El gen *Ctv-m*, también identificado en *P. trifoliata*, es esencial para que esta especie limite la dispersión de CTV en las plantas heterocigóticas para el gen *Ctv*, mientras que, en las homocigóticas no es necesario (Mestre *et al.*, 1997b).

3.8.3. Supresores del silenciamiento génico

Se ha demostrado que las proteínas p20, p25 y p23 de CTV, actúan como supresores del silenciamiento en plantas de *N. tabacum* y *N. bethamiana*, en las que p23 suprime el silenciamiento intracelular, p25 el intercelular y p20 actúa a ambos niveles (Lu *et al.*, 2004). p23 comparte características con HC-Pro, ya que ambas actúan a nivel intracelular pero no intercelular y ninguna de las dos produce la metilación del DNA. La proteína p20 se asemeja a la proteína 2b de CMV, pues actúan a ambos niveles de silenciamiento, siendo más potente el silenciamiento intercelular. Los sgRNAs de las tres proteínas supresoras son los más abundantes en plantas infectadas con CTV (Hilf *et al.*, 1995; Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004).

La proteína p23 es el supresor de silenciamiento de CTV que más se ha estudiado. Al igual que otros supresores, p23 es una proteína multifuncional que además de ser supresora del silenciamiento, interviene en la regulación de la acumulación diferencial de las hebras del gRNA de distinta polaridad (Satyanarayana *et al.*, 2002) e induce síntomas similares a los de CTV al ser expresada constitutivamente, e idénticos cuando se expresa bajo el control de un promotor de floema en plantas de LM (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Soler *et al.* 2015). Esto indica que p23 es el determinante de patogenicidad responsable de los síntomas de clorosis nervial y SP en lima. Por otra parte, la sustitución del gen p23 más la región 3' UTR en un clon infeccioso del aislado T36 de Florida (que produce el síndrome de SY en NA y pomelo) por la región homóloga del aislado T30 (el cual no induce SY) dio lugar a un clon híbrido que no producía SY a pesar de acumular viriones a niveles normales, lo que indica que el motivo de patogenicidad de SY se localiza en la región 3' terminal (p23 + 3'UTR) (Albiach-Martí *et al.*, 2010). Además, como ya se ha indicado, la expresión ectópica de p23 incrementa la acumulación viral y favorece el movimiento en NA y permite a CTV salir del floema en NA y ND. Estos efectos podrían ser debidos, en parte, a la supresión del PTGS por parte de p23 o a su implicación en el movimiento del virus (Fagoaga *et al.*, 2011).

Los 3 supresores de silenciamiento, p20, p23 y p25 se localizan preferentemente en el núcleo celular. Sin embargo, se ha demostrado que p23 también se localiza en los plasmodesmos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013), apoyando así su posible función en el movimiento de los viriones célula a célula. La localización de p25 difiere según

el aislado de CTV. Así, la proteína de la cápsida de los aislados T36 y T385 se localiza en el núcleo celular mientras que la de T318A, un aislado muy virulento, presenta una señal de exportación nuclear (*nuclear exportation signal*, NES), que justifica su acumulación preferente en el citoplasma celular. Esta señal de exportación ha sido ampliamente estudiada por el Dr. Josep Navarro López (2017, datos no publicados) y corresponde a una región rica en leucinas, localizada en el extremo N-terminal de la proteína. Finalmente, p20 forma agregados perinucleares y nucleares, en los dos aislados estudiados (T36 y T318A) (Navarro-López, 2011 y 2017, datos no publicados). Estos agregados se han relacionado con los cuerpos de inclusión observados en tejidos infectados por CTV (Gowda *et al.*, 2000).

3.9. Clones infecciosos de CTV

El estudio de la función de los distintos genes virales y su interacción con los factores del huésped requiere disponer de clones infecciosos de cDNA del genoma viral para poder manipularlo convenientemente y observar los efectos de los cambios introducidos sobre la replicación e infección del virus. Estos clones se requieren para disponer de poblaciones virales homogéneas de distintos aislados viales y de este modo, poder estudiar las interacciones sinérgicas o antagónicas entre ellos cuando infectan una misma planta, entender la variabilidad de las poblaciones virales en campo, el predominio de distintas variantes de secuencia según las variedades, las poblaciones de vectores o las condiciones ambientales de las distintas zonas de cultivo.

No obstante, CTV es un virus que presenta una gran dificultad para desarrollar un sistema genético basado en clones de cDNA infecciosos. El primer reto fue la retro-transcripción, replicación y correcta expresión de todos los genes presentes en las $\approx 20\text{kb}$ de su gRNA. El segundo fue la selección de un huésped experimental apropiado, ya que CTV no tiene huéspedes herbáceos conocidos y la gama de huéspedes naturales se limita a plantas de *Citrus* y géneros afines, y dentro de éstas, la infectividad se restringe a las células del floema.

Garnsey y colaboradores (1977) desarrollaron un método para inocular mecánicamente plantas de cítricos mediante incisiones en la corteza con una cuchilla mojada en una preparación purificada de viriones, si bien se requería una

alta concentración de viriones intactos. La difícil obtención hasta el momento de una elevada cantidad de viriones de CTV imposibilitó la inoculación mecánica de plantas cítricas mediante esta técnica. Por otro lado, se logró la inoculación de cDNAs virales bajo el control de un promotor adecuado por métodos biolísticos o mediante agroinoculación con algunos virus limitados al floema (Leiser *et al.*, 1992; Prifer *et al.*, 1995). Sin embargo, no se ha conseguido infección mediante inoculación biolística de gRNA o cDNA de CTV y la agroinoculación directa de cítricos con cDNA de longitud completa de CTV se vio muy dificultada por el gran tamaño del gRNA y la superficie cerosa de las hojas de plantas cítricas.

Finalmente, Satyanarayana y colaboradores (1988; 1999; 2001) consiguieron desarrollar un sistema genético para el aislado T36 de Florida. Este sistema genético estaba basado en el uso de clones de cDNA bajo el control de un promotor inducible, capaz de producir transcritos de RNA infecciosos en los protoplastos de un huésped herbáceo experimental (*N. benthamiana*). Tras sucesivos pases de los viriones a nuevos protoplastos, se alcanzaba una concentración de viriones suficiente para inocular mecánicamente plantas de cítricos, en las que se reproducían los síntomas característicos del aislado T36. Este importante avance permitió producir clones infecciosos mutantes de CTV para el estudio funcional de sus genes y la identificación de algunos determinantes de patogenicidad del virus.

Con el objetivo de desarrollar clones infecciosos de otros aislados de CTV, y como control previo para ver si era posible construir un sistema genético similar al de T36, se analizó la infectividad de viriones de 4 aislados diferentes de CTV en células de *N. benthamiana*. Para ello, protoplastos de esta especie fueron trasfectados con viriones purificados a partir de cítricos, estos cítricos estaban infectados con los aislados T318A, T385, T305 y T36 (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013). Los cultivos de protoplastos se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 5 días. Se realizaron extracciones de RNA_t a diferentes tiempos para analizar mediante hibridación tipo *Northern-blot* (Figura 11a y b). Los resultados evidenciaron que los tres aislados agresivos inductores de síndromes como SP o SY en diferentes huéspedes cítricos (T318A, T305 y T36) se replicaban en protoplastos de este huésped experimental.

Mientras que, el aislado asintomático T385 resultó incapaz de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana*. Además, dichos análisis mostraron que el

aislado T318A es detectable a partir del 3 dpi y alcanza los mismos niveles de expresión que T36 a 5 dpi (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013).

Sin embargo, el sistema genético basado en pases sucesivos de protoplastos presentaba tremendas dificultades e incertidumbres. Los cultivos celulares se infectaban con gran facilidad, se necesitaban sucesivos pases para tener una elevada concentración de viriones y luego poder inocular mecánicamente cítricos y los resultados no eran suficientemente reproducibles.

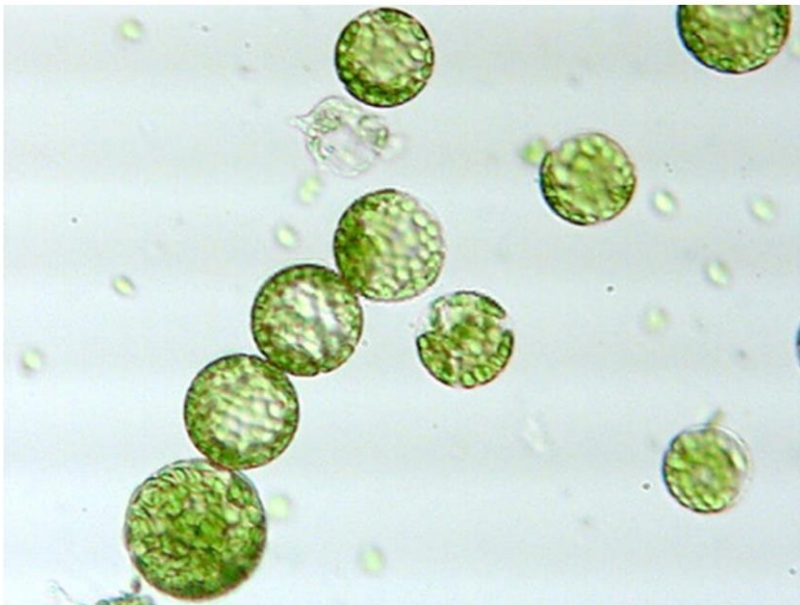


Figura 11a. Fotografía de protoplastos de *N. benthamiana* procedentes del mesófilo. (Representación modificada de Ruiz-Ruiz, 2009).

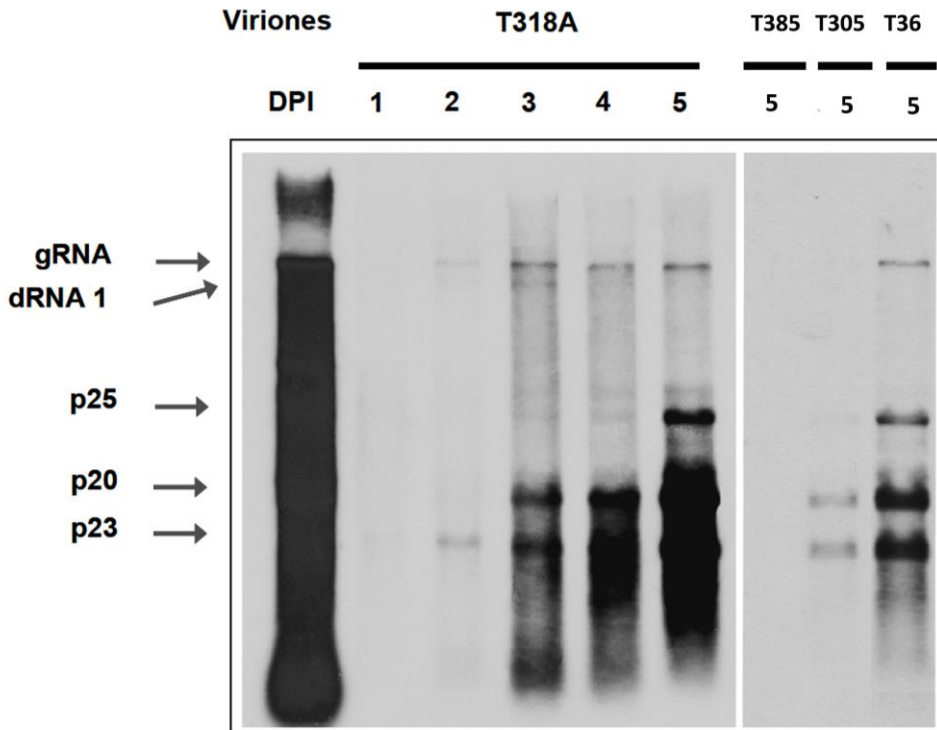


Figura 11b: Hibridación molecular tipo *Northern-blot* de RNAt de protoplastos transfectados con viriones purificados de cítricos infectados con viriones de los aislados T318A, T385, T305 y T36 a diferentes días post-inoculación (dpi). La membrana se hibridó con una sonda RNA-DIG de polaridad negativa del extremo 3' co-terminal de p20, p23, p25 y del dRNA 1 de gran tamaño presente en T318A. (Representación modificada de Ruiz-Ruiz, 2009).

La construcción de un nuevo clon de cDNA viral de T36 de expresión *in vivo* permitió la agroinfiltración directa de dicho clon en hojas de *N. benthamiana* (Gowda *et al.*, 2004). Su posterior modificación y clonaje en un vector binario tipo *bacterial artificial chromosome* (BAC), para disminuir la toxicidad del clon y agroinoculación en hojas de *N. benthamiana*, junto a la co-agroinfiltración de supresores del silenciamiento para facilitar la infección (Ambrós *et al.*, 2011, 2013), permitió conseguir acumulación de viriones no sólo en las hojas agroinfiltradas sino en toda la planta, produciendo en dicho huésped experimental una infección sistémica (Figura 12).

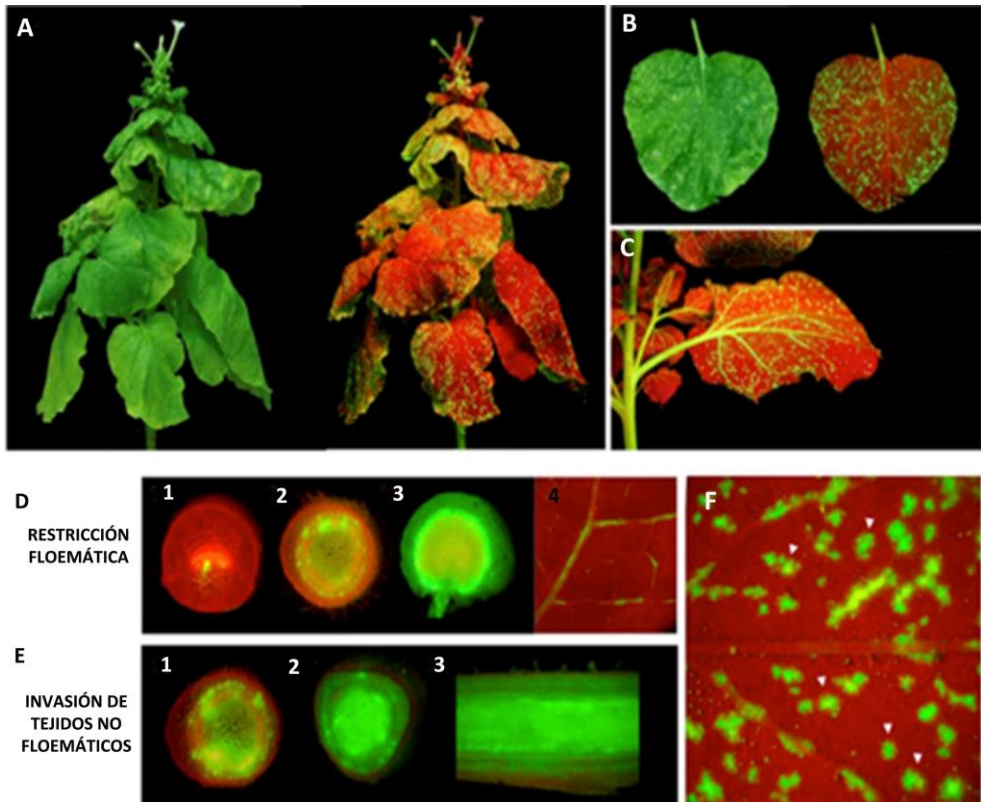


Figura 12: Invasión sistémica y distribución del clon de cDNA del aislado T36 marcado con GFP en plantas de *N. benthamiana*. Plantas visualizadas mediante lámpara UV o estereomicroscopio usando una fuente de luz de alta energía y un filtro de GFP. A) Misma planta agroinfiltrada con T36 y visualizada a simple vista (izquierda) o bajo luz UV (derecha). Se aprecia claramente la infección sistémica de CTV. 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).

Este nuevo procedimiento, permite que en 8-10 semanas la planta tenga suficiente carga viral para poder realizar la extracción de viriones con los que inocular mecánicamente cítricos (Figura 13), induciendo la sintomatología típica del aislado T36 CTV.

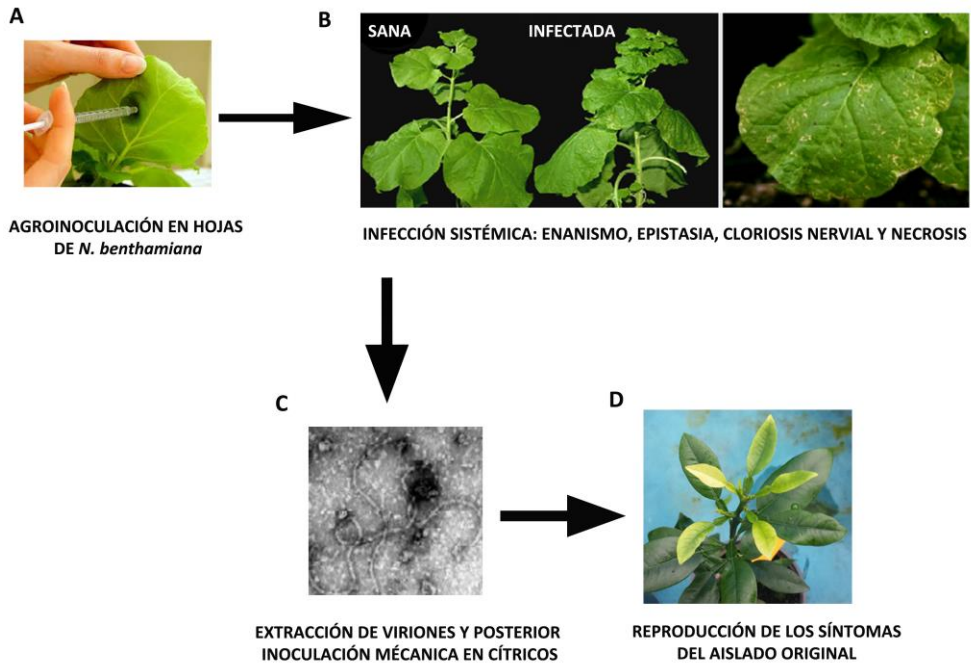


Figura 13: Esquema gráfico de la expresión *in vivo* de clones de cDNA de T36 de CTV mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* (A), la cual produce la infección sistémica de la planta y la aparición de síntomas similares a los desarrollados en el huésped original (B). Posterior purificación de los viriones a partir de las plantas infectadas sistémicamente (C) e inoculación mecánica en cítricos (D).

Por el contrario, los primeros ensayos para utilizar este sistema genético *in vivo*, basado en la agroinfiltración de clones infecciosos de cDNA del aislado virulento español T318A, no resultaron satisfactorios, a pesar de que este aislado es capaz de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana* (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Citrus tristeza virus (CTV) perteneciente al género *Closterovirus* (Fawcett y Wallace, 1946; Kitajima *et al.*, 1963; Bar-joseph *et al.*, 1970, 1972; Flores *et al.*, 1975; Garnsey *et al.*, 1977) es el agente causal de la enfermedad de la tristeza de los cítricos, una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo. Su nicho ecológico está reducido únicamente a especies de unos cuantos géneros de la familia *Rutaceae*. Se estima que, tan sólo en España, más de 50 millones de árboles de ND, mandarino y pomelo injertados sobre NA han muerto como consecuencia de la enfermedad de la tristeza. A nivel mundial, los daños ascienden a más de 100 millones de árboles. En la actualidad, CTV es prácticamente endémico en todas las regiones de Asia, Australia, África del Sur, Sudamérica y los países del Mediterráneo (Cambra y Moreno, 2000; Moreno, 2008). Aunque algunos de los aislados son esencialmente asintomáticos (Bové *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1993a, b) la mayoría de ellos pueden causar uno o más de los síndromes de “tristeza”, SY o SP. El síndrome de tristeza puede evitarse utilizando como patrones variedades cítricas resistentes al decaimiento (Moreno y Garnsey, 2010) como el citrange Carrizo. No obstante, el NA es uno de los patrones más deseables por sus excelentes cualidades agronómicas.

La diversidad e intensidad de los síntomas de CTV depende tanto del aislado viral como del huésped utilizado lo que sugiere que existen diferentes factores implicados en la interacción CTV-huésped y que estos podrían variar entre aislados y especies cítricas. La acumulación y movimiento de los virus en sus huéspedes están restringidos por la activación de mecanismos de defensa como las rutas de señalización del AS y el PTGS. Como contra-defensa, los virus de plantas codifican una serie de proteínas que actúan como supresores del PTGS (Csorba, 2015), de la ruta de señalización del AS (Laird *et al.*, 2013) o de otras rutas para vencer los mecanismo de defensa de la planta y progresar en la infección. CTV posee tres proteínas que actúan como supresores del PTGS a corta y/o a larga distancia (Gowda *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2004; Fagoaga *et al.*, 2011; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013; Josep Navarro López, 2017) y diferentes proteínas que actúan como determinantes de patogenicidad para distintos síndromes (Satyanarayana *et al.*, 1999; 2000; Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Tatineni *et al.*, 2008; 2011; 2012; Bak y Folimonova, 2015; Soler *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente se desconocen posibles supresores para otras rutas de defensa, así como, los motivos de patogenicidad del virus responsables de inducir SP en pomelo o ND o las proteínas de la planta que interaccionan con el virus para su multiplicación, movimiento o inducción de síntomas.

El control de los daños causados por aislados virulentos de CTV requiere disponer de métodos rápidos y eficaces para identificar los aislados potencialmente peligrosos, lo que exige identificar los genes de CTV implicados en la inducción de dichos síntomas. Para ello, es necesario disponer de un sistema genético eficiente basado en clones de cDNA infecciosos. Al comienzo de esta tesis, el único sistema genético eficaz disponible para CTV estaba basado en un clon de cDNA de longitud completa del aislado T36 de Florida (Satyanarayana *et al.*, 1999). Sin embargo, para identificar los genes de CTV implicados en la inducción del síndrome de SP en ND y pomelo era necesario disponer de un clon infeccioso de un aislado español productor de estos síntomas, como el aislado T318A. Con este fin, y previo al desarrollo de la presente tesis, se obtuvieron clones de longitud completa de T318A, un aislado severo de origen español que induce SP en dichos huéspedes. No obstante, la incapacidad del clon de cDNA de T318A para cursar infección sistémica en *N. benthamiana* y la imposibilidad de obtener viriones a partir de las hojas agroinoculadas que permitiese infectar cítricos, supuso una limitación importante para el uso de este clon en el estudio de los determinantes de patogenicidad del virus (Ruiz-Ruiz, 2009 y datos no publicados). La detección de varias mutaciones en el cDNA de T318A que podrían estar impidiendo el ensamblaje de los viriones, motivó que en el desarrollo de esta tesis se intentase la corrección de dichas mutaciones en los clones de T318A existentes y la obtención de nuevos clones marcados con *gfp* para detectar, en su caso, la acumulación y movimiento del virus.

El diferente comportamiento de T36 y T318A en la infección de *N. benthamiana*, sugería que ambos aislados interaccionan de forma diferente con los factores de dicho huésped experimental. Ello nos indujo a priorizar la comprensión de estas interacciones antes de intentar el estudio de los determinantes de patogenicidad con clones infecciosos. Considerando el uso en los últimos años de la proteómica como una nueva tecnología potente para estudiar en profundidad la compleja interacción huésped-patógeno, en la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el análisis proteómico de la interacción entre proteínas de CTV y el huésped experimental *N. benthamiana*. Por otra parte, el empleo de vectores virales para el silenciamiento génico post-transcripcional inducido por virus (VIGS) es una estrategia muy útil, que permite silenciar genes de interés de la planta y estudiar su función mediante genética reversa en un corto período de tiempo. Este aspecto es especialmente crítico en cítricos, ya que éstos poseen largos periodos juveniles (entre 6 y 8 años) y la transformación genética de material adulto es

muy compleja. El empleo en la presente tesis doctoral de un vector viral para cítricos previamente desarrollado en el laboratorio y basado en el genoma del virus del manchado foliar de cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV) ha permitido el estudio de la implicación de diferentes rutas de defensa de la planta en los mecanismos de defensa frente a CTV.

La recuperación del uso del patrón NA sería del máximo interés para la citricultura española. Sin embargo, debido al carácter endémico de CTV en la mayoría de las zonas cítricas españolas, esto requeriría el desarrollo de técnicas capaces de reducir o evitar el decaimiento y muerte de las plantas propagadas sobre NA. El conocimiento del mecanismo molecular de la resistencia del NA frente a la infección por CTV es un paso previo imprescindible para el desarrollo de estas técnicas.

Con el fin de avanzar en los conocimientos anteriormente indicados y cubrir algunas de las carencias señaladas, se establecieron los siguientes objetivos para la presente tesis doctoral:

- 1) Obtención de clones de cDNA infecciosos del aislado español T318A marcados con el gen *gfp* para estudiar la acumulación y movimiento del virus en el huésped experimental *N. benthamiana*.
- 2) Análisis de las interacciones diferenciales de las proteínas virales p20 y p25, de los aislados T36 y T318A, con el proteoma de *N. benthamiana* mediante un análisis proteómico de alto rendimiento.
- 3) Estudio de la implicación de las rutas del PTGS y de señalización del AS en la defensa del NA frente a la infección por CTV.

CAPÍTULO 1: CONSTRUCCIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL AISLADO T318A, MARCADO CON EL GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (*green fluorescent protein, gfp*).

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los determinantes de patogenicidad de virus de plantas requiere el desarrollo de un sistema genético eficiente basado en la elaboración de clones de cDNA infecciosos en los que introducir mutaciones y/o deleciones y estudiar así su efecto en la expresión de síntomas. En virus de RNA, la obtención de RNAs infecciosos implica la síntesis previa del cDNA correspondiente al gRNA mediante RT-PCR, así como su posterior clonación o ensamblaje en vectores adecuados para su amplificación y mantenimiento en bacterias y posterior expresión en plantas.

Existen diversas alternativas para la obtención de clones infecciosos de virus de RNA de plantas. Uno de ellos se basa en los vectores de transcripción *in vitro*, donde el cDNA se clona a continuación de un promotor específico reconocido por una RNA polimerasa dependiente de DNA que llevará a cabo la síntesis del RNA viral *in vitro*. El RNA sintetizado se introduce en la célula vegetal hospedadora mediante lipofección, electroporación, inoculación mecánica o transfección. Otra de las técnicas más utilizadas que se basa en la construcción de vectores de transcripción *in vivo* (vectores de expresión) en los que el cDNA se clona bajo el control de promotores constitutivos y se introduce directamente en la célula hospedadora. En este caso, la transcripción se produce en el núcleo celular vegetal a partir del promotor eucariótico por acción de la RNA polimerasa II celular, la traducción posterior del RNA viral en el citoplasma celular permite iniciar su replicación mediante la replicasa viral. A diferencia de la transcripción *in vitro*, en este último método, no se manipula el RNA directamente, pero ambos procesos están sujetos al mecanismo de PTGS del hospedador que reconoce el RNA viral como foráneo e induce su degradación en pequeños RNAs.

La infectividad de dichos RNAs virales transcritos *in vitro* o *in vivo* puede verse disminuida por diversos factores, por ejemplo, es frecuente que las secuencias virales resulten tóxicas e inestables en células procariotas y que los clones amplificados en bacterias sufran mutaciones y reorganizaciones que reduzcan o anulen su infectividad (Ruggli *et al.*, 1996; Polo *et al.*, 1997). En ocasiones se puede reducir la toxicidad de los cDNAs virales en bacterias mediante la utilización de vectores con bajo número de copias por célula como los vectores tipo BAC, o mediante el cambio de una cepa bacteriana por otra. Otras veces es necesario dividir la región tóxica y obtener clones parciales estables (Rice *et al.*, 1989; Sumiyoshi *et al.*, 1992; Yount *et al.*, 2000,2002). De igual modo, la introducción de

mutaciones que modifican la pauta de lectura cerca de las regiones tóxicas puede reducir la toxicidad, como se observó en el caso de CTV (Satyanarayana *et al.*, 2003). Finalmente, se puede evitar la expresión de la proteína tóxica o interrumpir la pauta de lectura de ésta mediante la inserción de uno o más intrones en distintas regiones del cDNA (Johansen, 1996; Yang *et al.*, 1998; López-Moya y García, 2000; González *et al.*, 2002; Marillonnet *et al.*, 2005). Estrategia llevada a cabo en clones de CTV (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2011).

La obtención de extremos exactos de los genomas parentales es otro problema añadido en la obtención de los RNA infecciosos. A veces la construcción de un cDNA que produzca un RNA con el extremo 5' preciso es incompatible con un buen rendimiento en la transcripción *in vitro*, mientras que asegurar un rendimiento de transcripción superior puede implicar que el RNA transcrito lleve en su extremo 5' uno o más nucleótidos no virales que den lugar a una disminución de su infectividad (Boyer y Haenni, 1994). Por otro lado, la precisión del extremo 3' de los transcritos sintetizados *in vitro* depende del sitio de restricción escogido para linearizar el cDNA antes de la transcripción, por lo que generalmente se incluyen algunos nucleótidos extra no virales al final de las secuencias. En el caso de RNAs sintetizados *in vivo*, mientras que la incorporación de varios nucleótidos extra en los extremo 5' o 3' no comprometen la infectividad de algunos virus (Boyer y Haenni, 1994), otros requieren un procesamiento exacto y no toleran ningún nucleótido extra en sus extremos. En el primer caso, la adición de secuencias terminadoras de la transcripción como la del gen de la nopalina sintasa (NOS-T) es suficiente para obtener RNAs viables, mientras que en el segundo caso, se puede añadir una secuencia ribozimática como la de la ribozima (Rbz) del virus Delta de la hepatitis (*Hepatitis virus Delta*, HDV) inmediatamente después del extremo 3' del cDNA viral, de forma que tras la transcripción se libere un RNA con el extremo 3' idéntico al del RNA viral (Dzianott y Bujarski, 1989; Ball, 1992). Con respecto a la precisión del extremo 5', se pueden generar RNAs sin nucleótidos extra utilizando versiones del promotor 35S de CaMV adecuadamente modificadas (Dessens *et al.*, 1993).

Como se ha descrito previamente, el único sistema genético disponible para CTV se basa en clones del aislado T36, desarrollados por primera vez en el laboratorio del Dr Dawson (University of Florida, C.R.E.C., Lake Alfred, EEUU). Inicialmente, este sistema se basaba en el uso de clones de cDNA bajo el control de promotores fágicos que permitía sintetizar transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de

N. benthamiana. Los viriones producidos, tras un proceso de amplificación mediante pases sucesivos a nuevos lotes de protoplastos, podían inocularse mecánicamente en cítricos y daban lugar a una infección sistémica con síntomas similares a los inducidos por el aislado T36 original (Satyanarayana *et al.*, 1999; 2001), (figura 1).

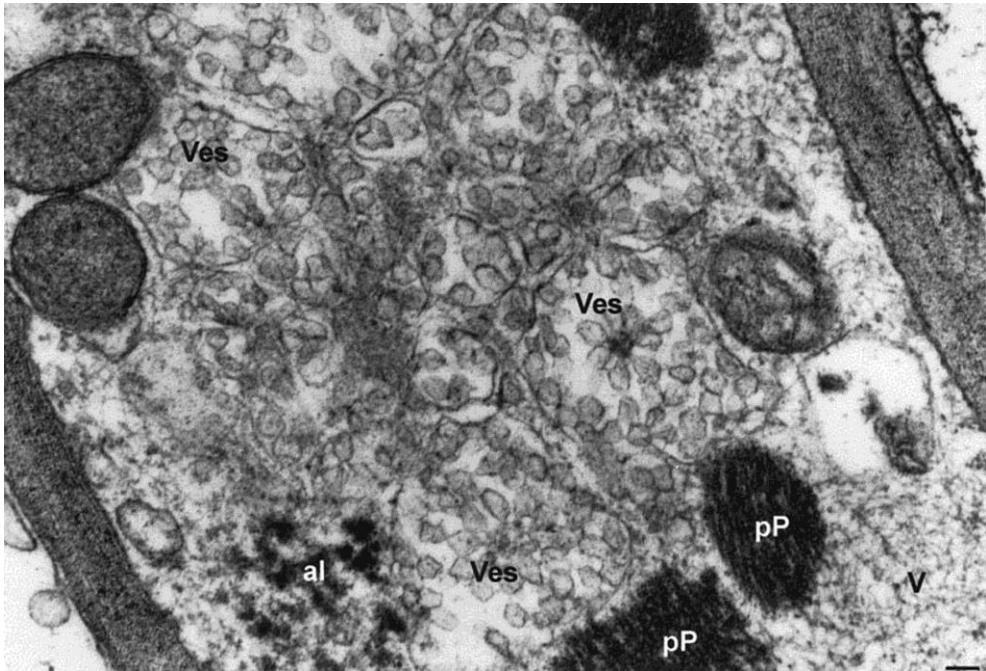


Figura 1: Microscopía electrónica de la ultraestructura de células de LM infectadas con clones del aislado T36 a 30 dpi. V: acumulación de las partículas virales de CTV. pP: agregados de partículas proteicas asociadas a la infección por CTV. al: Cuerpos de inclusión amorfos asociados a la infección por CTV. Ves: vesículas celulares típicas en las células del parénquima floemático. La barra indica la escala de 100 nm. Fotografía tomada de Satyanarayana *et al.*, 2001.

Este sistema permitió avanzar en el conocimiento de la biología molecular del virus y la función de algunas de sus proteínas. No obstante, presentaba serias limitaciones, así el gran tamaño del genoma de CTV y la toxicidad de algunas de sus regiones génicas reducía extraordinariamente el crecimiento de las bacterias y dificultaba la manipulación y mantenimiento de los clones (Satyanarayana *et al.*, 2003) (figura 2).

La baja infectividad de los transcritos (Gowda *et al.*, 2005), la necesidad de hacer al menos 6 pases en protoplastos con el fin de acumular suficientes viriones para la inoculación en cítricos y la frecuente contaminación de los cultivos de protoplastos, hacía que el sistema fuera muy lento e incierto en sus resultados.

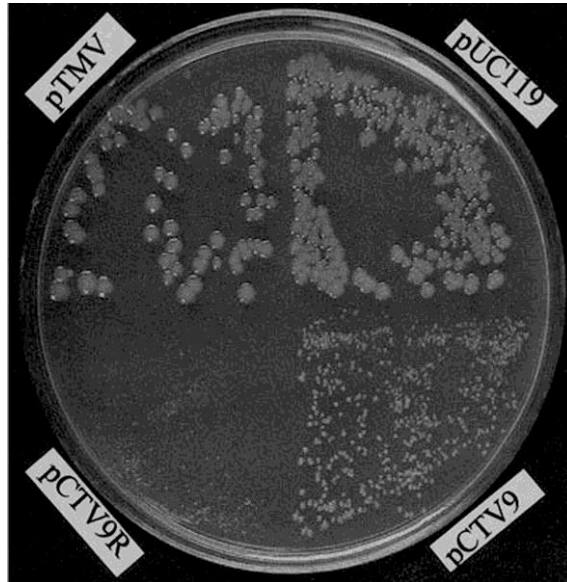


Figura 2: Representación de la toxicidad de los clones de CTV-T36 en cultivos bacterianos de *E. coli* a día 3 de incubación sembrados en LB-agar. pCTV9: colonias *E.coli* transformadas con un clon de CTV del aislado T36 que presenta una inserción en la posición 3732 nt correspondiente a la región tóxica de la ORF 1a. pCTV9R: colonias *E.coli* transformadas con un clon de T36 que presenta una serie de mutaciones en la región 3732 nt, las cuales conllevan un cambio en el marco de lectura y la disrupción de la ORF 1a. pTMV: colonias de *E.coli* transformadas con un clon de TMV (Dawson *et al.*, 1988). pUC119: colonias de *E.coli* transformadas con el vector parental donde se realizaron todas las construcciones de los diferentes clones empleados en este estudio. Fotografía modificada de Satyanarayana *et al.*, 2003.

Por todo ello, se desarrolló un nuevo sistema genético basado en la expresión del cDNA *in vivo* de CTV-T36 clonándolo bajo el control del promotor 35S del CaMV, seguido de una Rbz y del terminador NOS-T (Gowda *et al.*, 2005; Ambrós *et al.*, 2011) para asegurar un procesamiento correcto de los transcritos. Previamente, con la

finalidad de visualizar el progreso de la infección, se realizó la incorporación del gen *gfp*, que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), entre los genes codificantes de las proteínas de cubierta CP y CPM de T36. La clonación de estos *cassettes* en diversos vectores binarios para su expresión directa en plantas, permitió desarrollar y optimizar un nuevo sistema genético basado en la agroinfiltración (Gowda et al., 2005; Ambrós et al., 2011; 2013). Ensayos de agroinfiltración directa de cítricos realizados con diferentes cepas de *A. tumefaciens* en nuestro laboratorio y en el del Dr. Dawson no dieron lugar a infección sistémica ni a expresión detectable del RNA viral en tejidos infiltrados (Gowda et al., 2005 y Ambrós et al., 2013). No obstante, la co-infiltración de hojas de *N. benthamiana* con vectores binarios portadores del cDNA del genoma completo de T36 y vectores binarios portadores del gen *p19* de TBSV, un gen que codifica un potente supresor del silenciamiento mediado por RNA (Voinnet et al., 2005), dio lugar a la formación de viriones infecciosos en las hojas agroinfiltradas. Extractos semipurificados de éstas hojas e inoculados mecánicamente en cítricos produjeron una infección normal (Gowda et al., 2005).

La modificación en nuestro laboratorio del clon T36 mediante la incorporación del intrón ST-LS1 de patata (Eckes et al., 1986) interrumpiendo la región tóxica de la ORF 1a (Satyanarayana et al., 2003) y su clonación en un vector binario híbrido de bajo número de copias (tipo BAC) favoreció la estabilidad del clon en células bacterianas (Ambrós et al., 2011). El análisis temporal de la acumulación de CTV en hojas infiltradas de *N. benthamiana* mostró que la acumulación del RNA viral aumentaba progresivamente después de los 9 dpi utilizados por Gowda y colaboradores (2005). Más aún, nuestras plantas presentaban infección sistémica y una sintomatología específica que incluía epinastia, enanismo, clorosis nervial y necrosis de las hojas nuevas, que conducía al colapso generalizado y muerte de la planta en aproximadamente 1-2 meses. La distribución del virus en las plantas infectadas se limitaba inicialmente a los tejidos floemáticos pero con el tiempo se extendía a toda la planta, lo que permitía producir gran cantidad de viriones que tenían elevada infectividad en cítricos y reproducían los síntomas del aislado original. Estos resultados abrían la posibilidad de utilizar un sistema genético para CTV mucho más eficiente que el de protoplastos (Ambrós et al., 2008; 2011; 2013).

Para el estudio de los determinantes genéticos responsables del síndrome de SP de pomelo y ND es conveniente utilizar un clon de cDNA infeccioso de un aislado

que produzca estos síntomas. Puesto que el único clon infeccioso disponible era el del aislado T36, un aislado que induce SY y SP en LM (huésped muy susceptible) pero que no induce SP en pomelo o ND, en la tesis doctoral de la Dra. Susana Ruiz Ruiz se obtuvieron clones de longitud completa del aislado T318A, un aislado severo de origen español que induce SP en dichos huéspedes (Ruiz-Ruiz, 2009). Para reducir la toxicidad de dichos clones en células bacterianas, que resultó aún mayor con este aislado que en T36, se utilizó el vector tipo BAC pCH20 de bajo número de copias. Este vector de expresión contenía el cDNA de T318A bajo el control del promotor 35S, seguido de una Rbz y del terminador NOS-T. La capacidad infectiva de diferentes clones de cDNA de T318A obtenidos se testó mediante la agroinfiltración de hojas jóvenes de *N. benthamiana* con los clones de longitud completa (FL) denominados pCH20-FLT318A y con un vector portador del gen *p19* de TBSV para facilitar el proceso de infección. El análisis de las hojas infiltradas durante el primer mes mediante hibridación molecular tipo *Northern-blot* y cuantificación de gRNA mediante retro-transcripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), mostraron que el patrón de acumulación era diferente al observado con el aislado de CTV T36. Así, en las fases iniciales de la infección se observaba acumulación de gRNA y de los sgRNAs p20 y p23 de T318A hasta los 14 dpi para luego reducirse paulatinamente hasta ser prácticamente indetectable a partir de 28 dpi no observándose en ningún caso infección sistémica.

La incapacidad del clon de cDNA de T318A para inducir infección sistémica en *N. benthamiana* y la imposibilidad de obtener viriones a partir de las hojas agroinoculadas que permitiesen infectar cítricos, implicaba una limitación importante para el desarrollo de un sistema genético basado en un aislado inductor del síndrome SP y con ello del estudio de los determinantes de patogenicidad responsables.

Para averiguar si esta falta de infectividad era debida a reorganizaciones genómicas, pérdida de fragmentos o a la introducción de mutaciones letales se seleccionó uno de los clones que había mostrado mayor eficacia replicativa (pCH20-FLT318A G11) y se re-secuenció la mitad 3' terminal de su gRNA (ORFs 2 a 11). A partir de esta secuenciación se detectaron 3 cambios nucleotídicos respecto a la secuencia depositada en la base de datos (GeneBank DQ151548), dos de los cuales conllevaban cambios de aminoácidos en la proteína p27. No se puede descartar que estas mutaciones pudieran afectar la función de dicha CPm y en consecuencia alterar el ensamblaje de los viriones y limitar o impedir su

movimiento célula a célula. Por todo ello, el objetivo de este capítulo fue la obtención de clones infecciosos de cDNA del aislado de origen español T318A restaurado y la incorporación del gen *gfp* en su genoma para facilitar el seguimiento de la acumulación y movimiento del virus dentro de la planta de *N. benthamiana*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Corrección de la secuencia del clon de cDNA del aislado T318A de CTV e inserción del gen *gfp* C3

Para obtener un clon corregido y con el gen *gfp* C3 (Tatineni *et al.*, 2008) insertado entre las ORFs de la CPm y CP, se partió del clon previo pCH20-FLT318A G11 y se sintetizaron 4 fragmentos solapantes mediante PCR (F1, F2, F3 y F4) que cubrían desde la posición 14.7 kb (p61) a la 17.6 kb (p13) del genoma. El fragmento F1 se amplificó a partir de un minireplicón de cDNA basado en el dRNA 2 del aislado T318A, obtenido en la tesis doctoral de la Dra. Susana Ruiz-Ruiz (2009), utilizando la enzima iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (BIO-RAD) y la pareja de cebadores PM147D-PM444R (Tabla 1). El programa térmico consistió en una desnaturalización inicial de 30 s a 98°C, 3 ciclos de 10 s a 98°C, 15 s a 60°C y 1 min a 72°C, 3 ciclos de 10 s a 98°C, 15 s a 65°C y 1 min a 72°C, 30 ciclos de 10 s a 98°C, 15 s a 68°C y 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. El producto F1 se digirió con *DpnI* (New England, BioLabs® inc.) y se purificó con el estuche comercial INVISORB® FRAGMENT CLEANUP. El fragmento F1 cubre desde la posición 14.722 pb hasta las 15.309 pb y contiene 605 nt del extremo 3' terminal de la ORF 5 (p61) además de los 13 nt iniciales de la ORF 6 (p27).

El fragmento F2 se amplificó a partir de un plásmido previo obtenido en el laboratorio, que contiene la secuencia p27 de T318A con las tres mutaciones corregidas utilizando los cebadores PM445D-PM446R (Tabla 1) en condiciones similares a las descritas. En este caso, el cebador PM446R contenía en su extremo 5' una cola de 14 nt solapantes con la secuencia del gen *gfp* C3 y el fragmento F2 obtenido se digirió y purificó como el anterior.

El fragmento F3 se amplificó a partir del plásmido 947R-GFP (amablemente cedido por el Dr. W.O. Dawson) que contiene la versión C3 del gen *gfp* (Gene ID: 7011691). Esta versión posee un sitio de restricción *Bam*HI (GGATCC) en la posición 523 de su secuencia, que se eliminó para no interferir con la estrategia de clonación en la preparación del *cassette* de cDNA de T318A. Para ello, se obtuvieron 2 subproductos de amplificación solapantes entre sí, el producto F3.1 de 317 pb y el F3.2 de 567 pb. El producto resultante F3 de 863pb se generó mediante PCR de extensión entre ambos subproductos. La amplificación de cada uno de los productos se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente utilizando en este caso las parejas de cebadores PM432D-PM433R para F3.1 y PM434D-PM435R para F3.2 (Tabla 1). La reacción de PCR para ambos fragmentos consistió en una desnaturalización inicial de 30 s a 98°C, 3 ciclos de 10 s a 98°C, 15 s a 55°C y 15 s a 72°C, 30 ciclos de 10 s a 98°C, 15 s a 65°C y 15 s a 72°C y una elongación final de 10 min a 72°C. La obtención del producto de fusión F3 mediante PCR de extensión incluyó una desnaturalización inicial de 1 min a 92°C, 6 ciclos de 30 s a 92°C, 1 min a 62°C y 1 min a 72°C y una elongación final de 5 min a 72°C. A continuación, F3 se amplificó por PCR en condiciones similares a F3.1 y F3.2 pero con la pareja de cebadores externos PM432D-PM435R. Todos los productos se trataron con *Dpn*I (New England, BioLabs[®] inc.) y se purificaron del modo descrito anteriormente. Al producto F3 se le añadió una cola poli-A para clonarlo en el vector pGEM[®]-T Easy Vector Systems (PROMEGA).

El fragmento F4 se obtuvo a partir de un clon parcial del aislado T318A obtenido previamente por la Dra. Susana Ruiz-Ruiz, denominado pUC19-3'T318A, que contiene la mitad 3' terminal del genoma de T318A clonado en el plásmido pUC19. El fragmento F4 de 1.655pb se extiende entre las posiciones 16.020 y 17.657 pb del gRNA e incluye las ORFs 7 (p25) y 8 (p18) junto al extremo 5' terminal de la ORF 9 (p13) hasta el sitio de restricción *Bam*HI, que es único en la secuencia de T318A. El producto tiene una cola de 18 nt en su extremo 5' que solapa con la secuencia del gen *gfp* C3 y se amplificó (cebadores PM447D-PM448R, Tabla 1) y purificó de forma similar a los anteriores.

La fusión de los productos F1, F2, F3 y F4 se llevó a cabo en dos fases sucesivas. En la primera se solaparon los fragmentos F1, F2 y F3 para generar el fragmento F1-F3 mediante PCR de extensión utilizando la enzima Taq DNA Polymerase (Roche[®]) y una desnaturalización inicial de 1 min a 92°C, seguida de 6 ciclos de 30 s a 92°C, 1 min a 65°C y 2 min a 72°C con una extensión final de 5 min a 72°C. Se utilizaron

alícuotas de 1 µl del producto de extensión para amplificar el producto F1-F3 fusionado con la enzima iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase y los cebadores externos PM147D-PM435R (Tabla 1). El producto F1-F3 de 2.2 kb se purificó de gel de agarosa al 0.8% con el estuche comercial INVISORB® FRAGMENT CLEANUP. En la segunda fase, se incorporó el fragmento F4, realizando una PCR de extensión entre F4 y F1-F3 en condiciones similares a las descritas anteriormente. El producto final F1-F4 de 3.8 kb se amplificó con los cebadores externos PM147D-PM448R, se purificó, poliadeniló, clonó en el vector pGEM®-T Easy y se transformó mediante electroporación en células de *E.coli* JM109, siguiendo el protocolo habitual (Green y Sambrook, 2012. Capítulo 3) para obtener el clon que denominamos pGEMT-F1-F4 T318A.

CEBADOR	SECUENCIA 5´ - 3´		POSICIÓN/GEN
PM197D	CGCCAATTTGATCTGTGAACG	D	10.690-10.710 ^a
PM198R	GCGAAaGCAAACATCTCGACTC	R	10.854-10.876 ^a
PM445D	CCTTTCATCATGGCGGGTTACACGATGCTTCC	D	15.318-15350 ^b
PM446R	GACGAAGAGACTGC CTACAAAATACTTTCCCAAATCGCGTAAG	R	15.985-16.015 ^b -GFP
PM432D	TTGTAGGCAGTCTCTTCGTCGGTC	D	GFP C3
PM433R	TTGGCCAGGGAACAGGTAGTTTTTC	R	GFP C3
PM434D	AACTACCTGTTCCCTGGCCAACACTTGTCACTAC	D	GFP C3
PM435R	GGTTCTATTTGTAGAGCTCATCCATGC	R	GFP C3
PM147D	ATCCCGATCTACGTGTTGATTGCGTTGGGCAGG	D	14.723-14.757 ^b
PM444R	TGTAACCCGCCATGATGAAAGGGTAAATTAACCGGATGTTGCC	R	15.263-15.308 ^b
PM447D	TGAGCTCTACAAATAGA ACCGAGCTTCTTAACTTACGCGATTTGG	D	GFP C3-16.020- 16.047 ^b
PM448R	CTACTGAGTAGACTCTAGTTATCGCAAGGTAAGAGCGAAGG	R	17.616-17.657 ^b

Tabla 1. Secuencia y posiciones nucleotídicas de los cebadores en el gRNA de T318A. Caracteres en negrita indican las secuencias homólogas con el gen *gfp* C3 (GenBank nº 7011691). D y R, indican el sentido directo y reverso de cada cebador, respectivamente.

^a. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica del aislado T385 depositada en la base de datos (GenBank Y18420). En minúscula se marca el desapareamiento (A por C) que presenta el cebador PM198R respecto al aislado T318A.

^b. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T318A depositada en la base de datos (GenBank DQ151548).

2.2. Reconstrucción de un clon de cDNA con el genoma completo de T318A

2.2.1. Construcción del clon 3' T318A-GFP

Se generó un clon parcial de T318A que comprendía desde la posición 8.082 de la ORF 1a hasta el extremo 3'UTR, seguido de la secuencia antígenómica de la Rbz del virus delta de la hepatitis y de la secuencia terminadora NOS-T del fago T7 (Pattnaik *et al.*, 1992). Para ello, se sustituyó en el plásmido pUC19-T318A, obtenido previamente en nuestro laboratorio por la Dra Silvia Ambrós (pMINI 57.6), la región entre los puntos de corte *AgeI* y *BamHI* por el fragmento homólogo del plásmido pGEMT-F1-F4T318A (con las mutaciones de la Cpm corregidas y el gen *gfp* C3 insertado previamente). Los plásmidos se digirieron con *AgeI* y *BamHI* (Fermentas Life Sciences), se ligaron con el estuche comercial TaKaRa® DNA Ligation y transformaron células electrocompetentes de *E. coli* JM109. Tras evaluar 36 colonias mediante restricción con las enzimas *AgeI/BamHI*, se obtuvo el clon parcial pMINI-3'T318A-GFP

2.2.2. Obtención de un clon de longitud completa restaurado del genoma de T318A

Para la reconstrucción del genoma completo de T318A se utilizó un clon previo obtenido en el laboratorio (pUC19-DEF1-24), basado en el dRNA 1 de T318A (12.535 nt) que carece de la región central del genoma y que contiene la 5'UTR, la ORF 1 (excepto los 12 últimos nt de la ORF 1b) y los 1.735 nt 3' terminales que incluyen parte de la ORF9, las ORFS 10 y 11 y el extremo 3'UTR (Ruiz-Ruiz, 2009). La región central ausente en el dRNA 1 se obtuvo mediante digestión del clon pMINI-3'T318A-GFP con *Apal/SwaI* (Fermentas Life Sciences) y se incorporó al clon dRNA 1 previamente digerido con las mismas enzimas. Los productos se ligaron y transformaron de forma similar a los anteriores. Los 3 clones de longitud completa seleccionados, denominados pUC19-FL-T318AGFP, poseen un *cassette* de expresión bajo el control del promotor 35S que termina con la secuencia de

una Rbz y el terminador NOS-T. Dicho *cassette* está flanqueado por la secuencia de restricción *NotI* (Figura 3).

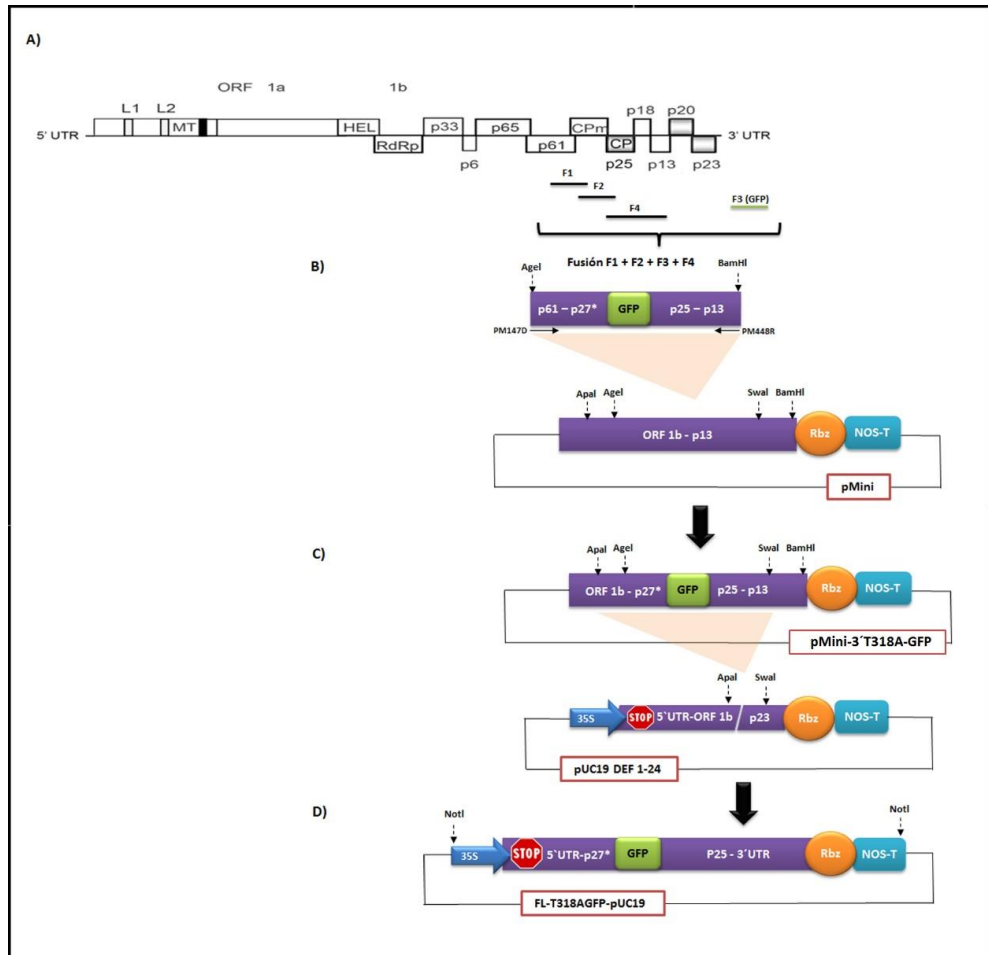


Figura 3: Construcción del clon de cDNA de longitud completa del aislado T318A de CTV portador del gen *gfp*. **A)** Representación del genoma de T318A CTV. Incluye un esquema de la localización de F1, F2, y F4 en el genoma de T318A. El fragmento F3 correspondiente a la GFP se sitúa aparte. **B)** Fusión de los 4 productos (F1, F2, F3 y F4) y obtención del fragmento de 3,8 Kb con la corrección de la CPM (p27*) e incorporación del gen *gfp* C3 (fragmento F3, representado en verde). Mediante la ligación del fragmento de fusión en el vector pMINI vía *Agel/BamHI* se obtuvo el clon parcial pMINI-3'T318A-GFP. **C)** Subclonación vía *Apal-SwaI* de las 10 Kb centrales + GFP en el vector pUC19 DEF 1-24 que incorpora el promotor 35S, el extremo 5' de T318A y un intrón (símbolo de STOP) que reduce la toxicidad en células bacterianas. **D)** Clon de longitud completa FL-T318AGFP-pUC19 resultante. A partir de este clon y mediante escisión vía *NotI* se prepararon los

diversos vectores binarios (pCH20, pCLEAN y pCLEAN-p22) para estudiar la agroinfectividad de dicho aislado en hojas de *N. benthamiana*.

2.2.3. Obtención de clones T318A-GFP en vectores de expresión *in planta* pCH20

Una mezcla de los 3 clones pUC19-T318A-GFP se digirió con la enzima *NotI* y los *cassettes* de expresión tras su purificación se subclonaron en el vector binario BAC pCH20 (Hamilton *et al.*, 1997) previamente digerido con *NotI* y defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (New England Biolabs). El vector pCH20 (amablemente cedido por la Dra. Hamilton de la Cornell Research Foundation) de 23kb es un híbrido entre un plásmido binario y un cromosoma bacteriano artificial (*bacterial artificial chromosome*, BAC), y sólo tiene una (o pocas) copias por célula. La ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH10B™ (TaKaRa®) mediante electroporación (Green y Sambrook, 2012. Capítulo 3). Se seleccionaron los clones pCH20-FLT318A-GFP en placas de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) suplementado con 50mg/l de Kanamicina y sacarosa al 5%. Para determinar el tamaño de los insertos y excluir aquellos clones que hubieran sufrido recombinación, se evaluaron 161 colonias mediante restricción con *EcoRI*. Los clones pCH20-FLT318A-GFP seleccionados se electroporaron en células competentes de *A. tumefaciens* cepa C58C1 para los ensayos de agroinfección en el huésped experimental *N. benthamiana*.

2.2.4. Obtención de clones de T318A-GFP en vectores de expresión *in planta* pCLEAN-G181

Como alternativa al uso de vectores de tipo BAC se utilizó también el sistema pGreen/pSoup para la expresión *in planta*, en el que el primer vector presenta un T-DNA sustituible por el *cassette* de T318A y el segundo contiene genes de virulencia. La clonación del *cassette* de expresión FLT318A-GFP en el vector binario pCLEAN-G181 (vector pGreen de 2,7 kb, amablemente cedido por el Dr. J.A. Darós del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IMBCP), C.S.I.C., de Valencia) se realizó mediante la escisión con *NotI* y su ligación en pCLEAN-G181 previamente digerido con la misma enzima y defosforilado con fosfatasa alcalina. La ligación y transformación en *E. coli* DH10B™ se realizó del

mismo modo descrito anteriormente. Se seleccionaron 41 colonias, se analizaron mediante restricción con *SacI* y los clones pCLEAN-G181-FLT318A-GFP seleccionados se transfectaron en células competentes de *A. tumefaciens* C58C1, portadoras del vector pCLEAN-S48 (vector tipo pSoup).

2.2.5. Incorporación de un supresor de silenciamiento (p22) en el vector de expresión *in vivo* pCLEAN-G181

La ORF del supresor de silenciamiento p22 del virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV), se obtuvo por PCR a partir de un vector pBIN (cedido amablemente por el Dr. Jesús Navas Castillo, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-C.S.I.C.), Algarrobo-Costa, Málaga), que contiene el gen *p22* flanqueado por un promotor 35S duplicado y el terminador del inhibidor de proteasa de la patata (PoPit) utilizando los cebadores PM566D-PM572R (Tabla1). Las condiciones de amplificación y purificación del producto fueron similares a las descritas, se digirió con el enzima *XhoI* y se clonó en el vector pCLEAN-G181 previamente digerido con la misma enzima y defosforilado con fosfatasa alcalina. Con el producto de ligación se electroporaron células de *E. coli* DH10B™. Las células se sembraron en placas de LB + 50mg/ml Kanamicina, se analizaron 34 colonias mediante restricción con la enzima *PacI* para comprobar la orientación del *cassette* de *p22*. Posteriormente, se digirió un clon pCLEAN-G181-p22 de cada orientación con la enzima *NotI* y se subclonó en ellos el *cassette* de expresión T318A-GFP, previamente escindido del vector pCLEAN-G181-FLT318-GFP con la misma enzima. Con el producto de ligación se transfectaron células de *E. coli* JM109 (Promega®). Se seleccionaron 48 colonias de 2 días para analizar su patrón de restricción con la enzima *PmeI*. En la Figura 4 se muestran las cuatro orientaciones resultantes que podemos encontrar. Se electroporaron células competentes de *A. tumefaciens* portadoras del vector pCLEAN-S48 con los clones pCLEAN-G181-p22-FLT318A-GFP que presentaron una orientación divergente (Figura 4A) para estudiar su capacidad infectiva en el huésped experimental *N. benthamiana*.

2.3. Ensayos de infectividad de clones de cDNA de longitud completa del genoma de T318A

2.3.1. Transformación de los clones de longitud completa de T318A en *A. tumefaciens* y agroinoculación en hojas de *N. benthamiana*

Células competentes de *A. tumefaciens* cepa C58C1 se transfectaron con los 47 clones pCH20-FLT318A-GFP, los 21 clones pCLEAN-G181-FLT318A-GFP o los 11 clones pCLEAN-G181-p22-FLT318A-GFP mediante electroporación. A continuación, se añadieron 500 µl de LB y se incubó durante 1h a 28°C. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB + 50 mg/l de kanamicina + 25 mg/l rifampicina y se incubaron durante 48-72 h a 28°C.

Colonias individuales de *A. tumefaciens* portadoras de los diferentes clones de longitud completa se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (25 mg/l) a 28°C en agitación toda la noche. Diferentes volúmenes de estos cultivos en fase exponencial se re-suspendieron en 25 ml de medio de inducción (LB suplementado con MES 10 mM, acetosiringona 20 mM y 5 mg/l de rifampicina) y se incubaron a 28°C toda la noche. Cuando alcanzaron densidades ópticas (DO_{600nm}) en torno a 0.8-1 se centrifugaron y re-suspendieron en medio de infiltración ($MgCl_2$ 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 150 mM), ajustando la concentración a una DO_{600nm} de 1 e induciéndolos 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, los clones pCLEAN-G181-p22-FLT318A-GFP se agroinfiltraron directamente, mientras que, los clones pCH20-FLT318A-GFP y pCLEAN-G181-FLT318A-GFP se co-infiltraron con cultivos similares portadores del supresor del silenciamiento *p19* utilizando una relación de 2:1 volúmenes (FLT318A-GFP: *p19*). Todos los clones o mezclas fueron agroinfiltrados en hojas jóvenes completamente expandidas de *N. benthamiana wt* o *RdRp6i* (*N. benthamiana* que presenta el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 silenciado) en tres ensayos independientes usando 5 plantas por clon y ensayo. Como controles se incluyeron el clon de cDNA de longitud completa pCH20-FLT318A G11 (de la Dra. Susana Ruiz-Ruiz) y el clon de cDNA de longitud completa T36-GFP [una versión del aislado T36 de Florida (GenBank AY170468) cedido amablemente por el Dr. Dawson que contiene el gen *gfp* C3 codificante para la proteína fluorescente verde

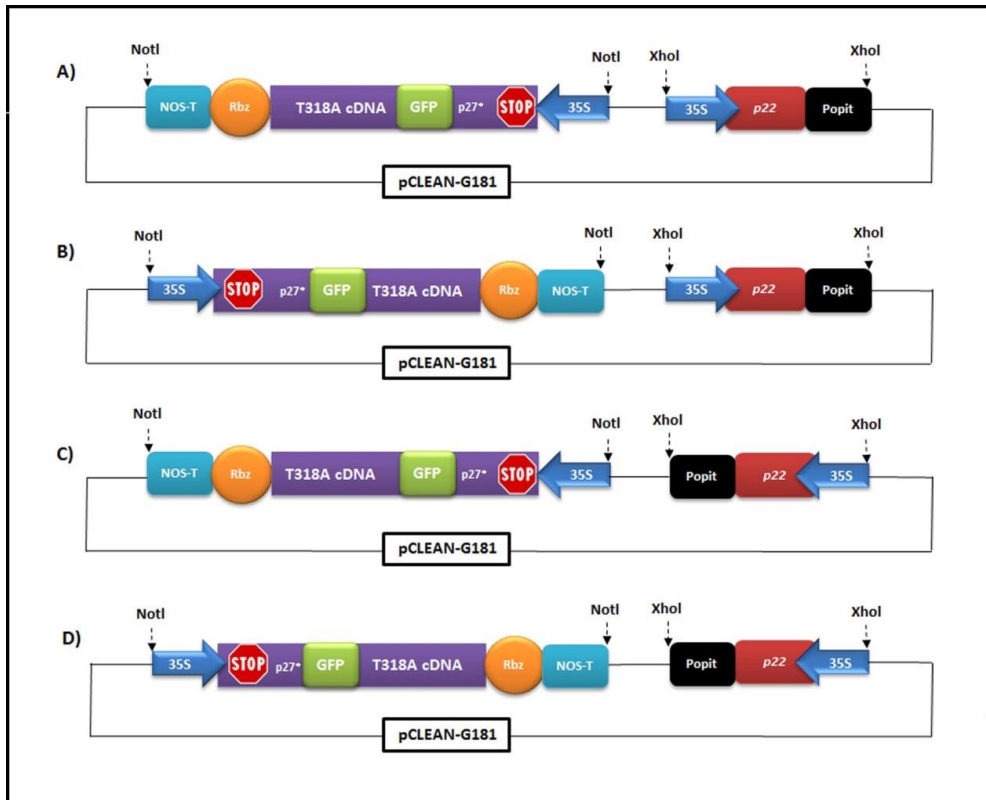


Figura 4: Representación esquemática del vector plasmídico pCLEAN-G181 modificado que contiene el *cassette* de expresión de *p22* de ToCV en ambas orientaciones, flanqueado por sitios de restricción *XhoI*, y el *cassette* de expresión de CTV en las dos orientaciones posibles, a su vez flanqueado por sitios *NotI*. **A)** Construcción en orientación divergente de los *cassettes* de expresión de CTV y del supresor de silenciamiento *p22*. **B)** y **C)** Construcciones con dichos *cassettes* de expresión en la misma orientación. **D)** Construcción con orientación convergente de ambos *cassettes*.

En algunas ocasiones, cultivos inducidos de los clones pCLEAN-FLT318A-GFP con los que se observó fluorescencia en las hojas infiltradas, fueron agroinfiltrados directamente en el tallo de plantas de *N. benthamiana* mediante el empleo de aguja y jeringa, con el fin de facilitar el acceso del virus al floema.

Las plantas de *N. benthamiana* se mantuvieron en una cámara de cultivo con un ciclo de 16/8 h de luz/oscuridad, a una temperatura constante de 23-24°C y una humedad relativa del 50-60%.

2.3.2. Visualización y seguimiento de la infección en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones T318A-GFP

Las plantas inoculadas con construcciones portadoras del gen *gfp* se examinaron diariamente a partir de 4 dpi, observando el envés de cada una de las hojas agroinfiltradas con un estereomicroscopio Leica MZ16 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) con una fuente de luz de alta energía y un filtro de GFP. Las imágenes se tomaron usando la cámara digital Leica DFC490 y el software IM50 (Leica Microsystems). Las áreas con señal GFP se marcaron y siguieron con el paso de los días. La expresión de GFP de los clones pCLEAN-FLT318A-GFP y pCLEAN-p22-FLT318A-GFP que mostraron mejor señal se examinó además mediante microscopía confocal (LEICA TCS SL). Para ello, secciones pequeñas de hoja infiltrada se montaron en fresco sobre un portaobjetos, se añadieron 2 μ l de agua, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron con el objetivo 100x. Las imágenes se tomaron con el software LCS Lite.

La extracción de viriones de CTV se realizó a partir de secciones de hojas que mostraron señal GFP, fragmentos de 1 cm² se trituraron en N₂ líquido y se mezclaron con 2 ml de tampón fosfato 40 mM, se mantuvieron 30 min en hielo con agitación suave y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 12min. El sobrenadante se depositó sobre un colchón de sacarosa al 70 % preparado en tampón de extracción y se ultracentrifugó a 38.000 rpm durante 1h 15min utilizando un rotor basculante (Beckmann SW41). Al finalizar se realizó una pequeña incisión en la parte inferior del tubo, se eliminaron por decantación los primeros 350 μ l y se recolectaron los 200 μ l siguientes que contienen la mayor concentración de viriones de CTV. Este extracto semi-purificado se inoculó mecánicamente en hojas de *N. benthamiana* espolvoreadas con carborundo.

2.3.3. Cuantificación del gRNA expresado por los clones de cDNA de longitud completa de T318A-GFP y detección serológica de la proteína p25

Para cada uno de los ensayos en plantas de *N. benthamiana* genotipo *wt* o *RdRp6i* se recolectaron porciones de hoja infiltrada a los 6, 14 y 21 dpi y se extrajo el RNA total (RNAt) a partir de 0.3 g de tejido fresco de hoja. El protocolo de extracción estándar consistió en dos extracciones con fenol en tampón TCES (0,2 M Tris-Cl

pH 8, 50 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 2% SDS y H₂O tratada con dietilpírocarbano), seguidas de una precipitación con acetato sódico 3 M, pH 5,2, y etanol absoluto. Los extractos de RNAt se re-suspendieron en 100 µl con agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las concentraciones de estas alícuotas se ajustaron aproximadamente a 10 ng/µl, se cuantificaron por duplicado en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Con objeto de cuantificar el RNA viral a partir de tejido agroinfiltrado, las alícuotas de RNAt a 6, 14 y 21 dpi tratadas con DNasa se analizaron mediante RT-qPCR. Dicha reacción se desarrolló en la plataforma LightCycler® de Roche utilizando capilares de vidrio de 20 µl, cargados con 10 µl de una mezcla de reacción que contenía: 2 µl de LightCycler® FastStart DNA MASTERPLUS SYBR Green I (Roche), 4.7 µl de agua libre de RNasas, 0,05 µl de retrotranscriptasa RT MultiScribe (Applied Biosystems), 0,05 µl de Inhibidor de RNasas (Applied Biosystems), 0,3 µM de la pareja de cebadores PM197D-PM198R (Tabla1) y 2 µl del extracto de RNAt (~10 ng RNA/µl). Cada muestra problema se analizó por duplicado en tres ensayos independientes de RT-qPCR, en los que se incluyeron controles de RNAt de *N. benthamiana* sana o agua en lugar de RNAt. El programa térmico incluyó una etapa de retro-transcripción de 30 min a 48°C, una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C y 45 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 60°C y 15 s a 72°C. Se añadió un cuarto segmento de 2 s a 82°C después de la etapa de extensión para obtener medidas de fluorescencia que minimizasen la interferencia de dímeros de cebadores u otros productos de amplificación inespecíficos. La síntesis de un único producto de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler. El cálculo para determinar el nº de moléculas de gRNA de CTV transcritas por ng de RNAt presente en la muestra se llevó a cabo utilizando la curva patrón desarrollada por la Dra Susana Ruiz-Ruiz (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007 y Ruiz-Ruiz, 2009).

La presencia de la proteína p25 de CTV en hojas agroinfiltradas se analizó mediante ELISA-DASI utilizando extractos brutos y anticuerpos monoclonales específicos (3DF1+3CA5) (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 una mezcla de hojas de cada planta, infiltrada con los clones T318A, en 20 volúmenes de tampón de extracción (AFT 1X y 1% polivinilpirrolidona), se añadieron 190 µl de extracto por pocillo 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. Así mismo, extractos de RNAt se separaron mediante electroforesis en agarosa-formaldehído al 0.9%, siguiendo el protocolo previamente establecido (Lewandowski y Dawson, 1998), se transfirieron a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche), utilizando 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 y se analizaron mediante hibridación molecular en formato *Northern-blot* siguiendo el protocolo habitual (Green y Sambrook, 2012. Capítulo 6) con una sonda específica de RNA-DIG de polaridad negativa complementaria del extremo 3' del aislado T318A de CTV (Ruiz-Ruiz et al., 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Obtención de clones de cDNA de longitud completa del genoma del aislado T318A de CTV en vectores de expresión *in planta*

Al inicio de esta Tesis doctoral se disponía de un clon de cDNA de longitud completa de T318A capaz de replicarse en protoplastos y en células de *N. benthamiana*, pero incapaz de producir infección sistémica en dicho huésped experimental. Trabajos anteriores realizados en la tesis doctoral de la Dra. Susana Ruiz Ruiz confirmaron que el extremo 5' de CTV, que codifica la replicasa del virus, resulta tóxico para su mantenimiento en *E. coli*. Con el fin de reducir esta toxicidad y poder obtener clones de cDNA del genoma completo de CTV, la

secuencia genómica de T318A se clonó en vectores de gran tamaño que presentan bajo número de copias, como el vector pCH20 de tipo BAC, obteniendo un primer conjunto de clones de cDNA de longitud completa pCH20-FLT318A (Figura 5). Entre éstos, el clon G11 presentó una replicación más eficiente en hojas de *N. benthamiana*. Este clon contiene el promotor 35S seguido de la secuencia genómica completa del aislado T318A, una Rbz en sentido antígenómico y un terminador (NOS-T), flanqueados por los sitios de restricción *NotI*. Sin embargo, se comprobó que presentaba varias mutaciones que inducían cambios aminoacídicos en la secuencia codificante de la CPM, que podían causar su incapacidad para infectar sistémicamente *N. benthamiana*.

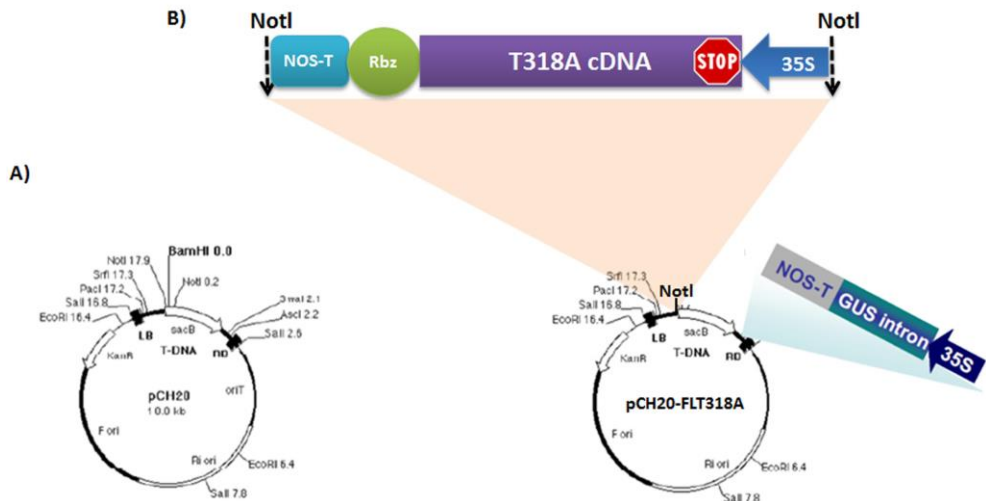


Figura 5. Representación gráfica del vector binario tipo BAC y de los clones pCH20-FLT318A llevados a cabo por la Dra. Susana Ruiz Ruiz. **A)** Mapa del vector pCH20 utilizado para la clonación del cDNA de T318A (tomado de Hamilton CM, 1997). **B)** Esquema de la clonación de los *cassettes* de expresión completos de los cDNA de T318A en el vector modificado pCH20-(3)-GUS, que presenta un *cassette* de expresión del gen marcador GUS-intrón presente en vectores pCAMBIA.

Para resolver este problema y poder seguir el avance de la infección visualmente, en el desarrollo de la presente tesis se planteó la reconstrucción del clon G11, generando un nuevo cDNA de longitud completa de T318A que mantuviera el extremo 5' del clon inicial, pero que integrara una nueva secuencia 3' terminal sin

las mutaciones detectadas en *p27* y con la incorporación del gen de la GFP entre las secuencias de las dos proteínas de la cápsida.

La reconstrucción del clon de T318A se llevó a cabo generando un fragmento comprendido entre la posición 8.082 nt y el extremo 3'UTR de CTV, mediante sucesivas PCRs de fusión, como se ha descrito en material y métodos. El nuevo fragmento incorporaba el gen *gfp* C3 y corregía la secuencia de *p27*. Dicho fragmento se clonó en el vector pMINI 57.6 y se obtuvo el clon parcial pMINI-3'T318A-GFP.

Por otra parte, se disponía de un clon parcial del aislado T318A en vectores pUC19, con una longitud de 12.535 nt que carecía de la región central del genoma. Mediante digestión *SmaI-SwaI* se intercambió la región central del genoma de CTV comprendida entre la posición 8.082 y 18.682 nt por la nueva secuencia clonada en pMINI-3'T318A-GFP. De este modo se obtuvo el primer clon pUC19-FLT318A-GFP que contiene el genoma completo de T318A corregido y que expresa el gen *gfp*.

Con el objetivo de estudiar la infectividad en el huésped experimental *N. benthamiana* y seguir ésta mediante observación de la fluorescencia, el *cassette* de expresión T318A-GFP se escindió del vector pUC19-FLT318A-GFP mediante digestión con *NotI* y se subclonó en los vectores binarios: pCH20, pCLEAN-G181 y derivados (ver material y métodos). Los clones resultantes se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* y su infectividad se analizó por microscopía de fluorescencia y confocal, mediante ensayos ELISA, hibridación tipo *Norther-blot* y RT-qPCR.

3.2. Análisis de la infectividad de los clones de longitud completa de T318A-GFP

Se obtuvieron un total de 161 clones en el vector binario pCH20, de los cuales 47 presentaban un patrón de restricción *EcoRI* correcto. Estos clones se utilizaron para transfectar la cepa *C58C1* de *A. tumefaciens* que contiene copias extra de genes de virulencia. Los cultivos bacterianos inducidos se co-infiltraron con otros que contenían el supresor de silenciamiento *p19* de TBSV en la cara abaxial de todas las hojas expandidas de plantas de *N. benthamiana* de 2-3 semanas de edad siguiendo el protocolo previamente descrito (Ambrós *et al.*, 2013). En todos los ensayos se observaron las hojas agroinfiltradas durante 21 dpi utilizando un

microscopio estereoscópico de fluorescencia. No se detectó en ningún caso focos fluorescentes ni infección sistémica.

Para trabajar con un sistema de expresión más eficaz y de menor complejidad en su manipulación, las mismas construcciones de cDNA de T318A se subclonaron en el vector pCLEAN-G181 (Thole V *et al.*, 2007). Este sistema se basa en el vector pGreen-like, que para transfectar el T-DNA a la célula hospedadora necesita de la ayuda de otro vector tipo pSoup-like como es el pCLEAN-S48 (Figura 6), que expresa los genes de virulencia VirG wt (Vain *et al.*, 2004). Para ello, se escindió de nuevo el *cassette* de expresión T318A-GFP mediante digestión del vector pUC19-FLT318A-GFP con *NotI* y se clonó en el vector binario pCLEAN-G181. De los 41 clones con buen crecimiento de las bacterias *E. coli* transfectadas, 24 presentaban un patrón de restricción *SacI* correcto.

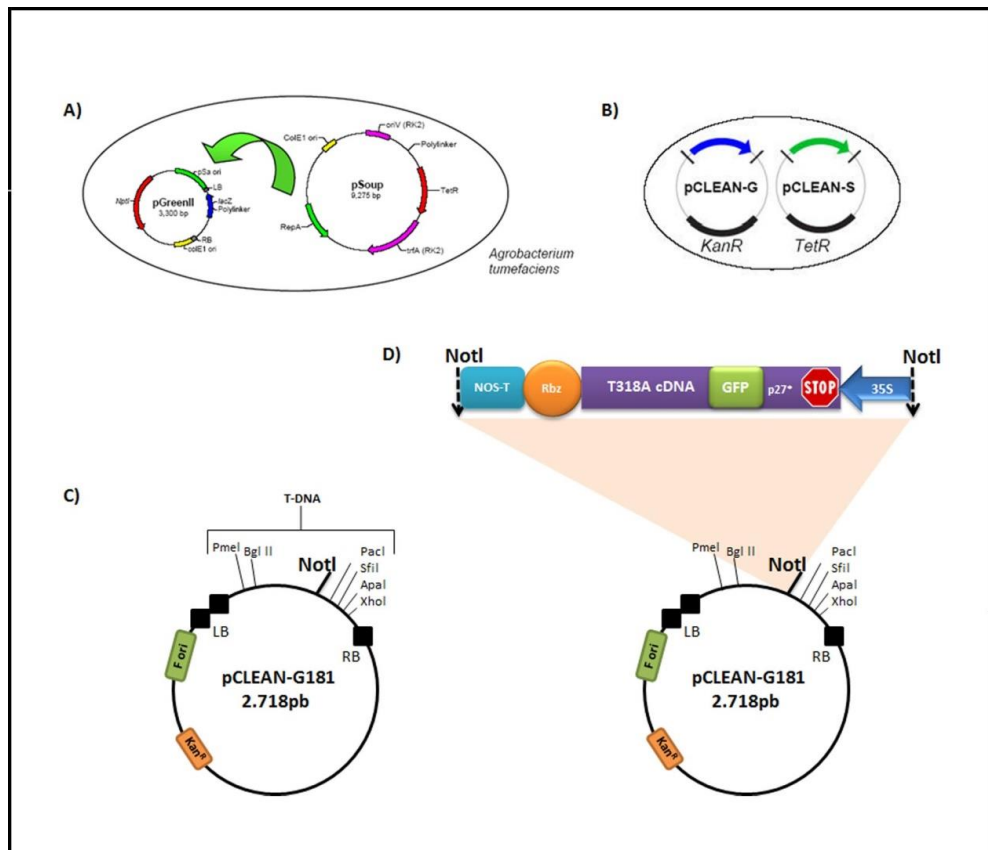


Figura 6: Esquema gráfico de los vectores binarios tipo pCLEAN utilizados para la clonación de los cDNA de T318A. **A)** Esquema pGreenII-pSoup en *A. tumefaciens*, en el cual

están basados los vectores pCLEAN. En este sistema el vector de expresión *in planta* pGreenII requiere del vector pSoup para transferir el T-DNA al núcleo de la célula vegetal. **B)** Representación del sistema pCLEAN-G con resistencia a kanamicina (KanR) y pCLEAN-S con resistencia a tetraciclina (TetR) y que posee genes de virulencia VirG wt. **C)** Mapa del vector pCLEAN-G181 (Thole V *et al.*, 2007) **D)** Esquema de clonación de los *cassettes* de expresión de los dRNAs de T318A-GFP en el vector pCLEAN-G181.

Para comprobar la infectividad de los 24 clones seleccionados en *N. benthamiana*, se transfectaron éstos en la cepa *C58C1* de *A. tumefaciens* previamente transformada con el vector pCLEAN-S48. Los cultivos bacterianos inducidos se co-infiltraron junto con otros cultivos portadores del supresor de silenciamiento *p19* de TBSV. Se examinó la fluorescencia en las hojas agroinfiltradas durante 21 dpi con un microscopio estereoscópico de fluorescencia, donde únicamente en dos casos (pCLEAN-FL10-T318A-GFP y pCLEAN-FL15-T318A-GFP) se observó fluorescencia de GFP. Esta señal se limitaba a un número reducido de células que perdió intensidad con el paso del tiempo, adquiriendo una tonalidad amarillenta también asociada al daño celular (Figura 7). Se confirmó la expresión de GFP de los clones pCLEAN-FL10-T318A-GFP y pCLEAN-FL15-T318A-GFP al examinar muestras frescas de hojas agroinfiltradas mediante microscopía confocal (Figura 8). Los análisis ELISA tanto de hojas agroinfiltradas como de hojas superiores a los 6, 14 y 21 dpi no permitieron detectar la proteína p25 de la cápsida (datos no mostrados).

Estos resultados confirman la replicación de los clones T318A-GFP en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* pero al mismo tiempo indican una clara incapacidad para el movimiento viral y el avance de la infección, quedando la señal de GFP restringida a un pequeño número de células. Este hecho sugiere algún problema en el ensamblaje de los viriones que impediría el movimiento de éstos célula a célula y en consecuencia, la invasión sistémica.

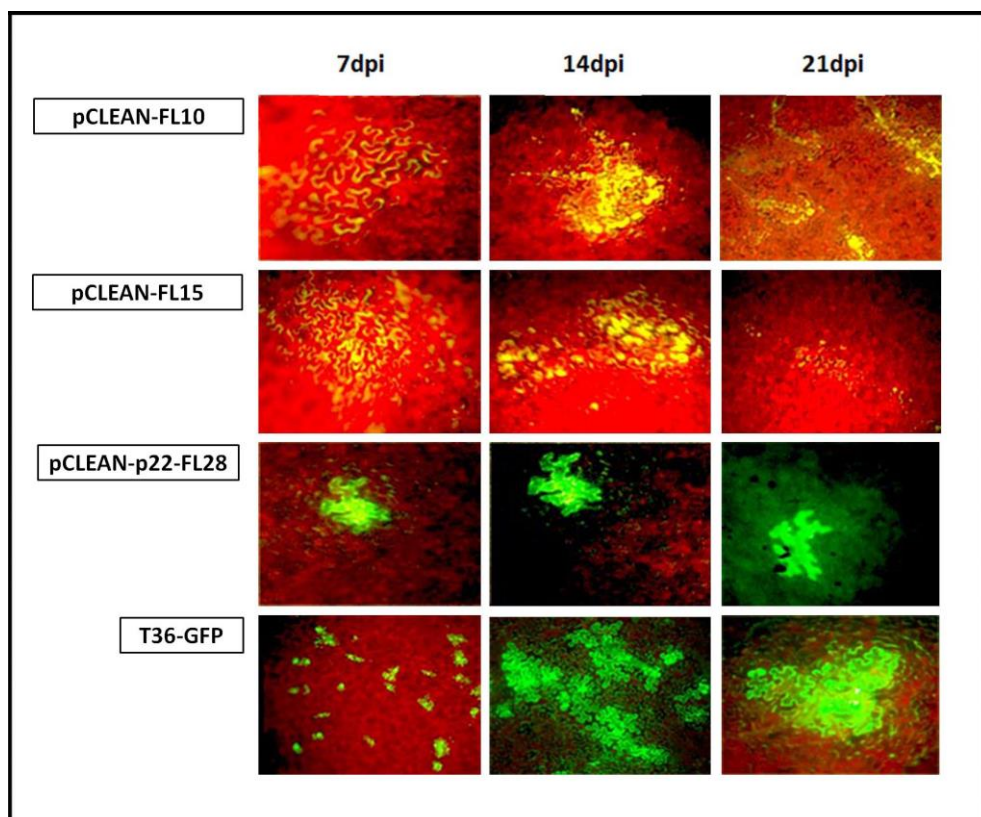


Figura 7: Observación en el microscopio estereoscópico de fluorescencia de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con T36-GFP o con diferentes clones pCLEAN-FLT318A-GFP. Se aprecia en detalle la distribución localizada de T318A y la tonalidad amarillenta de los focos de infección más comúnmente asociados a daño celular que a la señal GFP, en comparación con los números e intensos focos observados para T36-GFP.

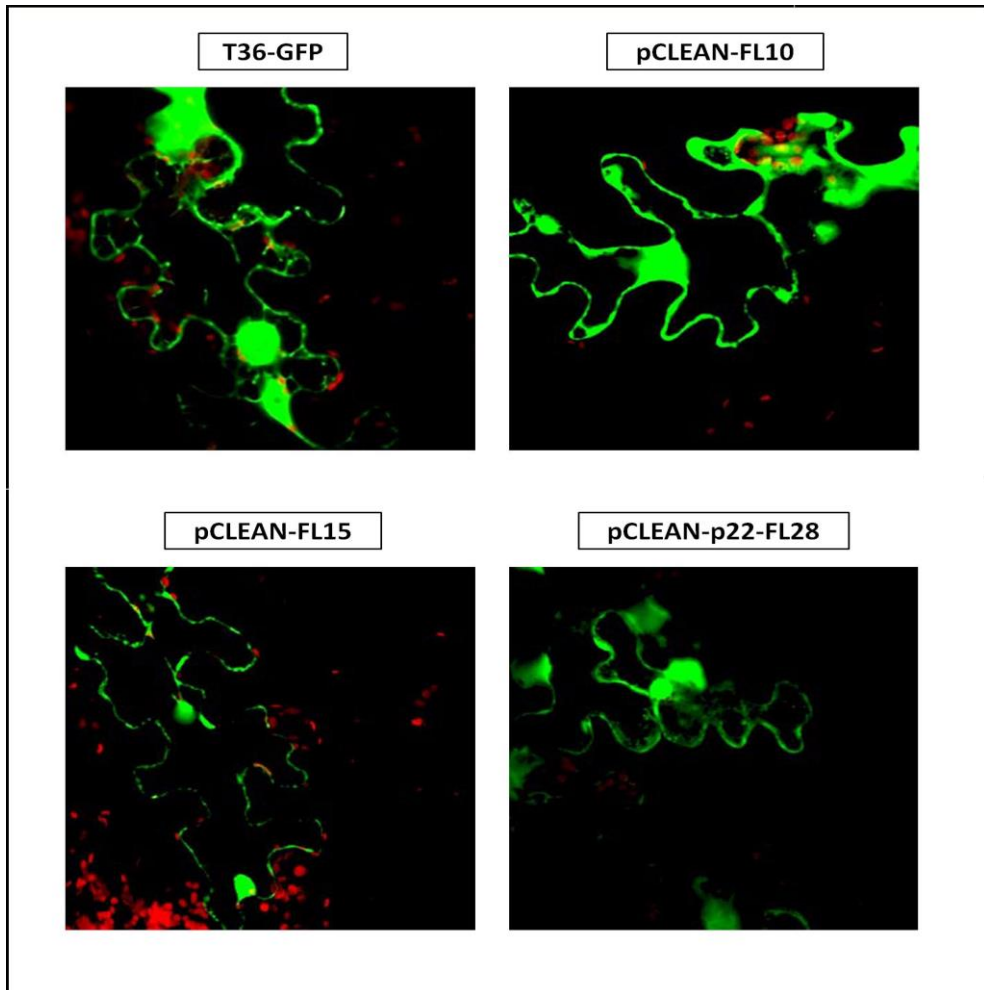


Figura 8: Observación mediante microscopía confocal de secciones frescas de hoja de *N. benthamiana* agroinfiltradas con T36-GFP o con los diferentes clones pCLEAN-FLT318A-GFP portadores del gen *gfp*. En rojo se aprecia la auto-florescencia de los cloroplastos. Las imágenes corresponden a muestras tomadas a 12 dpi.

Con el fin de facilitar el proceso de infección, y una vez confirmada la capacidad replicativa de los clones pCLEAN-FL10-T318A-GFP y pCLEAN-FL15-T318A-GFP, cultivos de *A. tumefaciens* portadores de estas construcciones se agroinfiltraron en las mismas condiciones de inducción y co-infiltración con *p19* en hojas de *N. benthamiana* *RdRp6i*. Esta planta presenta el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 silenciado y en consecuencia tiene un menor PTGS, por lo

que la infección de T318A podría verse favorecida. A pesar de ello, no se observó una mejoría significativa en la expresión de fluorescencia analizada mediante microscopía de fluorescencia o confocal. Así mismo, para facilitar una posible infección sistémica minimizando el movimiento célula a célula, dichos clones se agroinfiltraron directamente en tallos de *N. benthamiana* *RdRp6i* y éstos se examinaron a 7, 14 y 21 dpi para detectar fluorescencia. Aunque ocasionalmente se observaron señales de GFP localizadas, éstas no progresaron con el tiempo (datos no mostrados).

Para el análisis de la infectividad de los clones T318A se agroinfiltraron nuevamente las distintas construcciones tanto en hojas de *N. benthamiana* wt como en *RdRp6i*, usando como controles plantas agroinfiltradas con el clon G11 (pCH20-FLT318A) y con el clon T36-GFP. En cada ensayo se recolectaron porciones de hojas infiltradas a los 6, 14 y 21 dpi. La replicación viral se analizó mediante ELISA utilizando extractos brutos y anticuerpos monoclonales específicos para CTV (datos no mostrados), mediante RT-qPCR (Figura 9) e hibridación molecular tipo *Northern-blot* (Figuras 10a y b).

Alternativamente, para facilitar que el clon T318A-GFP pudiera vencer las defensas de la planta más eficientemente, se incorporó al vector pCLEAN-G181 un *cassette* de expresión en *cis* del supresor del silenciamiento *p22* de ToCV. De las 34 colonias obtenidas, 7 presentaron un patrón de restricción *PacI* correcto, en 4 de las cuales el *cassette* estaba orientado en dirección 5'→3' y en las otras 3 en dirección 3'→5'. A continuación, se escindió el *cassette* de expresión de CTV del clon pCLEAN-FL10-T318A-GFP y se subclonó en los vectores pCLEAN-G181-p22 (en ambas direcciones). En la Figura 4 se han mostrado las diferentes combinaciones T318A-GFP/*cassette p22* convergentes o divergentes de los clones analizados mediante restricción con el enzima *PmeI*. Se analizaron 49 clones pCLEAN-p22-FLT318A-GFP, de los que 18 presentaron un patrón de restricción correcto, 11 de los cuales presentaban los *cassettes* de expresión de CTV y *p22* en orientación divergente (Figura 4A) y 7 convergente (Figura 4D). Para comprobar su infectividad, los 11 clones pCLEAN-p22-FLT318A-GFP divergentes se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana* wt y *RdRp6i* tras ser transfectados en la cepa *C58C1* de *A. tumefaciens*, que a su vez contenía el vector pCLEAN-S48. La infección se analizó mediante seguimiento visual de las plantas con microscopio de fluorescencia durante 30 dpi. De los 11 clones analizados únicamente el clon pCLEAN-p22-FL28-T318A-GFP mostró señal GFP localizada en pequeños grupos

celulares (Figuras 7 y 8). Extractos de RNAt de hojas infiltradas de *N. benthamiana* a los 6, 14 y 21 dpi se analizaron mediante RT-qPCR o hibridación *Northern-blot* (Figuras 9 y 10a y b, respectivamente).

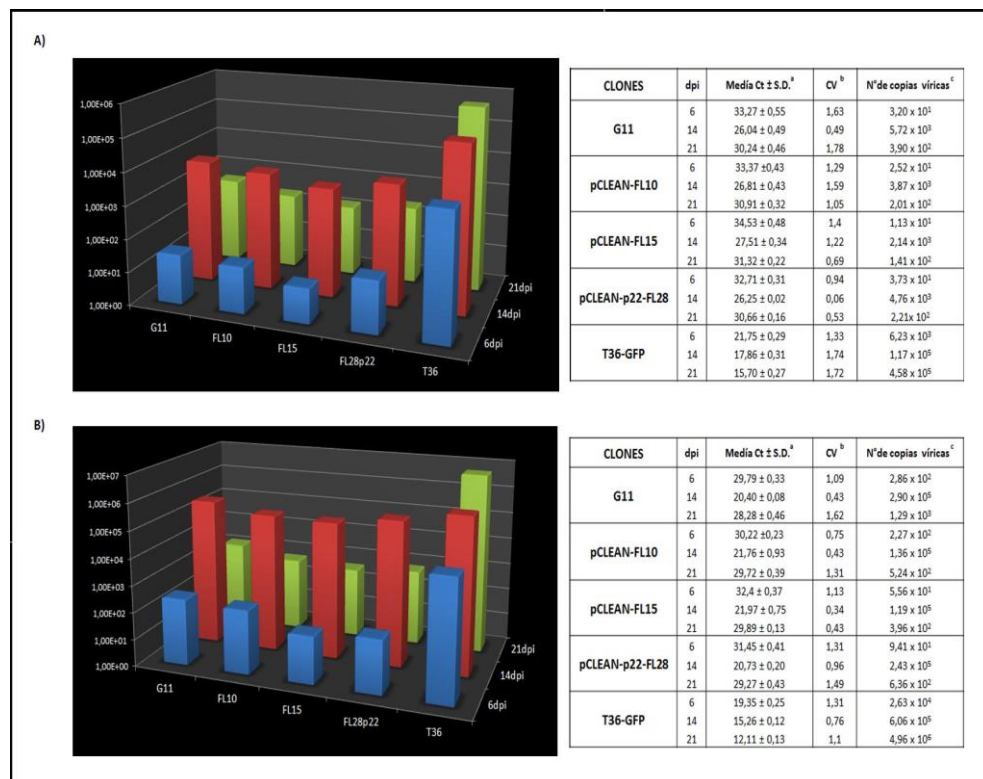


Figura 9: Detección y cuantificación absoluta mediante RT-qPCR del número de copias de gRNA por nanogramos de RNAt en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones pCLEAN-FLT318A-GFP, pCH20-FLT318A (G11) y T36-GFP a los 6, 14 y 21 dpi. **A)** Agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* wt. **B)** Agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* RdRp6i. ^a Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenidas en tres ensayos independientes con cinco réplicas biológicas por ensayo. ^b Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos. ^c Número de copias de gRNA calculadas a partir de la curva patrón de T318A (Ruiz-Ruiz, *et al.*, 2007).

Los bioensayos del conjunto de clones FL-T318A permitieron confirmar que: a) todos mostraron una replicación detectable mediante RT-qPCR a partir de 6 dpi, pero la cinética de acumulación de los clones de longitud completa de T318A fue diferente a la del control T36-GFP (Figura 9, paneles A y B). Mientras que en las plantas agroinfiltradas con éste último el número de copias de gRNA aumentó

entre los 6 y 21 dpi, en todas las plantas infiltradas con los clones de T318A el número de copias de gRNA aumentó entre los 6 y los 14 dpi, pero luego descendió entre los 14 y 21 dpi (Figura 9), llegando a ser prácticamente indetectable a los 28dpi (datos no mostrados); b) aunque la acumulación de gRNA y de los sgRNAs de *p20*, *p23*, *p25* y *p27* aumentó en las plantas agroinoculadas con pCLEAN-p22-FL28-T318A-GFP en comparación con las inoculadas con pCLEAN-FL10-T318A-GFP y pCLEAN-FL15-T318A-GFP, se continuó observando una reducción de los RNAs virales entre 14 y 21 dpi. Por tanto, ninguno de los clones pCLEAN supuso una mejoría significativa frente al clon pCH20-FLT318A (G11) previo y en ningún caso se obtuvo infección sistémica en *N. benthamiana* tal y como ocurre con el clon infeccioso T36-GFP.

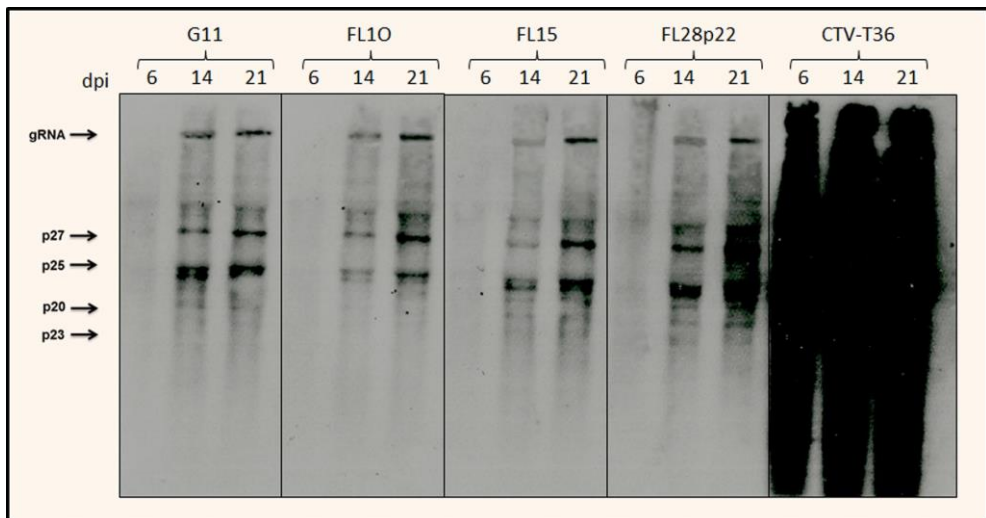


Figura 10a: Hibridación molecular tipo *Northern-blot* de RNAt de hojas de *N. benthamiana wt* agroinfiltradas con los diferentes clones pCLEAN-FLT318A-GFP, pCH20-FLT318A (G11) y T36-GFP (CTV-T36). Las membranas se hibridaron con una sonda RNA-DIG de polaridad negativa complementaria del extremo 3' del aislado T318A. Se indican las posiciones del gRNA y de los sgRNA 3' co-terminales *p27*, *p25*, *p20* y *p23*.

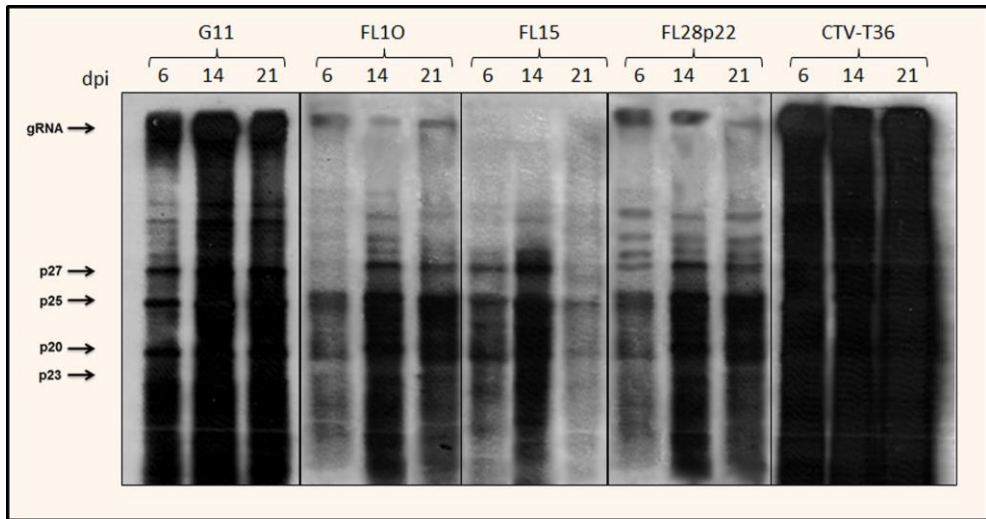


Figura 10b: Hibridación molecular tipo *Northern-blot* de RNAt de hojas de *N. benthamiana* *RdRp6i*. agroinfiltradas con los diferentes clones pCLEAN-FLT318A-GFP, pCH20-FLT318A (G11) y T36-GFP (CTV-T36). Las membranas se hibridaron con una sonda RNA-DIG de polaridad negativa complementaria del extremo 3' del aislado T318A. Se indican las posiciones del gRNA y de los sgRNA 3' co-terminales *p27*, *p25*, *p20* y *p23*.

4. DISCUSIÓN

La búsqueda de motivos de secuencia responsables de la patogenicidad de CTV, hace necesario disponer de un sistema genético eficiente basado en clones de cDNA de aislados que produzcan los distintos síntomas. La disponibilidad de un sistema genético manipulable para CTV ha resultado más difícil que para otros virus de plantas debido a factores como: el gran tamaño de su genoma (19.3 kb), la toxicidad de algunas regiones del mismo que dificultan el mantenimiento y manipulación de los clones de cDNA en células bacterianas, así como la restringida gama de huéspedes del virus y su distribución limitada al floema, que no permiten disponer de un sistema experimental sencillo para los bioensayos.

Al inicio de esta memoria se disponía de un clon infeccioso del aislado T36 de Florida que induce los síndromes de decaimiento y SY pero sólo produce SP en huéspedes muy sensibles como LM o *C. macrophylla* Wester (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001). Sin embargo, para identificar los genes de CTV implicados en la inducción de SP en ND o pomelo era conveniente disponer de un clon infeccioso

que indujese estos síntomas, como el aislado español T318A, del cual se disponía de minireplicones y una serie de clones de cDNA de longitud completa capaces de replicarse localmente en hojas del huésped experimental *N. benthamiana*, pero incapaces de inducir infección sistémica (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013). Estos clones se expresaban bajo la acción del promotor 35S de CaMV en un vector binario de bajo número de copias (pCH20) directamente en hojas de planta, en las que se observó cómo la acumulación de gRNA viral y sGRNAs aumentaba hasta alcanzar un máximo aproximadamente a los 14 dpi, para luego ir disminuyendo y hacerse prácticamente indetectable a los 28 dpi. Estos resultados indicaban que el clon infeccioso del aislado de T318A, capaz de replicarse en hojas agroinfiltradas, no producía infección sistémica en este huésped experimental, lo que sugería algún error en los clones de cDNA de T318A que limitara su infectividad o bien la imposibilidad del propio aislado de moverse e infectar sistémicamente este huésped. En este trabajo se re-secuenció más de la mitad del genoma del clon de pCH20-FLT318A con mayor eficiencia replicativa (G11) y se observaron varias mutaciones que implicaban cambios aminoacídicos en la secuencia de la CPM.

Para comprobar si la incapacidad del clon pCH20-FLT318A original para invadir sistémicamente el huésped experimental *N. benthamiana* era debida a estas mutaciones, se obtuvo un nuevo clon con las mutaciones de *p27* restauradas al que se le insertó el gen marcador *gfp* y poder seguir con mayor facilidad la multiplicación y movimiento del virus dentro de la planta. Por otra parte, para facilitar el manejo en el laboratorio de vectores de gran tamaño como pCH20, se ensayó la subclonación de los *cassettes* de expresión de T318A-GFP en un vector más pequeño, el pCLEAN-G181. Finalmente, para aumentar la eficiencia de la agroinoculación, tal como se había descrito previamente con éxito para el clon infeccioso de T36 (Ambrós *et al.*, 2011), se introdujo en este vector un *cassette* de expresión en *cis* para el supresor de silenciamiento *p22* de ToCV y posteriormente se subclonó el *cassette* de expresión de T318A-GFP. De este modo, se aseguraba que la misma célula co-expresara ambas construcciones.

Se ensayó la agroinfectividad de todos los clones resultantes en hojas de *N. benthamiana*, tanto del genotipo wt como de *RdRp6i*. Las plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con los clones pCLEAN-FLT318A-GFP y pCLEAN-p22-FLT318A-GFP mostraron fluorescencia en las hojas agroinfiltradas, siendo ésta ligeramente superior en las hojas inoculadas con el clon pCLEAN-p22-FLT318A-GFP. Sin embargo, esta señal de fluorescencia era débil y estaba limitada a una o

escasas células, lo que sugiere la incapacidad de estos clones de T318A para moverse célula a célula. Los diversos clones pCLEAN-FLT318A-GFP ensayados y los controles G11 (original de T318A) y T36 presentaron replicación en hojas de *N. benthamiana* detectable mediante hibridación *Northern-blot* y RT-qPCR, si bien la cinética de acumulación del RNA viral fue diferente para los aislados T318A y T36. En el caso del clon de T36-GFP tanto el gRNA como la expresión de los diferentes sgRNAs fue detectable a partir de 6 dpi y aumentó hasta dar lugar a una infección sistémica a las 4-6 semanas. Por el contrario, con los clones de T318A, aunque el gRNA y los sgRNAs fueron detectables a partir del 6 dpi, la acumulación máxima ocurrió a los 14 dpi pero luego disminuyó hasta ser prácticamente indetectable tras 21 dpi. Además, aunque la hibridación *Northern-blot* mostró la expresión del sgRNA *p25* en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones T36 o T318A, los análisis ELISA para detectar la CP fueron siempre positivos para los primeros y negativos para los segundos.

Estos resultados sugieren que las plantas infectadas con los clones T318A diseñados en este trabajo son capaces de transcribirse en el núcleo celular, transportar el RNA transcrito al citoplasma y una vez allí, expresar la replicasa viral y producir nuevas copias del gRNA y los sgRNAs. La disminución progresiva de los RNAs virales del clon T318A a partir de 14 dpi podría ser debida a una expresión o procesamiento inadecuados de algunas proteínas estructurales del virus que impediría el correcto ensamblaje de los viriones, que es fundamental para el movimiento de los closterovirus. En consecuencia, el gRNA se acumularía hasta alcanzar una concentración umbral que desencadenaría las defensas de la planta y su degradación mediante PTGS. A favor de esta hipótesis está el hecho de que en plantas inoculadas con el clon T36-GFP la CP fue detectada mediante ELISA, mientras que esto no ocurrió en las plantas inoculadas con los clones de T318A, a pesar de que en ambos casos se detectó el sgRNA de la cápsida mediante *Northern-blot*. Resultados similares se encontraron en estudios realizados con el virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV), donde se observó una disminución en la acumulación del gRNA viral de mutantes que presentaban la secuencia de la CP truncada respecto al virus salvaje (Wang and Simon 1997), o en el virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLB), donde mutantes que no expresaban la CP presentaban un perfil de acumulación del virus idéntico al observado con los clones de T318A estudiados en este capítulo (Renovell *et al.*, 2010).

En el virus de la mancha anular clorótica del hibisco (*Hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV), miembro de la familia *Tombusviridae*, que al igual que CTV tienen dos proteínas de la cápsida (p27 y p25), se ha descrito que la proteína mayoritaria p25 no es necesaria para la replicación del RNA viral mientras que sí lo es para el movimiento célula a célula y el correcto ensamblaje de los viriones, esencial para el movimiento a larga distancia (Shengniao Niu *et al.*, 2014). De igual modo, la CP del virus de moteado del pasto ovillo (*Cocksfoot mottle virus*, CfMV), miembro de la familia *Sobemovirus*, también con RNA de cadena positiva, actúa como supresor del silenciamiento y está relacionada con el movimiento célula a célula (Olsper *et al.*, 2014). Además, su localización subcelular puede verse alterada en ausencia de otras proteínas virales. Así, cuando dicha CP se expresa independientemente del resto del genoma viral, tiende a localizarse en el núcleo (Olsper *et al.*, 2010), mientras que, expresada con otras proteínas virales se localiza en el citoplasma (Olsper *et al.*, 2014). En la tesis doctoral desarrollada por el Dr. Josep Navarro López (datos no publicados) se estudió la localización subcelular de la CP de los aislados de CTV T36 y T318A mediante expresión heteróloga en hojas de *N. benthamiana* y se observó que mientras la p25 de T36 se localiza en el núcleo celular del huésped, la p25 de T318A presenta una secuencia NES y se localiza en el citoplasma. Esta localización diferencial sugiere que la CP de T318A pudiera interactuar con alguna/s proteína/s del huésped de forma diferencial a la del aislado T36 y que éstas interacciones podrían interferir o bloquear el proceso de infección. Partiendo de esta idea, en experimentos adicionales realizados en el desarrollo de esta memoria, se co-expresó en *trans* la proteína p25 de T36 junto a los clones pCLEAN-FLT318A-GFP en plantas de *N. benthamiana* *RdRp6i*. Sin embargo, la observación de fluorescencia en las hojas agroinfiltradas y el análisis ELISA no mostró ninguna mejora en el proceso de infección.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que el clon T318A, al contrario que T36, pudiera presentar una interacción incompatible entre el virus y el huésped experimental *N. benthamiana*. Para la multiplicación y el movimiento del virus dentro de la planta es necesario la interacción de las proteínas virales con diferentes componentes celulares del huésped, permitiendo que una infección sea compatible o incompatible. En estudios realizados anteriormente se comprobó que los viriones de los aislados T36 y T318A, pero no los de T385, se replicaban en protoplastos de *N. benthamiana* con una eficiencia similar (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013), a pesar de que las ORFs 1b (que codifica para la RNA polimerasa) de T36 y T385 presentan una identidad de secuencia superior al

91% y la de los aislados T36 y T318A sólo del 77%. Se ha descrito que la interacción entre proteínas relacionadas con el movimiento de CTV y proteínas del huésped pueden diferir y dependen tanto del aislado viral como del huésped (Harper *et al.*, 2014 y Tatineni *et al.*, 2011).

La falta de movimiento de T318A en *N. benthamiana* supone una grave complicación en el estudio de los determinantes de patogenicidad del síndrome de SP, ya que imposibilita la utilización de este sistema genético como medio para generar suficientes viriones con los que inocular mecánicamente cítricos y abordar estudios de genética reversa. No obstante, una aproximación alternativa para analizar los posibles determinantes de patogenicidad de CTV y su implicación en los mecanismos de defensa de la planta sería el desarrollo de clones híbridos entre los aislados T36 y T318A, así como el estudio proteómico de la interacción de las distintas proteínas virales de estos aislados con proteínas de *N. benthamiana* y de los huéspedes naturales. Esta última aproximación se ha llevado a cabo en el siguiente capítulo de la presente memoria.

**CAPÍTULO 2: ESTUDIO PROTEÓMICO DE LA INTERACCIÓN
DIFERENCIAL DE LA P20 Y P25 DE DOS AISLADOS DE CTV
PATOGENICAMENTE DISTINTOS Y EL HUÉSPED EXPERIMENTAL
N. benthamiana.**

1. INTRODUCCIÓN

Los virus son parásitos obligados del huésped y como tales dependen de la maquinaria celular de éste para completar su ciclo biológico. Para llevar a cabo con éxito el proceso de infección se han de dar una serie de interacciones compatibles entre el huésped y el virus. La infección es un proceso con múltiples etapas que incluye la entrada del virus en la planta, la expresión y replicación del genoma viral y el movimiento del virus célula a célula y a larga distancia a través del sistema vascular. En el curso de estos procesos se inducen en la planta cambios morfológicos, citológicos y fisiológicos que dan lugar a los síntomas característicos de cada infección (Gandía *et al.*, 2007). Durante este proceso, las plantas se protegen frente a la infección viral mediante diferentes mecanismos de defensa, entre los que se encuentran la respuesta inmune innata, la HR, la activación de los genes R, la activación de las rutas mediadas por hormonas como el AS, AJ, ABA o ET, así como el PGTS, entre otras. Por otro lado, los virus han evolucionado desarrollando mecanismos de contra-defensa capaces de minimizar las defensas de la planta para tener éxito en el proceso de infección. Estas interacciones generan la sintomatología característica de la enfermedad, que en ocasiones puede ser específica para diferentes aislados virales.

El desarrollo en los últimos años de la proteómica ha permitido estudiar la compleja interacción huésped-patógeno. Los virus de plantas constituyen un excelente modelo para el estudio de estas interacciones ya que presentan una alta dependencia del metabolismo celular para llevar a cabo su multiplicación y movimiento en los tejidos del huésped. Los virus han evolucionado para empaquetar la mayor información funcional posible en un genoma pequeño, lo que ha facilitado la aparición de proteínas virales multifuncionales que presentan diferentes dominios y permiten al virus establecer una compleja red de conexiones con el proteoma del huésped.

Los estudios de la interacción de CTV con la planta son especialmente complejos debido a: i) la estricta limitación del virus al floema de la planta, ii) la lentitud de su ciclo de infección en plantas leñosas o iii) la diversidad de los síntomas inducidos dependiendo de las combinaciones entre patotipos de CTV y las especies, variedades o combinaciones injerto/patrón infectadas (Moreno *et al.*, 2008; Dawson *et al.*, 2015).

Diversos trabajos han demostrado la implicación de la proteína p23 como determinante de patogenicidad de CTV (López et al. 2000; Satyanarayana *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013; Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2013; Soler *et al.*, 2015; Albiach-Martí *et al.*, 2010). De igual modo, se ha descrito que las proteínas p13, p18 y p33 de CTV, que son necesarias para la infección sistémica de algunas especies de cítricos pero no de otras (Tatineni *et al.*, 2008, 2011) y están relacionadas con los síntomas de SP, si bien la intensidad de este síntoma resulta de un balance en la expresión de las mismas y del aislado al que pertenecen (Tatineni and Dawson, 2012; Dawson *et al.*, 2015). En la actualidad, los determinantes del síndrome de tristeza se desconocen.

Las proteínas p20 y p25 actúan como supresores del PTGS a corta y/o a larga distancia, respectivamente (Lu *et al.*, 2004). En la tesis doctoral del Dr. Josep Navarro López (2017, datos no publicados) se estudió la localización subcelular de las proteínas p20 y p25 de los aislados T318A y T36 en *N. benthamiana*, así como en diversas especies de cítricos, no encontrando diferencias entre el huésped experimental y los huéspedes naturales. Al estudiar la localización de p20 se observó su presencia en agregados peri-nucleares y nucleares, que no co-localizaban con marcadores nucleolares o de los cuerpos de Cajal. Estos agregados se asemejan a manchas nucleares descritas como cuerpos nucleares donde se acumulan factores implicados en el complejo de maduración de los RNAs, denominadas spliceosoma. Trabajos previos realizados por Gowda y colaboradores (2000) mostraron que p20 presenta una gran afinidad consigo misma y se acumula en las inclusiones amorfas que se observan en células infectadas de cítricos.

Por el contrario, la localización subcelular observada para p25 difería entre los aislados T318A y T36. Mientras la proteína p25-T36 se localizó en el núcleo celular, p25-T318A lo hizo en el citoplasma. Estos hallazgos sugieren que ambas proteínas pueden estar implicadas en procesos cruciales en la regulación de la infección viral y que, al menos en el caso de p25, su acción en *N. benthamiana* puede diferir entre aislados de CTV (Navarro-López *et al.*, 2011).

En los últimos años se han realizado los primeros estudios proteómicos de cítricos en respuesta a la infección cursada por CTV. En ellos se ha estudiado la respuesta molecular a la infección en combinaciones injerto/patrón tolerantes o sensibles al decaimiento por CTV (Laino *et al.*, 2016) y en ND de semilla, así como las

diferencias en la expresión de proteínas del ND dependiendo del patotipo de CTV (Fu *et al.*, 2016). Estos estudios revelan que: i) en las plantas tolerantes se produce menos acumulación de las proteínas involucradas en el metabolismo energético, la respuesta al estrés oxidativo, la homeostasis celular y la defensa que en las plantas sensibles, en las que se observa una sobre-acumulación de proteínas relacionadas con el estrés biótico, el crecimiento vegetativo y el daño en tejidos floemáticos. Así, en combinaciones sensibles se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la defensa de la planta y el estrés oxidativo, la ruta del ABA, la quitinasa o la proteína de choque térmico 19 (*Heat shock protein 19*, HSP19), ii) la tolerancia a la infección por CTV en plantas de semilla puede estar asociada a una represión parcial de la respuesta inmune por parte de la planta y iii) esta respuesta es específica de patotipos de CTV. Estos estudios muestran las rutas metabólicas y proteínas del huésped que alteran su expresión como respuesta a la infección viral. Sin embargo, no muestran en detalle qué proteínas de la planta interactúan específicamente con las proteínas de CTV, necesarias para completar su ciclo biológico y en su caso, inducir los síntomas característicos.

N. benthamiana es un huésped experimental susceptible para un gran número de patógenos, entre los que encontramos bacterias, hongos y virus (Carmo *et al.*, 2013). A pesar que el único huésped natural de CTV son los cítricos, la agroinoculación de plantas de *N. benthamiana* con el clon infeccioso T36-GFP dio lugar a una infección sistémica y a la formación de viriones normales, que tras ser inoculados en plantas de cítricos reprodujeron los síntomas característicos del aislado T36 original (Ambrós *et al.*, 2011, 2013). Sin embargo, la agroinoculación de clones infecciosos del aislado virulento T318A, a pesar de ser capaces de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana*, no produjo infección sistémica y la infección quedó reducida a células aisladas o a pequeños grupos celulares de las hojas agroinfiltradas (véase capítulo 1 de esta tesis y Ruiz-Ruiz, 2009). Una de las posibles causas de esta falta de infección sistémica puede ser la interacción diferencial entre proteínas de la planta y CTV en etapas tempranas de los procesos de infección de T36 o de T318A, responsables de determinar una interacción compatible o incompatible. Este hecho, sumado al comportamiento diferencial de diversos aislados de CTV observado en protoplastos (Harper *et al.*, 2014; Tatineni *et al.*, 2011), hacen de *N. benthamiana* un huésped idóneo para el estudio de la interacción entre las proteínas de CTV y las de la planta.

Por ello, el objetivo de este capítulo es el estudio de las interacciones diferenciales de dos proteínas supresoras importantes de CTV (p20 y p25), de aislados patogénicamente diferentes (T36 y T318A), con el proteoma de *N. benthamiana* mediante un enfoque proteómico de alto rendimiento. Esta investigación es necesaria para comprender la función de las proteínas p20 y p25 *in planta* y su posible implicación en la sintomatología inducida por cada aislado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención e identificación de los complejos proteicos *N. benthamiana*-p20-CTV

2.1.1. Fusión de la proteína p20 de los aislados T36 y T318A con la etiqueta One-STrEP-tag

La etiqueta One-STrEP-tag (IBA Lifesciences) se fusionó a la proteína p20 de los aislados T36 y T318A. Esta etiqueta está constituida por un péptido de ocho aminoácidos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) que simula a la h-biotina. Para realizar la fusión en el extremo C-terminal de *p20*, su ORF se amplificó por PCR a partir de las secuencias genómicas correspondientes de los clones de cDNA de longitud completa de los aislados T36 (Satyanarayana *et al.*, 2001) y T318A (Ruiz-Ruiz, 2009) utilizando los cebadores p20T36D-p20T36R o p20T318AD-p20T318AR (Tabla 1), respectivamente, y usando condiciones similares a las descritas en otras secciones. Los productos obtenidos quedaron flanqueados por los puntos de restricción *PagI-NheI* y tras su digestión con dichas enzimas se clonaron en el vector pBluescript II SK+ (pBS) (Sambrook *et al.*, 1989), a su vez digerido con las mismas enzimas, obteniendo las construcciones pBS-p20-T36 y pBS-p20-T318A. La etiqueta One-STrEP-Tag se escindió por restricción a partir del vector pBS-p25-T36-tag (cedido por el Dr. Josep Navarro López). Debido a la presencia de un sitio *AfeI* en la secuencia de *p20* de T36, no presente en la *p20* de T318A, se siguieron dos estrategias distintas dependiendo del aislado. La obtención de la construcción pBS-p20-T318A-tag se realizó mediante digestión del vector pBS-p25-T36-tag con las enzimas *NheI-AfeI* para liberar la etiqueta One-STrEP-Tag y su posterior ligación en el vector pBS-p20-T318A, digerido con las mismas enzimas. En cambio, la construcción pBS-p20-T36-tag se obtuvo mediante la digestión *NheI-BamHI* del vector pBS-p25-T36-tag y ligación posterior de la etiqueta en el clon p20-T36-pBS,

previamente digerido con las mismas enzimas. Los *cassettes* de las proteínas fusionadas se liberaron digiriendo con *HindIII* y se clonaron en el vector binario pMOG (Knoester *et al.*, 1998), previamente digerido con *HindIII*. Las construcciones pMOG-p20-T36-tag y pMOG-p20-T318A-tag se transformaron en células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (apartado 2.3.1. material y métodos, Capítulo 1).

2.1.2. Agroinfiltración de *N. benthamiana* y purificación de complejos proteicos *N. benthamiana*-p20 CTV

Bacterias de *A. tumefaciens* C58C1 portadoras de las construcciones pMOG-p20-T36-tag, pMOG-p20-T318A-tag o del vector pMOG-tag vacío, se cultivaron a 28°C toda la noche en LB suplementado con 100 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina. Los cultivos bacterianos ajustados a una DO_{600nm} de 0,5 tal como se ha indicado previamente (Material y métodos, Capítulo 1) se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad utilizando 7 plantas por clon.

Tres días después de la agroinfiltración se recolectaron las hojas infiltradas, se mezclaron las de cada clon y se tomaron 15 g de material vegetal por clon.

El material vegetal se pulverizó con N₂ líquido, se homogeneizó con 45 ml de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol DTT, 1 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40) y se añadió un inhibidor de proteasas (Complete, Roche Life Science). La mezcla fue centrifugada a 12,000×g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos y ultracentrifugado, en esta ocasión, a 95,000×g durante 30 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante del extracto vegetal fue inyectado en el sistema de cromatografía líquida ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, UK), que contiene una matriz Strep-Tactin (estreptavidina) con alta afinidad para unir biotina (One-STrEP-tag). Las muestras se lavaron con tampón de extracción y los complejos unidos específicamente se eluyeron mediante la adición de 20 ml de tampón de extracción más 10 mM D-desthiobiotina (competidor específico de la biotina).

De cada clon se recolectaron 14 fracciones de 1 ml y pequeñas alícuotas de éstas se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (12.5 % acrilamida, 0.05 % SDS) y se analizaron mediante *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-STrEP-tag

(StrepMAB Classic-HRP, IBA). Para ello, tras la electroforesis, se realizó una transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (GE Healthcare) mediante el empleo de un equipo de electrotransferencia (Unidad de transferencia semi-seca, VWR) con el tampón correspondiente (25 mM Tris y 192 mM glicina), durante 1 h a intensidad constante (1 mA/cm² de membrana). La membrana se bloqueó 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 se incubó con una dilución 1:10000 del anticuerpo Strep-Tactin-HRP en el mismo tampón de bloqueo. Se realizaron diversos lavados 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. De las 14 fracciones analizadas se seleccionaron las fracciones de la 5 a la 13, se juntaron y precipitaron mediante la adición de 12,5 % ácido tricloroacético y 10 mM ditiotreitól (DTT), para finalmente, re-suspenderse en 30 µl de agua junto a 15 µl de tampón de carga y analizarse posteriormente mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS).

CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN
p20T36-D	ATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAATGA	D 1pb - 26pb ^a
p20T36-R	TACACGCAAGATGGAGAGACTAAATTA	R 521pb - 548pb ^a
p20T318A-D	ATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAATC	D 1pb - 24pb ^b
p20T318A-R	TACACGCATAAGGAGAACTAAATT	R 522pb - 548pb ^b
F61	CATGGAGGCCGAATTCATGCGACGACGAAACAAAG	D 1pb - 17pb ^c
F62	GCAGGTCGACGGATCCCTCAACGTGTGTTGAATTC	R 652pb - 669pb ^c
F63	CATGGAGGCCGAATTCATGCGAGCTTACTTTAG	D 1pb - 19pb ^{ab}
F64	GCAGGTCGACGGATCCCTACACGCATGAAGGAG	R 529pb - 548pb ^{ab}
F65	GGAGGCCAGTGAATTCATGCGTGGGAAGAAGAG	D 1pb - 17pb ^d
F66	GAGCTCGATGGATCCACAATAAAACATAACCCTCTTAAC	R 3128pb - 3153pb ^d
F67	GGAGGCCAGTGAATTCATGCGTGAAGAAGATAAG	D 1pb - 18pb ^e
F68	GAGCTCGATGGATCCCTTAACAAAAGAACATGGAAGTGG	R 433pb - 457pb ^d
F79	GGAGGCCAGTGAATTCATGGGGATCACTGATAC	D 1pb - 17pb ^f
F70	GAGCTCGATGGATCCCTGCGGTTGCGTCTCAC	R 429pb - 457pb ^f
F110	CATGGAGGCCGAATTCCTTTTCGGTTCCTTAAACTTACACATCG	D 75pb - 103pb ^g

p20T36-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG CGAGCTTACTTTAGTGTTAATG	D	1pb - 26pb ^a
p20T36-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ACACGCAAGATGGAGAGACTAAA	R	525pb - 548pb ^a
p20T318A-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG CGAGCTTACTTTAGTGTTAACG	D	1pb - 24pb ^b
p20T318A-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ACACGCGATGAAGGAGAAACTAAA	R	525pb - 548pb ^b
p25T36-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG GACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAA	D	1pb - 29pb ^{c1}
p25T36-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA ACGTGTGTTGAATTTCCCAAGCTGCCTG	R	641pb - 669pb ^{c1}
p25T318A-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG GACGACGAGACAAAGAAATTGAAG	D	1pb - 27pb ^{c2}
p25T318A-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA ACGTGTGTTAAATTTCCCAAGCTGCCTG	R	641pb - 669pb ^{c2}
AGO1-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG TGCGGAAGAAGAGGAC	D	1pb - 21pb ^d
AGO1-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA AATAAACATAACCCTCTTAACATTC	R	3131pb - 3153pb ^d
AGO4-RT	TTAACAAAAGAACATGGAACGGAACTTT	R	Flanqueante 3' ORF ^e
AGO4-D	ATG GCTGAAGAAGATCCGAATGGAGCAGCAGAAG	D	1pb - 34pb ^e
AGO4-R	ACAAAAGAACATGGAACAGGAAACTTTTTCTCGAGCTTCGGAAGCTGGGGAACG	R	Flanqueante 3' ORF ^e
AGO4-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG GCTGAAGAAGATAAGAATGGAGCA	D	1pb - 28pb ^e
AGO4-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA ACAAAAGAACATGGAACCTGGAACATTTT	R	2689pb - 2717pb ^e
TRX-RT	AAAAAGAGAGGAGGGGGTTGAATATGG	R	Flanqueante 3' ORF ^f
TRX-D	TTAAATTGGAAGTTGATTTGTTTC	D	Flanqueante 5' ORF ^f
TRX-R	TCAACATACAACCTGAGAGCC	R	Flanqueante 3' ORF ^f
TRX-attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT ATG GGGATTACTGATATGGTACA	D	1pb - 23pb ^f
TRX-attb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA CTGCGGTTGCGTCTCACATA	R	437pb - 457pb ^f

Tabla1: Secuencia y posiciones nucleotídicas de los cebadores utilizados para llevar a cabo las diversas construcciones. Se indica en rojo el codón de inicio de cada gen, subrayado las secuencias *attb* recombinantes con el plásmido pGBKT7-BD (Clontech), subrayado y en cursiva las secuencias *attb* recombinantes con el vector pGADT7-AD (Clontech), en negrita las secuencias *attb* recombinantes con el plásmido pSPYNE y en negrita y cursiva las secuencias *attb* recombinantes con el vector pSPYCE. D y R indican el sentido directo o reverso de cada secuencia de cebadores, respectivamente. .

^a. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de p20 del aislado CTV T36 (GenBank AY170468).

^b. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de p20 del aislado CTV T318A (GenBank DQ151548).

- ^c. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de p25 de ambos aislados. ^{c1} p25 de T36 (GenBank AY170468) y ^{c2} p25 de T318A (GenBank DQ151548).
- ^d. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de AGO1 (GenBank DQ321488.1)
- ^e. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de AGO4 (GenBank DQ321491.1).
- ^f. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica la tioredoxina h-9 (TRX-H9) (NCBI Reference Sequence: XM_019375804.1).
- ^g. Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de p25 de ambos aislados que hacen referencia al cebador directo utilizado en la construcción de los clones en doble híbrido, donde ambas proteínas p25 carecen de los 26 primeros aminoácidos.

2.2. Identificación y análisis bioinformático de los complejos proteicos *N. benthamiana*-p20

2.2.1. Análisis molecular

Los complejos proteicos purificados mediante cromatografía de afinidad procedentes de *N. benthamiana*, se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE (12.5 % acrilamida, 0.05 % SDS) que se tiñó con azul de Coomassie. Las bandas proteicas resultantes se cortaron y digirieron con tripsina sequencing-grade (Promega), se eluyeron y analizaron por LC/MS-MS. Para ello, se cargaron 5 μ l de cada muestra peptídica en una columna de cromatografía (NanoLC column, 3 μ 567 C18-CL, 100 μ m \times 15 cm; Nikkyo) desalada con 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) y equilibrada con 5 % acetonitrilo (ACN) y 0,1 % ácido fórmico (FA). La elución de las muestras se realizó mediante un gradiente lineal del 5 al 40% de ACN más 0,1 % FA. Los péptidos obtenidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX) en el servicio de espectrometría de la Universidad de Valencia.

2.2.2. Análisis bioinformático

Este análisis se realizó en colaboración con el Dr. Guillermo Rodrigo (IBMCP, C.S.I.C., Valencia). Para identificar las proteínas se utilizaron los programas Protein Pilot v4.5 (ABSciex) y Mascot v2.2 (Matrix Science). Se obtuvieron tres listados de proteínas, uno para cada muestra de p20 (p20-T36 o p20-T318A) y otra para el control de pMOG. Cada proteína identificada en los listados tiene un número de acceso Mascot y un índice de abundancia o emPAI (Ishima *et al.*, 2005). Para filtrar los listados se aplicó el valor diferencial de $\Delta\text{emPAI} \geq 0.1$.

Posteriormente, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias ortólogas de la base de datos de *A. thaliana*, cuya función es conocida, utilizando la herramienta bioinformática Biophyton (Cock *et al.*, 2009). Se relacionó el número de acceso Mascot de los listados proteicos con el identificador GenInfo (GI) de la base de datos The Arabidopsis Information Resource v10 (TAIR <https://www.arabidopsis.org/>) y se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada valor GI en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego se realizó el alineamiento (e-valor $<0,0001$) de secuencias con la base de datos Alignment Search Tool local (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990), identificándose el gen ortólogo de *A. thaliana*.

Esta misma estrategia (Figura 1) fue realizada previamente por el Dr. Josep Navarro López (2017), quién obtuvo listados similares tras purificar complejos proteicos de *N. benthamiana* al agroinfiltrar plantas con la p25 de los aislados T36 y T318A. Estos listados fueron empleados en la presente tesis para analizarlos comparativamente con los de p20.

Para la clasificación funcional y estructural de las proteínas del huésped con posible interacción con p20-T36, p20-T318A, p25-T36 o p25-T318A se utilizó la base de datos agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) (Du *et al.*, 2010). Luego se agruparon en módulos metabólicos de la planta mediante el programa REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek *et al.*, 2011), en el cual los datos se evaluaron mediante una prueba exacta de Fisher (tablas de contingencia 2x2) con una corrección de múltiples ensayos utilizando el test Benjamini-Hochberg FDR (Pvalor $< 0,05$).

Los resultados de los análisis se representaron en diagramas de Venn, indicando el número de proteínas del huésped coincidentes que potencialmente interaccionarían con las proteínas p20 y/o p25 de los aislados de CTV T36 y/o T318A e identificándolas. Las proteínas de la planta identificadas se agruparon en listados funcionales según su posible interacción con una o varias proteínas de CTV, señalando las diferencias entre las p20 y p25 de los aislados T36 y T318A (Anexo: Tablas 1-15).

Se realizó un análisis computacional de los listados proteicos de *N. benthamiana* utilizando el interactoma de *A. thaliana*. El cual, cubre alrededor de 8.000 proteínas de interacción experimentalmente contrastada (Chatr-Aryamontri *et al.*, 2015). Mediante el empleo de la herramienta bioinformática Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) (Shannon *et al.*, 2003), se analizaron diferentes propiedades topológicas (Figura 2) para cada red de interacción entre el interactoma de *A. thaliana* y cada una de las proteínas de CTV. Estas propiedades incluían los siguientes parámetros: i) Grado de conectividad (K); ii) Longitud promedio del camino corto (l); iii) Centralidad (b) y iv) Coeficiente de agrupamiento o clusterización (c). Los valores obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el Mann-Whitney U-test ($P < 0,05$). Este test estadístico comparó la distribución resultante en cada lista de proteínas problema respecto a la distribución de todo el interactoma de *A. thaliana*, o respecto a una lista de proteínas efectoras aleatoria, para cada uno de los parámetros estudiados. El análisis computacional se realizó empleando el software MATLAB (The MathWorks).

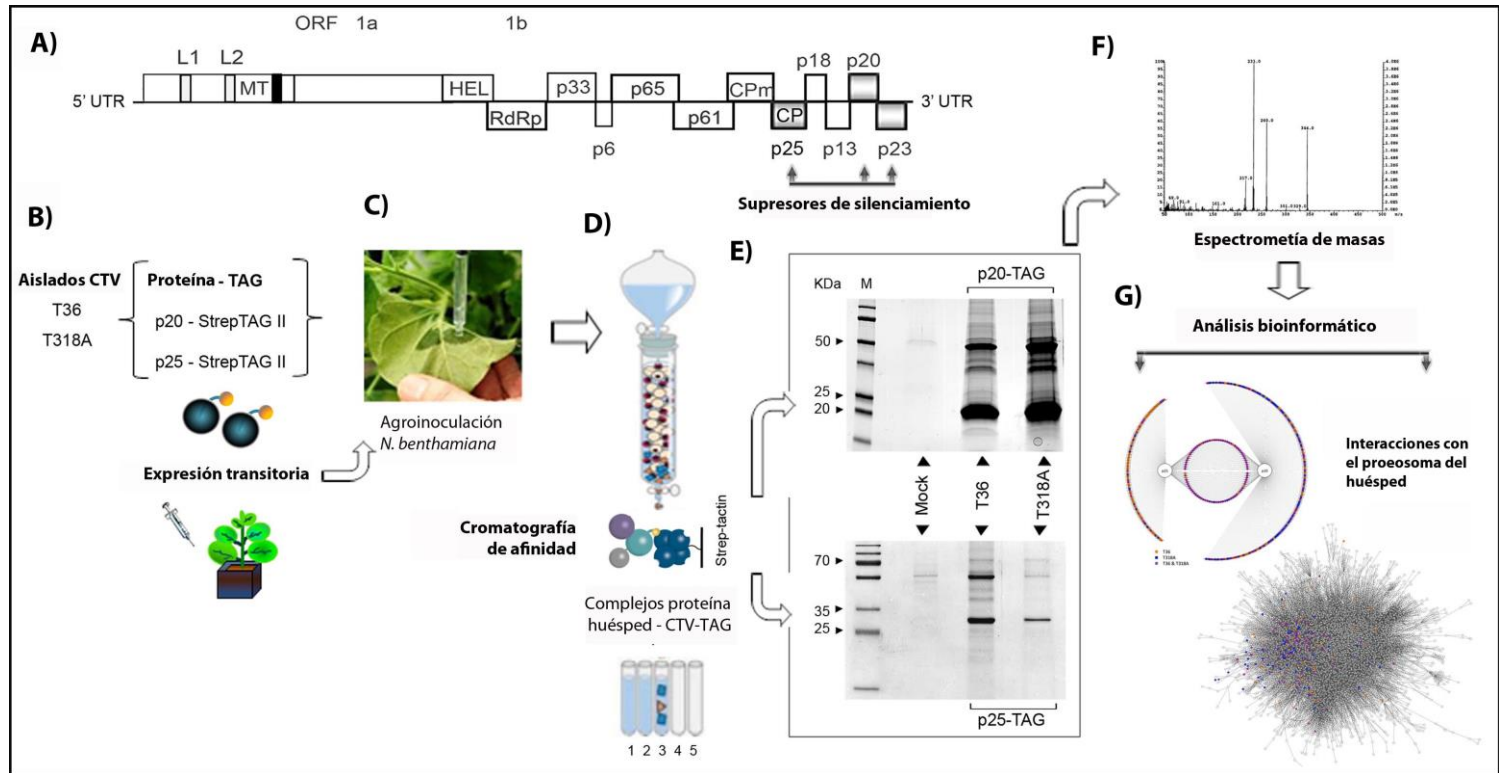


Figura 1: Esquema del proceso de purificación de los complejos proteicos CTV-planta. A) Esquema de la organización genómica de CTV donde se indican los tres genes supresores del silenciamiento mediado por RNA. B) Etapas en la fusión de la etiqueta One-STREP-tag y las proteínas p20 y p25 de CTV. C) Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* para la expresión transitoria de las proteínas fusionadas. D) Esquema de la purificación de los complejos proteicos CTV-planta mediante cromatografía de afinidad. E) Análisis electroforético de las proteínas eluidas (Mock: control negativo). F) Identificación mediante LC/MS-MS. G) Análisis bioinformático.

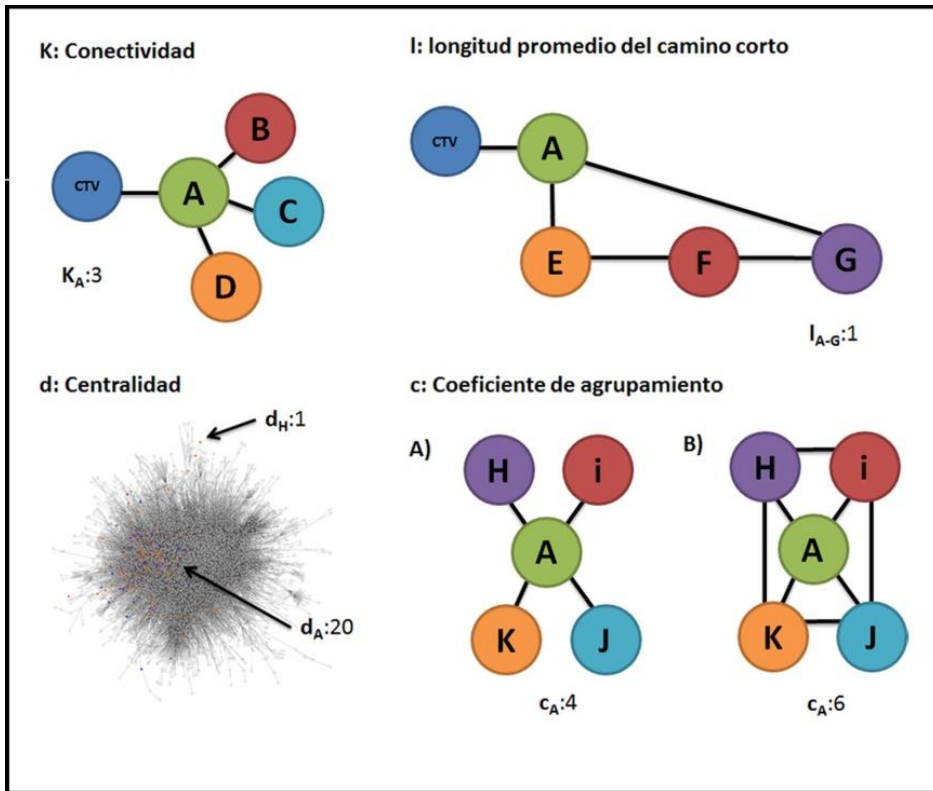


Figura 2: Representación descriptiva de los índices topológicos analizados en el estudio del interactoma de *A. thaliana* con las proteínas de CTV. **K:** ejemplo de conectividad de la proteína A (proteína diana de la planta) que interactúa con la proteína de CTV. **I:** ejemplo de la longitud promedio del camino más corto, existiendo dos caminos alternativos entre las proteínas de la planta A (proteína de *A. thaliana* con la que interactúa CTV) y G, se toma el valor del camino que menos proteínas intermediarias implica para incidir sobre la proteína G. En el ejemplo se describen dos caminos, uno directo entre A y G y otro que pasa por la participación de las proteínas E y F. **d:** La centralidad de las proteínas que interactúan con CTV marca el grado de implicación con múltiples o escasas rutas de la planta y **c:** El coeficiente de agrupamiento mide cómo de conectadas están entre sí la proteína diana (A) y las proteínas de la planta con las que ésta interactúa. **A)** Ejemplo de cómo la proteína del huésped diana A está conectada con 4 proteínas más de la planta, incidiendo sobre cuatro posibles rutas metabólicas diferentes. **B)** Ejemplo de cómo la proteína A está conectada con 4 proteínas más de la planta, que a su vez están conectadas entre sí, sugiriendo que las rutas que activa la proteína de CTV al interactuar con la proteína A del huésped están relacionadas entre sí.

Finalmente, se realizaron gráficos de dispersión utilizando el índice de abundancia empAI y se seleccionaron algunas proteínas de *N. benthamiana* para realizar estudios de interacción directa. Estos análisis se llevaron a cabo mediante doble híbrido en levadura y ensayo de complementación bimolecular por fluorescencia (BIFC) *in planta*.

2.3. Estudio de la interacción directa entre proteínas de *N. benthamiana* y las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A de CTV

2.3.1. Análisis de interacciones proteínas CTV-proteínas del huésped mediante la técnica de doble híbrido en levadura

La construcción de dobles híbridos en levadura se realizó en colaboración con el Dr. Fernando Martínez (IBMCP, C.S.I.C, Valencia). Los cDNA de las proteínas virales p20 y p25, de los aislados T36 y T318A, se amplificaron con los cebadores F63-F64 (p20) o F61-F62 (p25) (Tabla 1) respectivamente, utilizando como molde construcciones previas disponibles en el vector pDONR 207. En la reacción de PCR, realizada de forma similar a lo descrito en otros apartados, se incorporaron las secuencias *attb* para la recombinación en el vector pGBKT7-BD (Clontech), utilizando la enzima In-Fusion® HD Cloning (Clontech). Así, las proteínas de CTV quedaron fusionadas al factor de unión de DNA GAL4 (BD) del vector pGBKT7-BD. Los clones resultantes se transformaron en células competentes de *S. cerevisiae* cepa Y2H Gold mediante choque térmico, siguiendo el protocolo previamente descrito (Green y Sambrook, 2012. Capítulo 22).

De forma similar, los cDNA de las proteínas de *N. benthamiana* AGO1 (GenBank DQ321488.1), AGO4 (GenBank DQ321491.1) y tioredoxina h-9 (TRX-H9, XM_019375804.1) se amplificaron por PCR con los cebadores, F65-F66, F67-F68 y F79-F70 (Tabla 1) respectivamente, a partir de las construcciones en el vector pDONR 207. En esta reacción de PCR se incorporaron las secuencias *attb* necesarias para la recombinación en el vector pGADT7-AD (Clontech) y se clonaron siguiendo la misma estrategia descrita previamente, de modo que las proteínas de la planta quedaron fusionadas al dominio de activación de DNA GAL4 (AD) del vector pGADT7-AD. Los clones resultantes se transformaron en células competentes de *S. cerevisiae* cepa Y187 como se ha indicado.

Las construcciones obtenidas se utilizaron para enfrentar cada proteína viral a las diferentes proteínas de la planta generando una cepa de *S. cerevisiae* diploide que era auxótrofa para los aminoácidos leucina y triptófano y dependiente de la unión de los factores de transcripción BD-AD para la producción del aminoácido histidina y la activación del gen *LacZ*.

Los diferentes clones de *S. cerevisiae* diploides se sembraron en el medio DDO/X, medio SD (*synthetically defined medium*, Clontech) que incluye todos los aminoácidos esenciales a excepción de leucina y triptófano. Las combinaciones fueron re-sembradas en el medio de cultivo QDO/X/A, medio SD con X- α -Gal, que incluye todos los aminoácidos esenciales a excepción de leucina, triptófano e histidina.

Las construcciones realizadas para p25 revelaron una toxicidad que inhibió el crecimiento de las levaduras. Con el fin de evitar dicha toxicidad se sintetizaron versiones de p25 que presentaban la delección de los primeros 26 aminoácidos N-terminales de la proteína. Para ello, se amplificaron las secuencias de p25 de T36 y T318A a partir de sus construcciones en pDONR 207 con los cebadores F110 y F62, se clonaron mediante recombinación en el vector pGBKT7-BD y se utilizaron para el estudio de las interacciones con pGADT7-AD-AGO4, pGADT7-AD-AGO1 y pGADT7-AD-TRX.

Como control positivo se utilizaron combinaciones entre la proteína tumoral p53 y su antígeno T, SV40, cuya interacción se ha descrito previamente (Li y Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993). Por el contrario, como controles negativos se enfrentaron las construcciones virales al vector pGADT7-AD vacío y las construcciones de la planta al vector pGBKT7-BD vacío.

2.3.2. Análisis de la interacción mediante complementación bimolecular por fluorescencia (BIFC)

La interacción directa *in vivo* de p20 o p25 de los aislados T36 y T318A con proteínas de *N. benthamiana* se analizó mediante BIFC con el sistema de vectores pSPYNE-pSPYCE. La fusión de las mitades YFP se realizó en el extremo C-terminal de las proteínas p20 y p25, ya que el marcaje de p25 en el extremo N-terminal mostró inestabilidad de la proteína y falta de expresión *in planta* en ensayos

preliminares. Las construcciones en los diferentes vectores de expresión se realizó mediante la tecnología Gateway® (INVITROGEN). Así, las secuencias codificantes de p20 y p25, de ambos aislados, se amplificaron por PCR, en condiciones similares a las descritas en otros apartados, a partir de las construcciones pBS-p20-T36, pBS-p20-T318A, pBS-p25-T36 o pBS-p25-T318A utilizando la polimerasa Phusion (Fermentas) y los cebadores: p20T36*attb1*-p20T36*attb2*, p20T318A*attb1*-p20T318A*attb2*, p25T36*attb1*-p25T36*attb2* y p25T318A*attb1*-p25T318A*attb2* (Tabla 1), respectivamente. La secuencia genómica de la proteína AGO1 de *N. benthamiana* se amplificó con los cebadores AGO1*attb1*-AGO1*attb2* (tabla 1) a partir del clon pROK-AGO1 (cedido amablemente por la Dra. C. Hernández, IBMCP, C.S.I.C., Valencia). Por otra parte, las secuencias de cDNA que codifican las proteínas AGO4 y TRX-H9 se obtuvieron a partir de extractos de RNAt de planta sana de *N. benthamiana* mediante RT-PCR. La reacción de RT se realizó con la retro-transcriptasa SuperScript™ II (ThermoFisher Scientific) y los cebadores AGO4-RT o TRX-RT (Tabla 1), respectivamente, durante 1h a 42°C. Posteriormente, una alícuota de esta RT se amplificó con la enzima Phusion (Fermentas) y las parejas de cebadores AGO4D-AGO4R o TRXD-TRXR (Tabla 1), en condiciones similares a las descritas. Las colas *attb* se añadieron a dichas secuencias mediante una reacción de PCR adicional en la que se utilizaron los cebadores AGO4*attb1*-AGO4*attb2* o TRX*attb1*-TRX*attb2* (Tabla 1) respectivamente.

Los productos de PCR flanqueados por secuencias de recombinación *attb*, se purificaron con el estuche comercial Zymoclean™ (EcoGen) y se clonaron en el vector pDONR 207 mediante una reacción de ligación con la enzima II BP clonasa™. Células competentes de *E. coli* DH5α se transformaron por electroporación con los productos de ligación, siguiendo el protocolo previamente descrito (Green y Sambrook, 2012. Capítulo 3), y se sembraron en medio sólido LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias se analizaron para obtener los clones pDONR-p20-T36, pDONR-p20-T318A, pDONR-p25-T36, pDONR-p25-T318A, pDONR-AGO1, pDONR-AGO4 y pDONR-TRX. Finalmente, se llevó a cabo una reacción de recombinación mediada por la enzima LB clonasa™ entre las construcciones pDONR-p20-T36, pDONR-p20-T318A, pDONR-p25-T36 o pDONR-p25-T318A y el vector binario pSPYNE, o entre las construcciones pDONR-AGO1, pDONR-AGO4 o pDONR-TRX y el vector binario pSPYCE. Células competentes de *E. coli* DH5α se transformaron con los productos de ligación mediante electroporación y se sembraron en LB suplementado con 100 µg/ml Kanamicina.

Las colonias obtenidas se analizaron para obtener los clones pSPYNE-p20-T36, pSPYNE-p20-T318A, pSPYNE-p25-T36 y pSPYNE-p25-T318A y se transformaron en células de *A. tumefaciens* cepa C58C1 por electroporación (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1. de materiales y métodos del capítulo 1).

Colonias de *A. tumefaciens* C58C1 portadoras de las construcciones pSPYNE-p20-T36, pSPYNE-p20-T318A, pSPYNE-p25-T36, pSPYNE-p25-T318A, pSPYCE-AGO1, pSPYCE-AGO4, pSPYCE-TRX y pSPYCE-p20-T36, o de los vectores vacíos pSPYNE y pSPYCE, se cultivaron a 28°C en medio LB suplementado con 100 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina. Los cultivos bacterianos se centrifugaron y re-suspendieron en medio de infiltración (como se ha descrito en apartados anteriores) y se ajustaron a una DO_{600nm} de 1, se indujeron 2 h a temperatura ambiente en agitación suave y se mezclaron en proporción 1:1 en las siguientes combinaciones para llevar a cabo los ensayos:

- pSPYNE-p20-T36 + pSPYCE-AGO1
- pSPYNE-p20-T318A + pSPYCE-AGO1
- pSPYNE-p20-T36 + pSPYCE-AGO4
- pSPYNE-p20-T318A + pSPYCE-AGO4
- pSPYNE-p20-T36 + pSPYCE-TRX
- pSPYNE-p20-T318A + pSPYCE-TRX
- pSPYNE-p25-T36 + pSPYCE-AGO1
- pSPYNE-p25-T318A + pSPYCE-AGO1
- pSPYNE-p25-T36 + pSPYCE-AGO4
- pSPYNE-p25-T318A + pSPYCE-AGO4
- pSPYNE-p25-T36 + pSPYCE-TRX
- pSPYNE-p25-T318A + pSPYCE-TRX
- pSPYNE-p20-T36 + pSPYCE (control negativo de p20 T36)

- pSPYNE-p20-T318A+ pSPYCE (control negativo de p20 T318A)
- pSPYNE-p25-T36 + pSPYCE (control negativo de p25 T36)
- pSPYNE-p25-T318A+ pSPYCE (control negativo de p25 T318A)
- pSPYCE-AGO1 + pSPYNE (control negativo de AGO1)
- pSPYCE-AGO4 + pSPYNE (control negativo de AGO4)
- pSPYCE-TRX + pSPYNE (control negativo de TRX-H9)
- pSPYCE + pSPYNE (control negativo del sistema de expresión para YFP)
- pSPYNE-p20-T36 + pSPYCE-p20-T36 (control positivo del sistema de expresión)

Todas las combinaciones fueron co-infiltradas con cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 transformados con los vectores binarios portadores del gen supresor del silenciamiento *p19* de TBSV (Voinnet *et al.*, 2005) utilizando una relación 2:1 (combinación BIFC: p19). Las distintas mezclas se infiltraron en plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad, un total de 2 plantas por clon en 3 experimentos diferentes, siguiendo el protocolo descrito previamente.

Como en otras ocasiones, las plantas se observaron mediante microscopio confocal (LEICA TCS SL) transcurridas 48-72h tras la agroinoculación.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención e identificación de los complejos proteicos *N. benthamiana*-p20 CTV

3.1.1. Purificación de complejos proteicos *N. benthamiana*-p20 CTV

Para identificar las proteínas del huésped *N. benthamiana* que potencialmente interactúan con el supresor del silenciamiento p20 de CTV, y dilucidar si existen diferencias a nivel proteómico en dichas interacciones entre los aislados T36 y T318A de CTV, se procedió a la fusión de la secuencia codificante de ambas p20 con la etiqueta *One-StrEP-tag* en el vector binario pMOG. Tras su expresión

transitoria en planta, se purificaron los complejos proteicos de *N. benthamiana* unidos a p20 a partir de extractos procedentes de las hojas agroinfiltradas mediante cromatografía de afinidad. La matriz de Strep-Tactin contiene estreptavidina que presenta gran afinidad por la *One-STrEP-tag* fusionada a la p20, que a su vez está unida a diversos complejos proteicos de la planta con los que interacciona. Los complejos proteicos se liberaron de la columna pasando un tampón de lavado con desbiotina, que compite con la etiqueta por la unión específica con la estreptavidina, recolectándose 14 fracciones sucesivas. Para determinar las que contenían mayor concentración en complejos proteicos p20-proteínas del huésped, se realizó una hibridación tipo *Western blot* utilizando las distintas fracciones y un anticuerpo frente a la *One-STrEP-tag*. Se identificaron las fracciones 5 a 13 como las de mayor concentración en complejos de proteínas específicos (Figura 3A). Se mezclaron las fracciones de cada versión p20 y se precipitaron para concentrar las proteínas y analizarlas mediante SDS-PAGE (Figura 3B). Se observaron una serie de bandas proteicas, no presentes en los extractos procedentes de la planta control, que contienen los complejos de las proteínas de la planta con posible interacción con p20. Finalmente, con el objetivo de poder identificar dichas proteínas, las bandas del gel se cortaron y digirieron con tripsina para su análisis mediante espectrometría de masas.

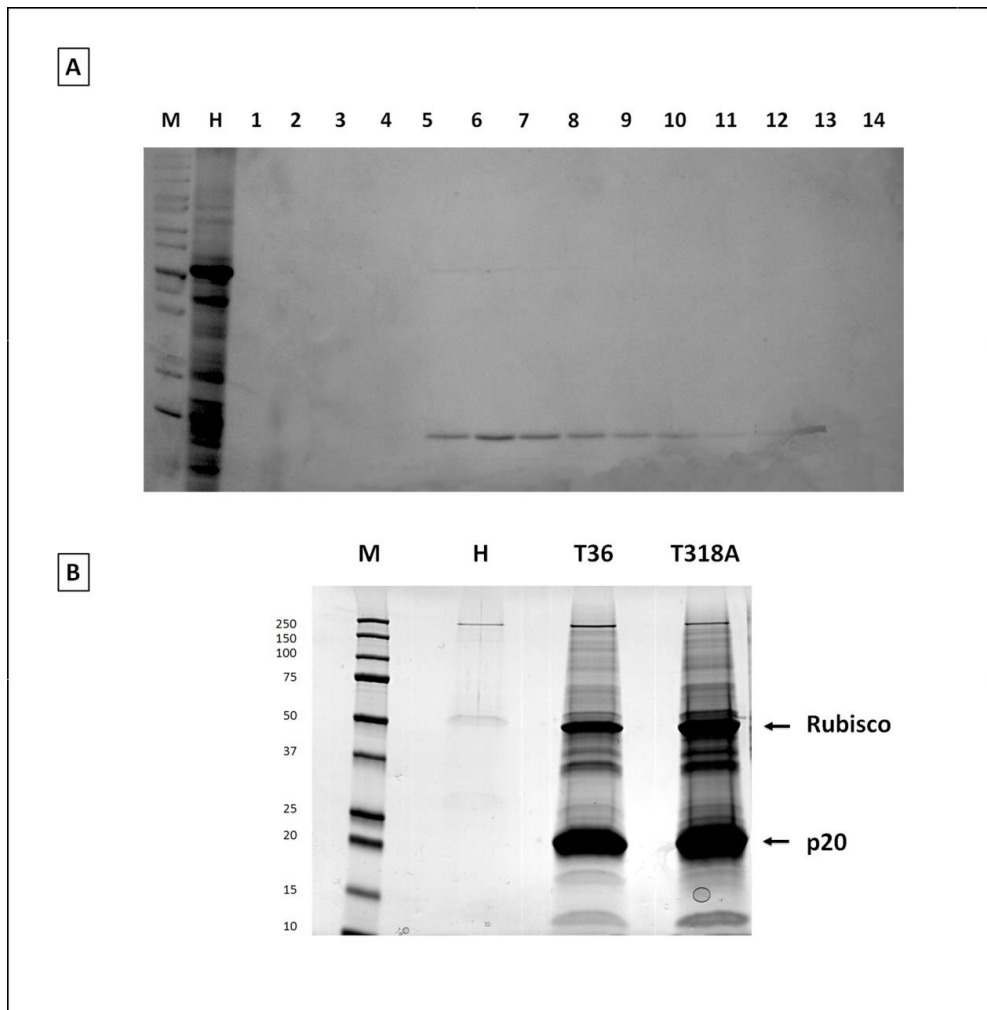


Figura 3: Purificación de los complejos proteicos p20-proteínas del huésped *N. benthamiana*. **A:** Hibridación tipo *Western blot* de las fracciones resultantes de la cromatografía de afinidad del extracto crudo de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción p20T318A-Strep-tag-pMOG. El gel se hibridó con un anticuerpo anti-Strep-tag. Resultado similar para la construcción p20T36-Strep-tag-pMOG (no mostrado). **1-14:** fracciones proteicas analizadas. **B:** Tinción con azul Coomassie del gel desnaturalizante SDS-PAGE de una mezcla de las fracciones 5-13 concentradas antes de su procesamiento para el análisis mediante espectrometría de masas. En ambos paneles: **M:** Marcador de pesos moleculares. **H:** extratos proteicos de la planta control inoculada con la construcción pMOG-tag.

3.1.2. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

El análisis de las proteínas mediante LC/MS-MS y posterior identificación de las mismas con los programas Protein Pilot v4.5 (ABSciex) y Mascot v2.2 (Matrix Science), permitió generar tres listados en bruto [uno para cada versión de p20 (p20-T36 o p20-T318A) y otro para el control pMOG] con un número de acceso Mascot y su correspondiente índice de abundancia (emPAI) (ver material y métodos). De la lista, se eliminaron las proteínas presentes en la muestra control (agroinfiltradas con el vector vacío) y las proteínas expresadas a muy baja concentración (Score inferior a 1).

Con el objetivo de conocer la posible función de las proteínas de *N. benthamiana* obtenidas en este estudio, se identificó la correspondiente proteína ortóloga de *A. thaliana* de función conocida. Para ello, el número de acceso Mascot de los listados proteicos se relacionó con un identificador GenInfo (valor GI) de la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* v 10 (TAIR <https://www.arabidopsis.org/>). Posteriormente, se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada valor GI con la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Finalmente, estas secuencias se utilizaron para realizar un alineamiento (e-valor <0,0001) con las secuencias de *A. thaliana* presentes en la la base de datos *Alignment Search Tool local* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990). De este modo, se obtuvo una lista filtrada con la identificación de las proteínas ortólogas de *A. thaliana*.

3.2. Análisis bioinformático de los complejos proteicos purificados

3.2.1. Agrupación de las proteínas por categorías funcionales

Una vez identificadas las proteínas del huésped que interaccionarían con p20-T36 (188 proteínas), p20-T318A (215 proteínas), p25-T36 (173 proteínas) o p25-T318A (76 proteínas) se llevó a cabo un primer análisis con los programas Panther (<http://pantherdb.org/>) (Figuras 4a y 4b) y REVIGO (Figuras 5a y 5b) con el fin de agrupar las proteínas por categorías funcionales. Las figuras 4b y 5b fueron elaboradas utilizando los datos de p25 obtenidos en la tesis doctoral del Dr. Josep Navarro (2017 y datos no publicados).

- *Componentes estructurales*

Alrededor del 46 % de las proteínas del huésped que potencialmente interaccionarían con p20 de ambos aislados, forman parte de la pared celular. El 25 % de las proteínas de la planta que se unirían a p20-T36 están asociadas a orgánulos celulares, formados mayoritariamente por proteínas del núcleo y del citoesqueleto, mientras que en el caso de p20-T318A estas proteínas representan el 19% del total. El porcentaje de proteínas asociadas a la membrana celular fue mayor para la proteína p20-T318A (19%) que para p20-T36 (8.3%). Por el contrario, el porcentaje correspondiente a complejos macromoleculares fue mayor para p20-T36 (16.7%) que para p20-T318A (10.6%). Ambas p20 parecen presentar muy poca relación con proteínas de la planta situadas en la región extracelular.

La proteína p25 de ambos aislados, al igual que p20, interaccionaría preferentemente con proteínas de la pared celular (55% en el caso de p25-T36 y 45.5% en el de p25-T318A), seguidas de proteínas pertenecientes a orgánulos celulares (28.3% p25-T36 y 36.4% p25-T318A). Al igual que en p20, la posible interacción con complejos macromoleculares parece mayor en p25-T36 (16.7%) que en p25-T318A (9.1%). Los componentes de membrana celular también representan un porcentaje significativo, siendo mayor para p25-T318A (9,1%) que para su homóloga del aislado T36 (3.3%).

- *Procesos biológicos*

La proteína p20 de ambos aislados podría interaccionar con proteínas de distintas rutas involucradas en el metabolismo primario (45.4% de las detectadas para p20-T36 y 50.6% de las de p20-T318A) o en procesos celulares (35.1% para p20-T36 y 24.7% para p20-T318A) como la comunicación celular, la segregación de cromosomas o la división celular, así como con proteínas del huésped involucradas en la localización y el transporte de otras proteínas (8.8% para p20-T36 y 11.2% para p20-T318).

De igual modo, la p25 de ambos aislados interaccionaría mayoritariamente con diversas rutas de metabolismo basal (42.2% de las detectadas para p25-T36 y 39.1% de las de p25-T318A) y con proteínas implicadas en procesos celulares (34.3% para p25-T36 y 30.4% para p25-T318A). Hay destacar que, p25-T36 parece estar implicada en procesos de localización y transporte potencialmente de RNA

nucleares (8.1%), mientras que, su homóloga del aislado T318A parece estar más relacionada con procesos de respuesta a estímulos (13%) y regulación biológica (13%).

- *Función molecular*

Tanto p20 como p25 estarían mayoritariamente relacionadas con proteínas de la planta implicadas en procesos catalíticos, como los procesos de óxido-reducción o actividad transferasa e hidrolasa (51.5% p20-T36, 67.8% p20-T318A, 52.9% p25-T36, 46.2% p25-T318A). De igual modo, ambas proteínas parecen tener un papel importante en la interacción con proteínas de unión, siendo más significativo en el caso de p25-T318A, donde el 38.5% del total de proteínas de la planta, que putativamente interaccionan con ella, presentan dicha función. Como posibles interacciones minoritarias coincidentes para las cuatro proteínas de CTV, podría señalarse la putativa interacción con proteínas de la planta con función estructural o transportadora. Cabe destacar la posible relación de p20-T318A y p25-T36 con proteínas del huésped implicadas en la regulación de la traducción.

- *Función enzimática*

La proteína p25-T318A presentó mayor probabilidad de interacción (33.3%) con proteínas de unión a ácidos nucleicos, porcentaje que fue algo menor para p25-T36 y p20-T36 (20%, para ambas) y significativamente menor para p20-T318A (6.2%). La segunda categoría enzimática más importante fue la relacionada con procesos de óxido-reducción, donde nuevamente p25-T318A podría tener una mayor implicación en estos procesos (10% de las proteínas observadas interaccionarían con p20-T36, 19.2% con p20-T318A, 20% con p25-T318A y 22% con p25-T318A). En menor medida, ambas p20 y p25 presentan posible interacción con proteínas del huésped con actividad hidrolasa, transferasa o isomerasa.

Sin embargo, cabe destacar la pobre red funcional de la proteína p25 del aislado T318A en comparación con las proteínas p20 o p25 de T36. Este hecho ya se observó en los estudios comparativos con su homóloga T36 llevados a cabo por el Dr. Josep Navarro (Tesis doctoral, 2017).

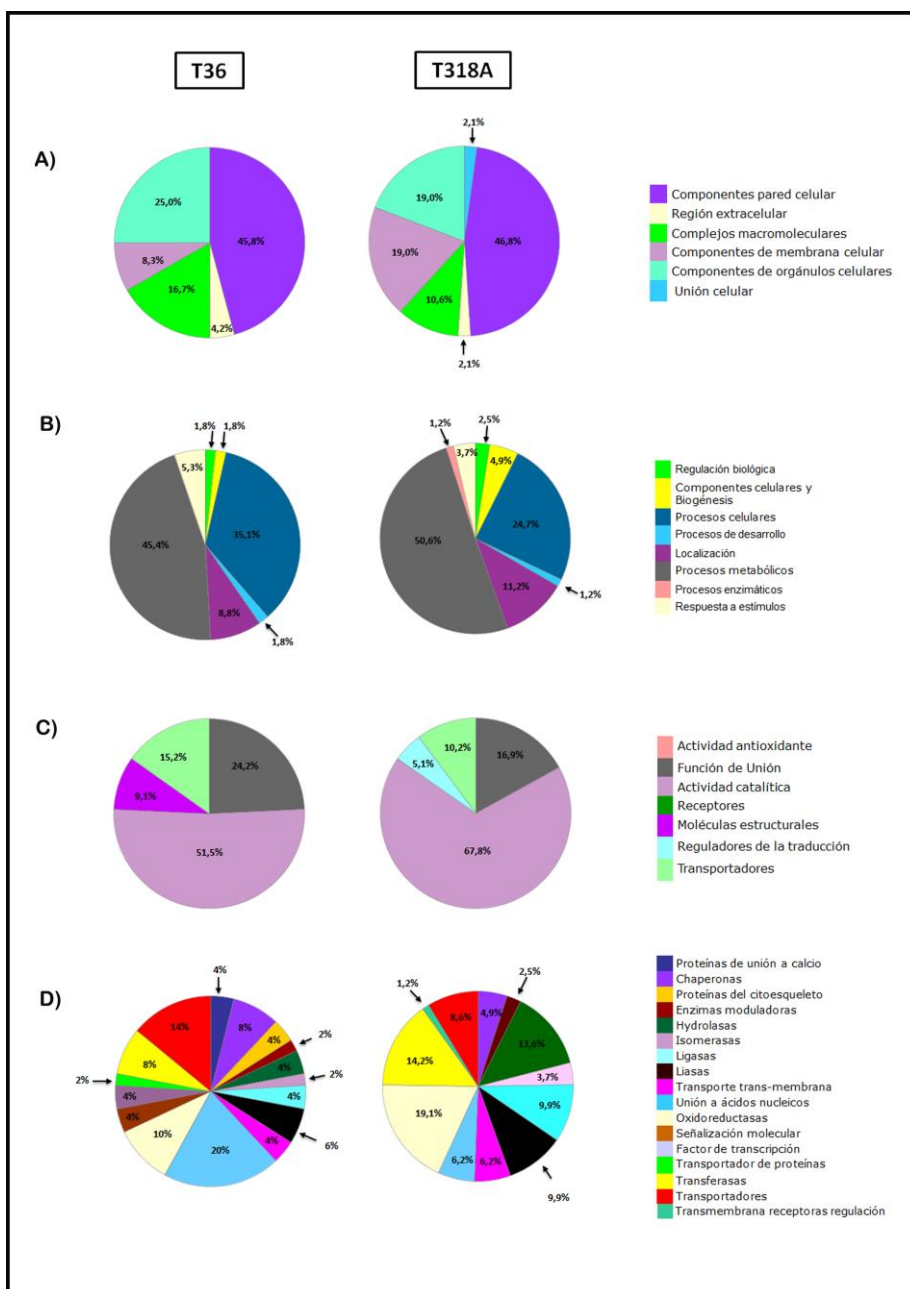


Figura 4a: Clasificación de los complejos proteicos que interactúan con p20-T36 (T36) y p20-T318A (T318A). **A)** Componentes de la célula vegetal. **B)** Procesos biológicos. **C)** Función molecular. **D)** Caracterización enzimática de las proteínas. Obtenida de la base de datos Panther.

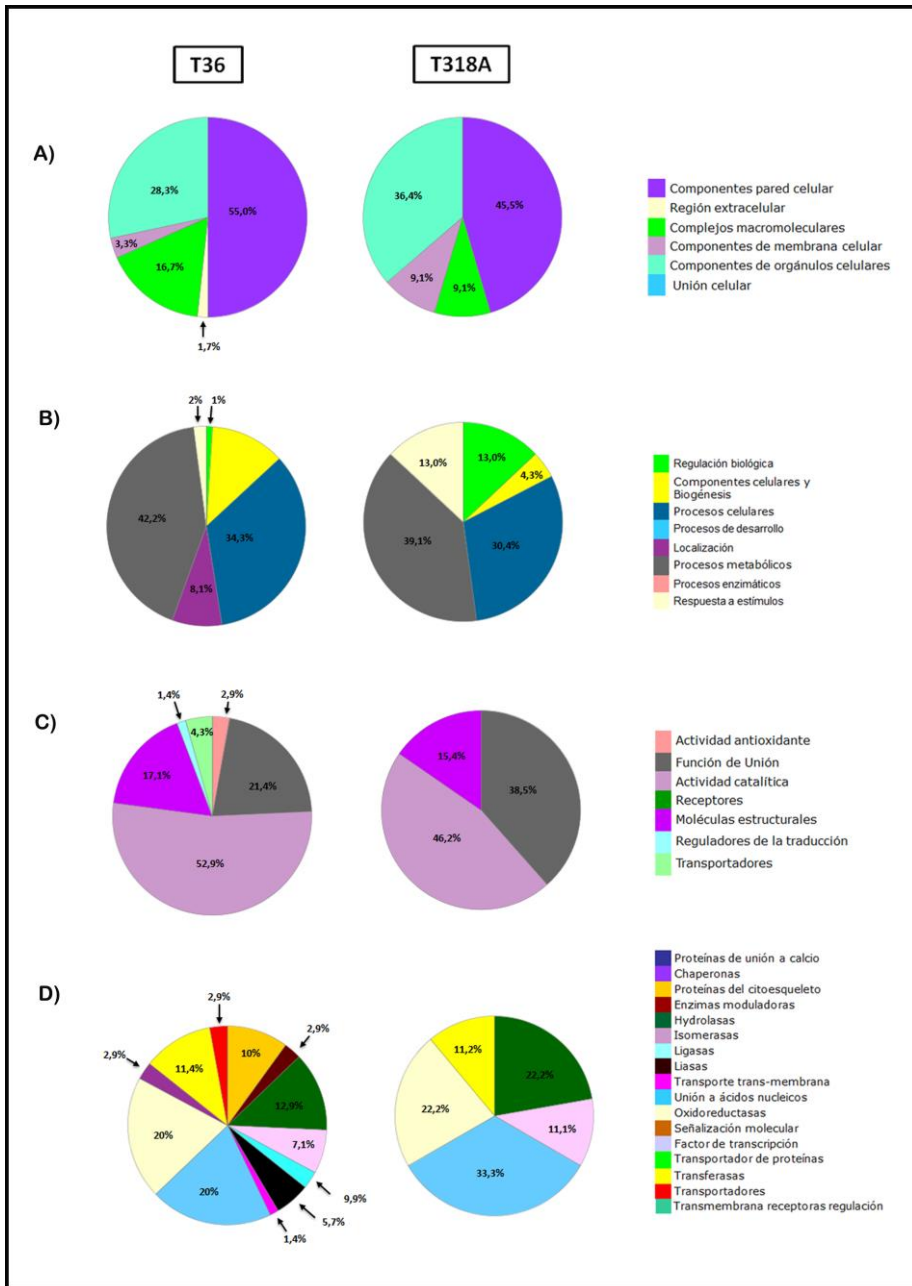


Figura 4b: Clasificación de los complejos proteicos que interactúan con p25-T36 (T36) y p25-T318A (T318A) utilizando la herramienta PANTHER. **A)** Componentes de la célula vegetal. **B)** Procesos biológicos. **C)** Función molecular. **D)** Caracterización enzimática de las proteínas. Obtenida de la base de datos Panther.

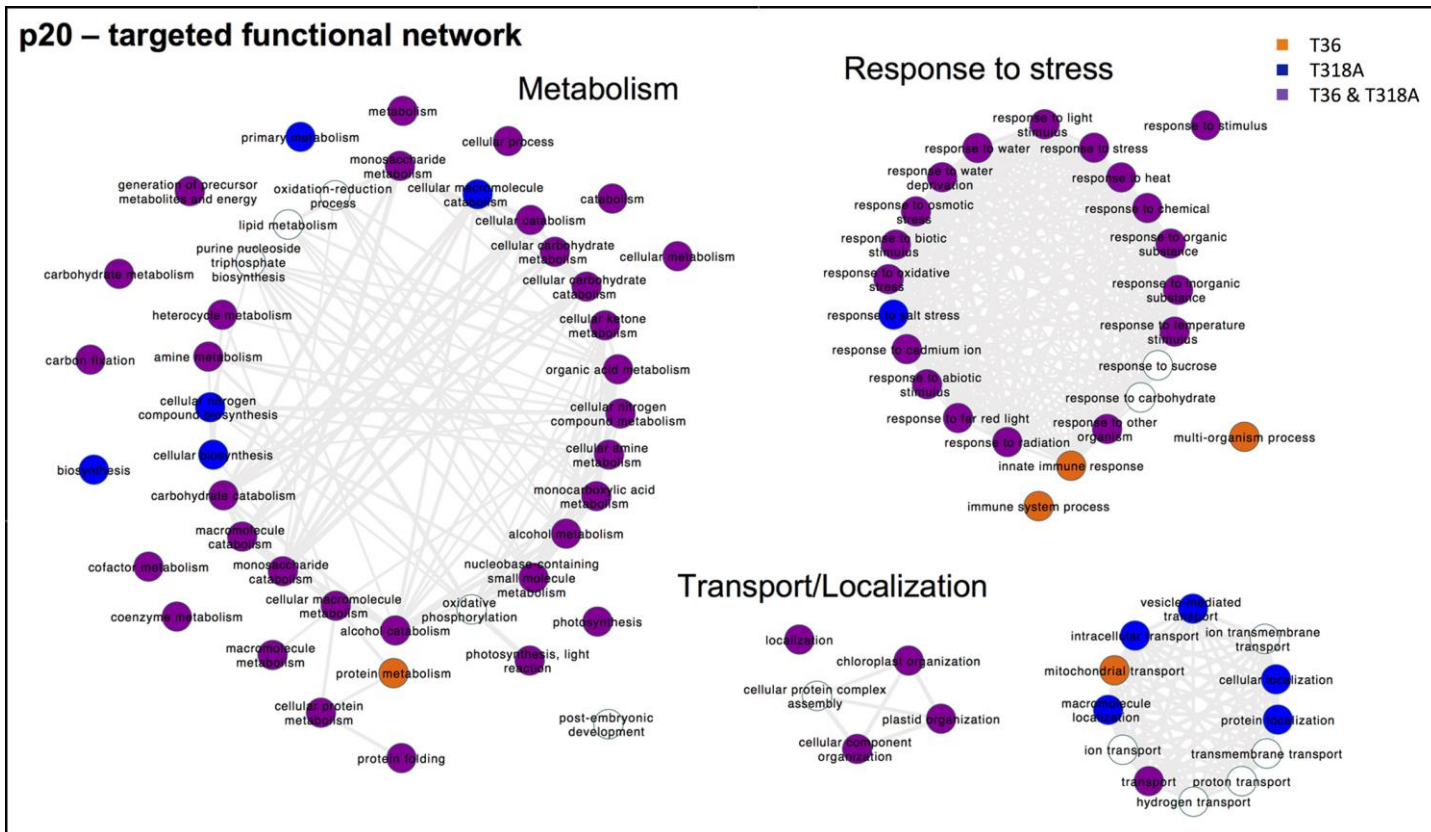


Figura 5a: Clasificación funcional de los complejos proteicos de la planta que interactúan con p20. El color naranja muestra las proteínas de la planta que interactuarían solo con p20 del aislado T36, el color azul las que interactuarían únicamente con p20 del aislado T318A. En cambio, el morado indica posible interacción con p20 de ambos aislados. Realizada con la base de datos REVIGO.

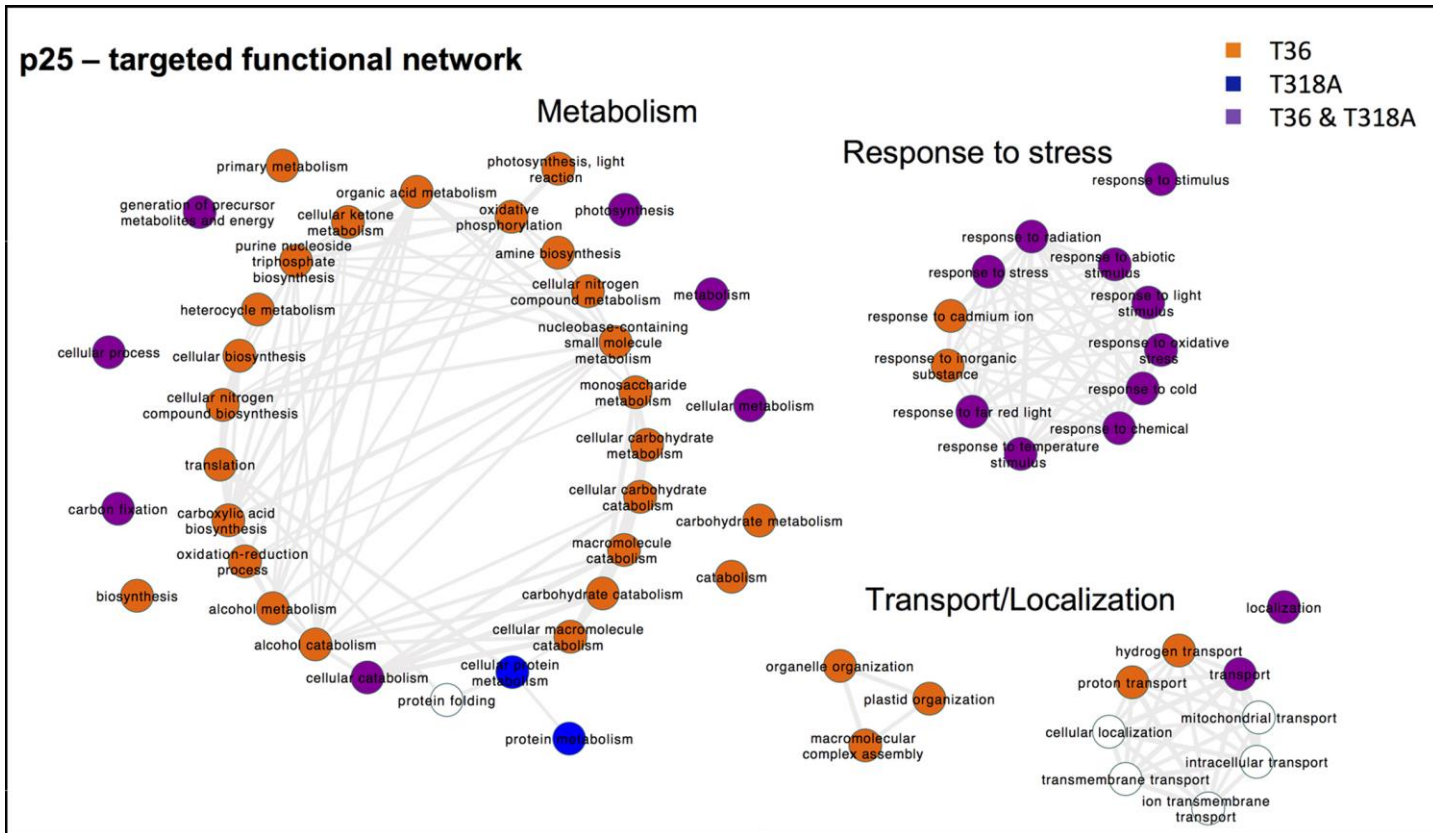


Figura 5b: Clasificación funcional de los complejos proteicos de la planta que interactúan con p25. El color naranja muestra las proteínas de la planta que interactuarían solo con p25 del aislado T36, el color azul las que interactuarían únicamente con p25 del aislado T318A. En cambio, el morado indica posible interacción con p25 de ambos aislados. Realizada con la base de datos REVIGO. Tomada de la tesis doctoral del Dr. J Navarro (2017).

3.2.2. Interacción coincidente entre las proteínas de T36 y T318A y las de *N. benthamiana*

Con el objetivo de analizar las proteínas del huésped que pueden interactuar de forma común o diferencial con las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A, se utilizó la base de datos VENNY 2.1 (Figura 6) y la base de datos REVIGO (Figura 7). De este modo, las proteínas de la planta se agruparon en listados funcionales según la posible interacción con CTV (Anexo, Tablas 1-15).

Las interacciones comunes entre las proteínas de *N. benthamiana* y la proteína p20 de ambos aislados resultaron abundantes, obteniéndose un listado de 62 proteínas con posible interacción coincidente (Figura 6), (Anexo: Tabla 5). Muchas de estas proteínas están relacionadas con la fotosíntesis, el transporte de macromoléculas, la biosíntesis de proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, la unión a ATP, la respuesta a estrés abiótico y el control homeostático de la célula vegetal. Entre estas proteínas cabe destacar la presencia de: i) β -tubulinas, las cuales están relacionadas con la polimerización del citoesqueleto y resultan de gran importancia para el movimiento intracelular de los virus, ii) proteínas relacionadas con la defensa de la planta, como tres tipos diferentes de argonautas (AGO1, AGO2 y AGO4), iii) la chaperona de la CDC48B (proteína de división celular 48C), iv) la subunidad B1 de la proteína de exocitosis EXO-70 (EXO70B1), una proteína relacionada con la respuesta basal y la PCD y v) las proteínas de choque térmico HSC70.1, relacionada con funciones de unión a proteínas y la MTHSC70.2 mitocondrial, implicada en el plegamiento de proteínas en procesos de infección viral.

La lista de interacciones comunes con la proteína p25 de ambos aislados (Anexo: Tabla 6) presenta únicamente 18 proteínas (Figura 6), principalmente implicadas en la fotosíntesis, el catabolismo de carbohidratos y proteínas, la biosíntesis de ácidos grasos y proteínas, reacciones de óxido-reducción, respuesta a estrés, defensa o unión a ácidos nucleicos. Entre las proteínas relacionadas con la defensa de la planta destacan las proteínas de choque térmico HSC70.1 y MTHSC70.2, la proteína de unión al ácido salicílico 3 SABP3 y la Glutathione S-transferasa TAU9.

Es interesante destacar que al comparar las proteínas que interaccionarían con p20 y p25 de ambos aislados se encontraron 25 proteínas coincidentes (Figura 6), (Anexo: Tabla 15). Nuevamente, estas proteínas presentan funciones relacionadas

con la fotosíntesis, unión a proteínas, transporte, reacciones de óxido-reducción, metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés, organización del citoesqueleto y defensa. Respecto a las proteínas relacionadas con la fotosíntesis es de destacar la presencia de la enzima Rubisco y de múltiples subunidades del fotosistema I y II. Entre las proteínas relacionadas con reacciones de óxido-reducción se encontraron distintas subunidades de la gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa, que además de actuar en los procesos catalíticos de la glicólisis, interviene en otros procesos celulares importantes como la activación de la transcripción, procesos de defensa y en fases iniciales de la apoptosis celular. Por último, entre las proteínas relacionadas con la defensa de la planta frente a virus se encontraron la proteína LHCA3, relacionada con la respuesta a citoquininas y las proteínas de choque térmico HSC70.1 y MTHSC70.2.

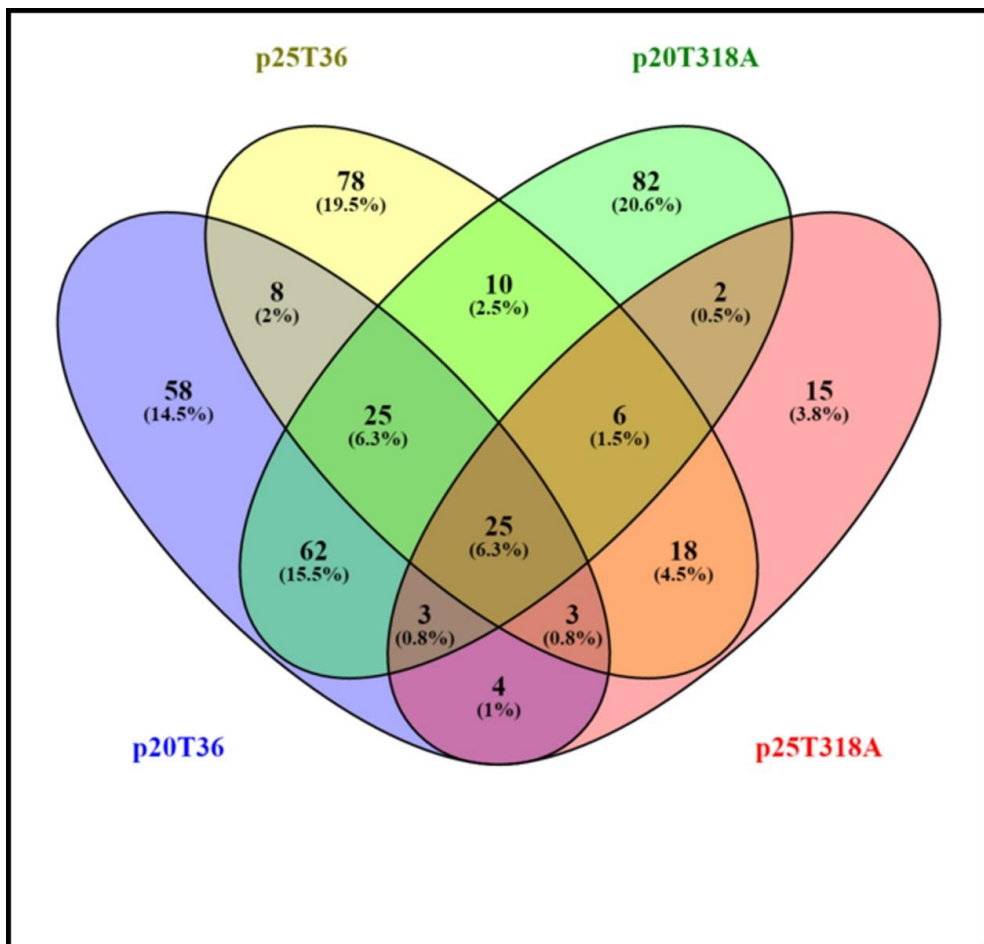


Figura 6: Diagrama de Venn que muestra las proteínas de *N. benthamiana* que

comparten interacción con las proteínas p20 y p25 de ambos aislados. Realizado con la base de datos VENNY 2.1.

3.2.3. Interacción diferencial entre las proteínas de T36 y T318A y las de *N. benthamiana*

Se encontraron diferencias en las proteínas implicadas en la defensa de la planta que interaccionarían con p20 o p25, dependiendo del aislado de CTV. Así, se identificaron una serie de proteínas que potencialmente interaccionan con p20-T36 pero no con su homóloga del aislado T138A (Anexo: Tabla 1). Entre éstas, cabe destacar la glutamato descarboxilasa 1 (GAD1), que regula la síntesis del ácido amino butírico (GABA), relacionado con la respuesta a estrés biótico; la RNA helicasa 20 (RH20) o la RNA helicasa-LIKE 8 (RH8), que intervienen en la defensa de los virus dificultando su replicación; la proteína VDAC2, relacionada con el canal aniónico 2, dependiente de voltaje e implicada en la apoptosis celular bajo condiciones de infección; la proteína CERK1, homóloga de la proteína Bti9 de la planta de tomate, la cual actúa como receptor quinasa portador de un motivo de lisina (LysM, ampliamente conservado en proteínas de defensa), clave en los patrones moleculares asociados a la invasión de patógenos (PAMPs); la proteína SABP3 de unión al ácido salicílico, la cual presenta actividad anti-oxidante y juega un importante papel en la HR y una proteína con dominios NB-ARC (*Nucleotide Binding-adaptor shared by APAF-1, R proteins y CED-4*) muy conservados en proteínas R, relacionadas con el reconocimiento de patógenos y la activación de la respuesta inmune innata.

Por su parte, entre las proteínas que interaccionarían con p20-T318A pero no con p20-T36 (Anexo: Tabla 2) cabe destacar la proteína RPT2A, una ATPasa que regula el mecanismo de defensa del silenciamiento génico mediante la metilación del DNA; la proteína Sinaptotagmina A (SYTA), que regula el movimiento célula a célula en el proceso de infección de diversos virus de plantas; la proteína de división celular 48C (CDC48C), involucrada entre otras funciones en el PTGS, y la proteína LYK4 que presenta un motivo LysM implicado en el mecanismo de señalización y activación de la respuesta inmune innata.

Entre las proteínas con posible interacción con p25-T36, pero no con p25-T318A (Anexo: tabla 3) cabe destacar la Glutathione S-Transferasa TAU8 y la S-Adenosilmetionina sintetasa 2 (SAM-2), ambas involucradas en la respuesta a CKs que regulan la apoptosis celular y la inmunidad frente a patógenos; la enzima S-

adenosil-L-Homocisteína Hydrolasa 1 (SAH1), implicada en la PTGS y la metilación del DNA, y la 2-Cis-Peroxiredoxina B (2-CYS PRX B), una proteína con actividad oxido-reductora implicada en la respuesta de defensa frente a patógenos, fundamentalmente bacterianos. También interactuarían con p25-T36, pero no con p25-T318A, proteínas de la planta asociadas al movimiento de los viriones como son la actina 3 o los factores de despolimerización de la actina 2, 6 y 8 (ADF2, ADF6 y ADF8, respectivamente), así como la subunidad 25 KD del factor de especificidad de poliadenilación/escisión que está implicada en la unión y transporte de determinadas proteínas y mRNA al interior del núcleo celular. Estas posibles interacciones diferenciales entre aislados se describieron en la tesis doctoral de Josep Navarro (2017 y datos no publicados).

Entre las proteínas con función defensiva que interactuarían con p25-T318A pero no con p25-T36 (Anexo: Tabla 4) se encontró la proteína de patogénesis 4 (PR4), muy importante en los procesos de defensa en infecciones cursadas por hongos y la TRX-H9, una de las enzimas relacionadas con la homeóstasis redox que previene el daño celular, además las tioredoxinas tipo h están relacionadas con la reducción de la proteína NPR1 citoplasmática.

Para observar de una forma más gráfica la red de posibles interacciones entre las proteínas de la planta y del virus, se realizó un análisis utilizando la base de datos REVIGO (figura 7), análisis que confirma los datos antes descritos y permite apreciar la interacción diferencial entre los aislados de CTV, sus proteínas y la planta. En esta ilustración gráfica se pueden observar cada una de las proteínas de la planta que potencialmente interactúan con p25 o p20 de un aislado o de ambos y la interacción coincidente entre p20 y p25 de uno o de ambos aislados. Cada círculo de la gráfica simula una proteína de la planta, donde el color naranja representa la posible interacción con el aislado T36, el azul con el aislado T318A y el morado con ambos aislados.

A partir de este análisis se evidencia que las proteínas del huésped que interactuarían exclusivamente con p25 lo hacen principalmente con T36 (parte izquierda Figura 7, donde el color predominante es el naranja), mientras que la proteína de la cápsida (p25) del aislado T318A presenta una red de interacción mucho más pobre, formada por 15 proteínas entre las que se encuentra la TRX-H9 anteriormente comentada. Sin embargo, las proteínas del huésped capaces de interactuar exclusivamente con p20 lo hacen en mayor medida con p20-T318A

(parte derecha de la Figura 7, donde el color predominante es el azul). No obstante, muchas de las proteínas encontradas tienen afinidad por las dos p20, como las proteínas AGO2, AGO4, PDR12 (*Pleitropic drug resistance*), CDC48B o La beta amilasa “low-level” 1 (UFP1) todas ellas directamente implicadas en procesos como el PTGS o la activación de la ruta del AS.

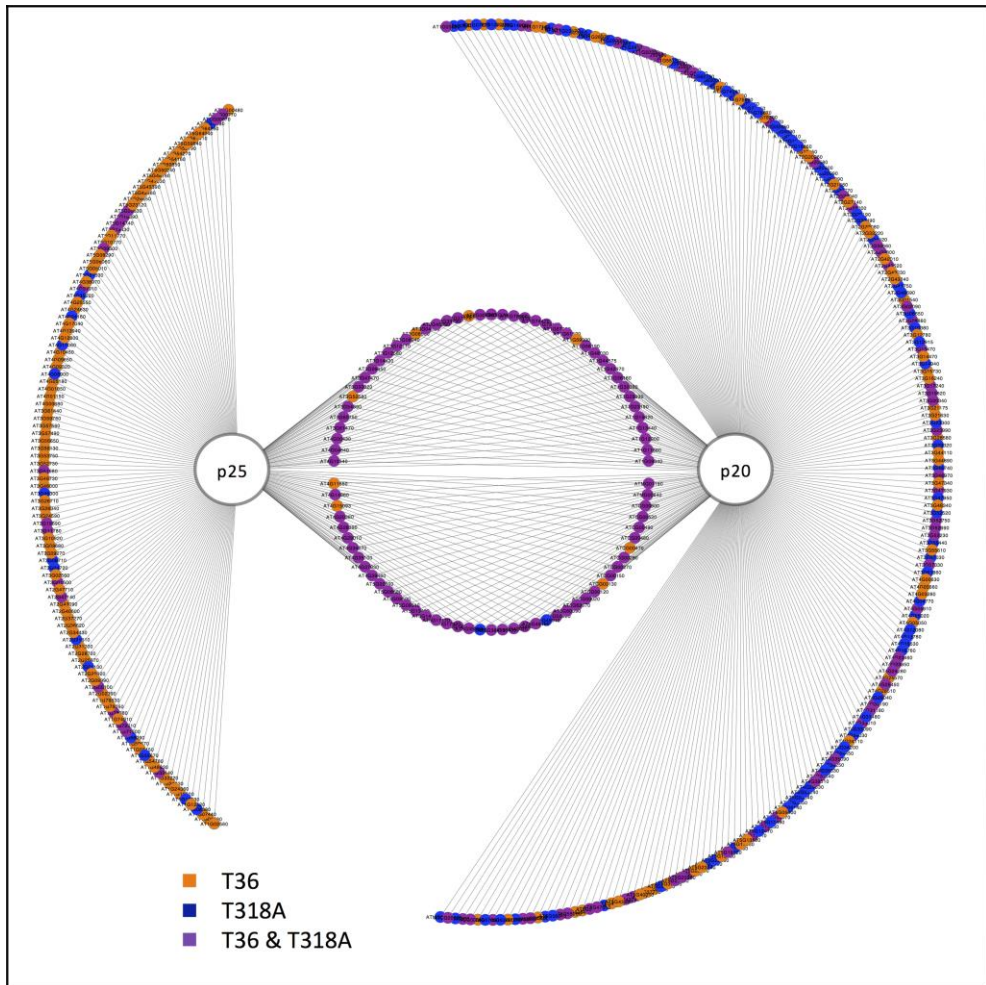


Figura 7: Ilustración gráfica de las proteínas de la planta identificadas por LC/MS-MS que interaccionarían con p20 y/o p25 de los aislados T36 y/o T318A de CTV. Proteínas marcadas en naranja: proteínas del huésped con posible interacción con el aislado T36. Proteínas marcadas en azul: putativa interacción con T318A. Proteínas marcadas en morado: posible interacción con las proteínas de ambos aislados. Cada proteína representada muestra su identificador GenInfo (GI) obtenido de la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* v10. Ilustración realizada con el programa REVIGO.

En el análisis de la interacción coincidente entre las p20 y p25 (parte central de la Figura 7, donde el color predominante es el morado) se determinaron algunas interacciones dependientes del aislado. Así, las proteínas p20 y p25 de T318A mostraron posible interacción específica únicamente con dos proteínas: una proteína de choque térmico cloroplástica (*chloroplast heat shock protein 70-2*, CPHSC70-2) y una proteína ribosomal de la familia S3. Por el contrario, las proteínas p20 y p25 del aislado T36 mostraron posible interacción específica con hasta ocho proteínas de la planta, entre las que cabe destacar una proteína de la membrana plasmática celular, una proteína osmótica y la Deshidrogenasa isocitrato VI.

Para contextualizar el conjunto de proteínas del huésped *N. benthamiana* estudiado, se realizó un análisis computacional de los listados proteicos utilizando el interactoma de *A. thaliana*, el cual cubre alrededor de 8.000 proteínas (AIMC, 2011; Chatr-Aryamontri *et al.*, 2015). Para cada red de interacción entre el interactoma de *A. thaliana* y cada una de las proteínas de CTV se analizaron, mediante el empleo de la herramienta bioinformática Cytoscape, cuatro parámetros: i) grado de conectividad (K), ii) longitud promedio del camino más corto (l), iii) centralidad (b) y iv) coeficiente de agrupamiento o clusterización (c) (ver material y métodos). Este análisis permitió la evaluación cuantitativa de cada una de las redes proteicas que interaccionarían con las proteínas virales dentro del interactoma de *A. thaliana*, cuyos valores fueron representados en diagramas de cajas y analizados estadísticamente mediante el test Mann-Whitney U ($P < 0,05$) (Figura 8).

La ilustración del interactoma de *A. thaliana* y las proteínas de CTV confirma los resultados obtenidos en los análisis anteriores. Así, se observa que la interacción de la planta con p20 se daría preferiblemente con el aislado T318A, sin dejar de ser importante la interacción con ambos aislados. De igual modo, se confirma que la interacción de la planta con la proteína p25 sería más intensa para T36, presentando p25-T318A una red de interacción proteica mucho más pobre. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre las distribuciones de conectividad, centralidad o coeficiente de agrupación. Por el contrario, las diferencias fueron significativas entre las distribuciones de longitud media del camino más corto (Mann-Whitney U-test, $p < 0,001$) para todas las proteínas de CTV. Esto significa que la interacción de CTV con el huésped produciría la

activación o inducción de determinadas rutas metabólicas de la planta de una forma más directa o rápida que el grupo de proteínas control.

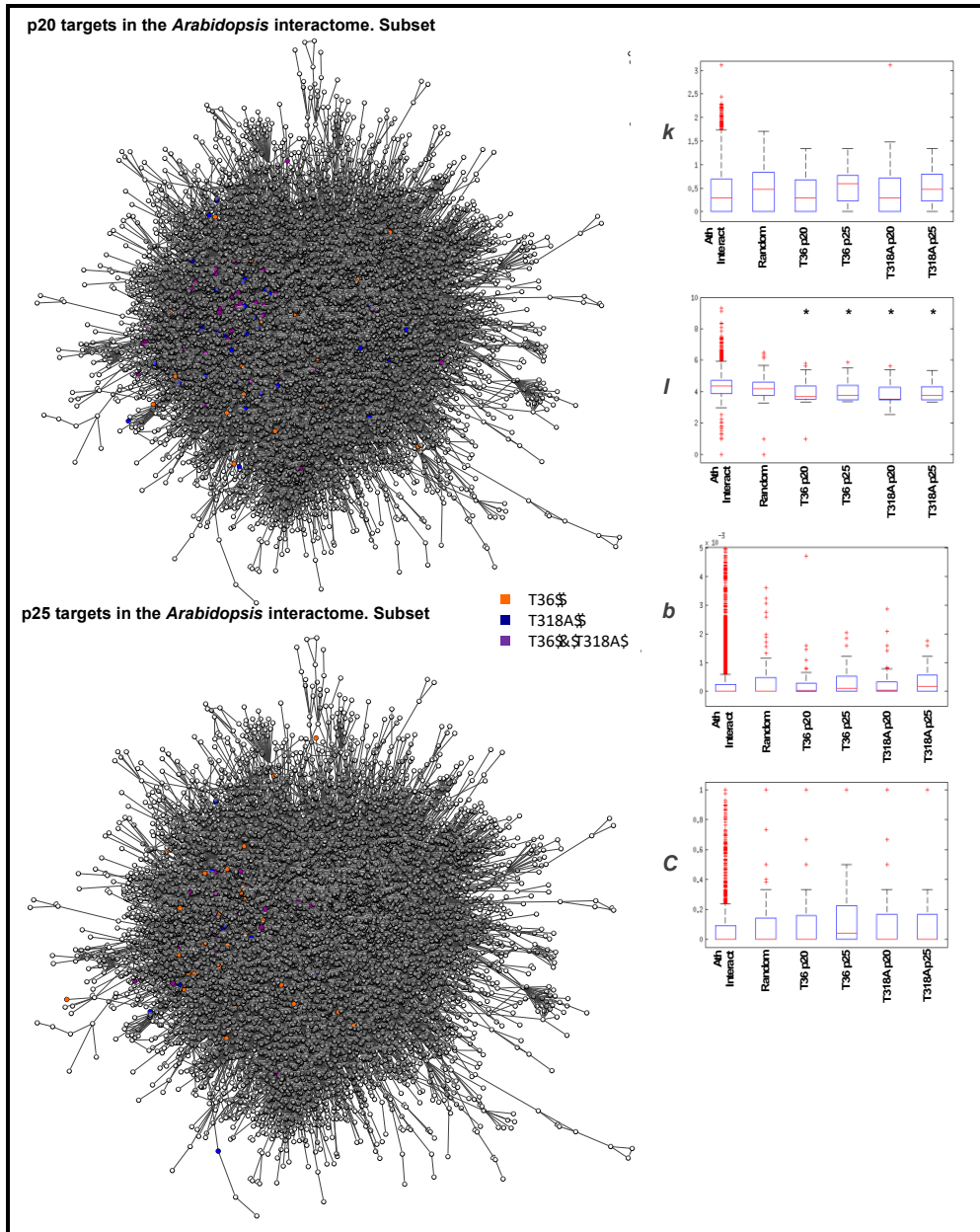


Figura 8: Contextualización de las proteínas diana identificadas por LC/MS-MS en el interactoma experimental de *A. thaliana*. Ilustración del interactoma mundial junto con

diagramas de caja de las propiedades topológicas globales (conectividad (k), longitud promedio del camino más corto (l), centralidad de intermediación (b) y el coeficiente de agrupamiento (c) de las proteínas de CTV). Los colores indican el aislado de CTV (T36 o T318A) con la que se identificó la proteína diana del huésped. El color naranja indica las proteínas que interactuarían con el aislado T36, el azul las que lo harían con el aislado T318A y el morado las que interactuarían con ambos aislados. Como controles, se utilizaron las distribuciones de una muestra aleatoria representativa de todo el interactoma. Análisis realizado mediante el empleo de la herramienta bioinformática Cytoscape.

Con el objetivo de visualizar el mapa de interacción en su conjunto y determinar las proteínas de la planta con mayor probabilidad de interacción directa con CTV, se llevó a cabo la representación de diagramas de dispersión (Figuras 9-12) de los listados principales de interacción de p20-T36, p20-T318A, p25-T36 y p25-T318A. Para ello, se representó la abundancia de transcripción de un perfil medio (Affymetrix) frente a la abundancia de proteína en la muestra purificada (emPAI). Los valores de abundancia se estandarizaron al valor Z generado por el programa Mascot, lo que permitió la identificación de proteínas diana con mayor probabilidad de interacción (región de mayor confianza: parte superior derecha del diagramas de dispersión).

Para diferenciar, *grosso modo*, los procesos metabólicos en los que participan las distintas proteínas de la planta se utilizó un código de colores, en el cual, el azul denota proteínas de la planta que intervienen en procesos metabólicos, fotosíntesis u organización del citoesqueleto; el naranja indica proteínas con diferentes funciones como reacciones oxido-reducción, respuesta a estrés o unión a ácidos nucleicos; el rojo muestra proteínas que están implicadas en rutas de defensa de la planta como PTGS, el AS, AJ o la activación de genes R y el color verde destaca proteínas que presentan una interacción dependiente de aislado.

Estos diagramas confirmaron los resultados obtenidos previamente. Así, en el diagrama de dispersión de p20-T36 (Figura 9) las proteínas que presentan una mayor probabilidad de interacción directa son la Rubisco, Actina 11, HSP70, AGO2, Tubulina 1, Transquelotasa 2 (TKL2) y en menor medida, PDR12, DCD48B, AGO4, UFP1, AGO1, Tubulina 8, HSP90 y CERK1 (homóloga a Bti9), esta última remarcada en verde. En cambio, en el diagrama de dispersión de p20-T318A (Figura 10) no se encontró ninguna proteína de interacción dependiente de aislado y las proteínas más abundantes fueron la Rubisco, HSP70, TKL2, Ubiquitina E3, Tubulina 1, DCD48B, la ATPasa tipo 2 RPTD2A, Actina 11, AGO4, PDR12, TKL1,

mientras que fuera de la región de mayor confianza se situaron las proteínas AGO1 y UFP1.

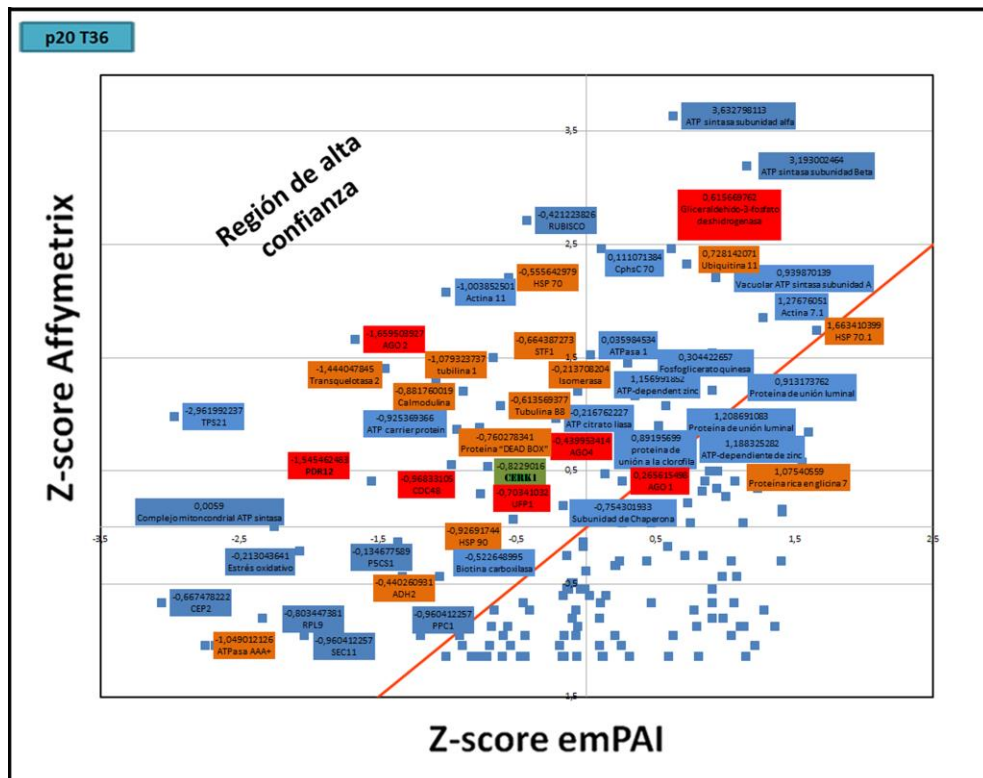


Figura 9: Diagrama de dispersión de las proteínas de la planta que interactúan potencialmente con p20-T36. El valor Z- score Affymetrix representa la abundancia de transcripción de un perfil medio y el Z-score emPAI la abundancia de proteína en la muestra purificada. En azul: rutas metabólicas comunes importantes. En naranja: respuesta a estrés, reacciones oxido-reducción, unión a ácidos nucleicos. En rojo: defensa. En verde: interacción específica de aislado.

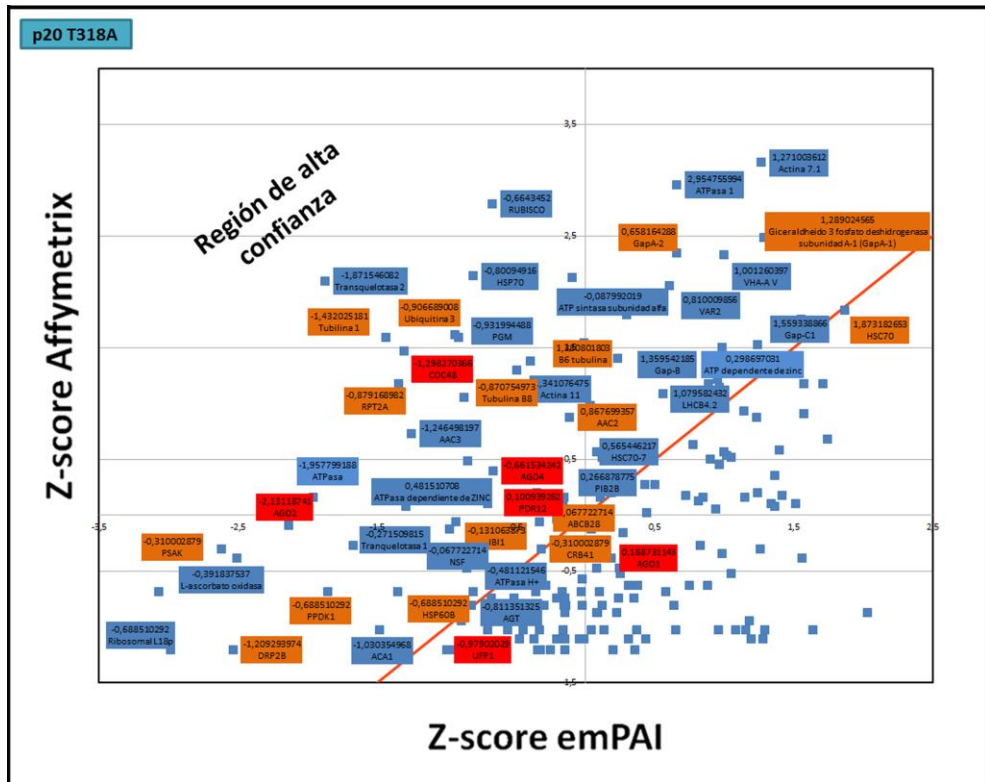


Figura 10: Diagrama de dispersión de las proteínas de la planta que interactúan potencialmente con p20-T318A. El valor Z- score Affymetrix representa la abundancia de transcripción de un perfil medio y el Z-score emPAI la abundancia de proteína en la muestra purificada. En azul: rutas metabólicas comunes importantes. En naranja: respuesta a estrés, reacciones oxido-reducción, unión a ácidos nucleicos. En rojo: defensa.

De la observación del diagrama de dispersión de p25-T36 (Figura 11) las proteínas de mayor abundancia fueron la Rubisco, Gliceraldeido 3-fosfato deshidrogenasas (GapB, GapC, GapA), HSP70, Glicolato oxidasa 1 (GOX1), TKL2 o la rubisco activasa (RCA), proteína que únicamente aparece en T36 y está implicada en la activación de la ruta del AJ. En cambio, el número de proteínas de la planta presentes en el listado de p25-T318A (Figura 12) es significativamente inferior, hecho evidenciado en todos los análisis realizados. De entre las proteínas con mayor probabilidad de interacción directa con p25-T318A, se encuentra nuevamente la Rubisco, HSP70, Deshidrogenasa reductasa de cadena corta 2 y 5 (SDR2 y SDR5), la proteína ribosomal S9, ubiquinol-citocromo C reductasa, transportador ADP/ATP 3 (AAC3),

muestra purificada. En azul: rutas metabólicas comunes. En naranja: respuesta a estrés, reacciones oxido-reducción, unión a ácidos nucleicos. En rojo: defensa. En verde: interacción específica de aislado.

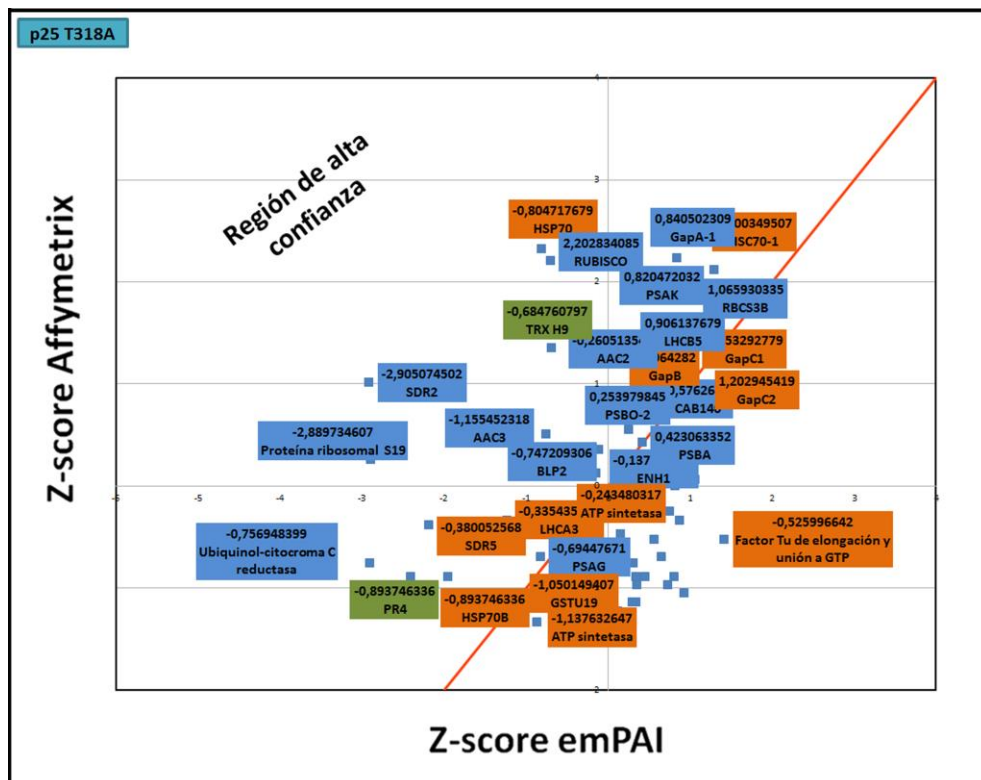


Figura 12: Diagrama de dispersión de las proteínas de la planta que interactúan potencialmente con p25-T318. El valor Z- score Affymetrix representa la abundancia de transcripción de un perfil medio, y el Z-score emPAI la abundancia de proteína en la muestra purificada. En azul: rutas metabólicas comunes. En naranja: respuesta a estrés, reacciones oxido-reducción, unión a ácidos nucleicos. En rojo: defensa. En verde: interacción específica de aislado.

3.3. Estudio de la interacción directa entre las proteínas p20 y p25 de los aislados de CTV T36 y T318A y las proteínas de la planta

Se seleccionaron algunas de las proteínas de mayor interés, dada su abundancia e implicación en rutas metabólicas importantes de la planta, para realizar estudios de interacción directa usando la técnica de doble híbrido en levadura o la de BIFC. Para p20 se seleccionaron las proteínas AGO4, AGO1, AGO2, CDC48B y CERK1 y para p25 se seleccionaron las proteínas AGO4, AGO1 y TRX-H9.

3.3.1. Análisis de la interacción mediante doble híbrido en levadura

Para estudiar la interacción directa *in vitro* de las proteínas p20 o p25 con proteínas de *N. benthamiana* mediante la técnica de doble híbrido en levadura, se realizaron diferentes construcciones en los vectores de expresión pGBKT7-BD y pGADT7-AD. Las proteínas de CTV se fusionaron al factor BD de DNA GAL4 presente en el vector pGBKT7-BD, mientras que las proteínas AGO1, AGO4 y TRX-H9 del huésped se fusionaron al dominio AD de DNA GAL4 presente en el vector pGADT7-AD. La unión de estos dominios es necesaria para la activación de los genes GAL fundamentales para el metabolismo de la galactosa en levadura, por lo que únicamente si se da interacción directa entre las proteínas virus-planta se producirá la unión de ambos dominios y tendrá lugar la transcripción del factor GAL4. Así mismo, la síntesis del aminoácido histidina y el gen *LacZ* se encuentran regulados por el factor de transcripción GAL4.

Las proteínas AGO2, CDC48B y CERK1 no pudieron ser obtenidas mediante RT-PCR y no fue posible llevar a cabo el estudio de su interacción con CTV.

Las construcciones descritas se combinaron para enfrenar cada proteína viral a las diferentes proteínas de la planta, generando así una cepa de *S. cerevisiae* diploide que resultó auxótrofa para los aminoácidos leucina y triptófano y dependiente de la unión de los factores de transcripción BD-AD para la producción del aminoácido histidina y la activación del gen *LacZ*. Estos clones diploides se sembraron en el medio DDO/X que incluye todos los aminoácidos esenciales a excepción de leucina y triptófano. La siembra en este medio permitió el crecimiento de todos los clones en estudio, indicando que éstos contenían las construcciones de ambos plásmidos (pGBKT7-BD-CTV y pGADT7-AD-planta).

Dichos clones se re-sembraron en el medio de cultivo QDO/X/A, que contiene X- α -Gal, todos los aminoácidos esenciales a excepción de leucina, triptófano e histidina y permite el crecimiento exclusivamente de aquellas colonias donde se da la interacción de los dominios del factor de transcripción GAL4, como consecuencia de la interacción específica de la proteína de CTV con la proteína de *N. benthamiana*. Esta interacción permite la síntesis de histidina y expresión del gen *LacZ*, generando coloración azul en las colonias. La siembra de los diferentes clones en este medio únicamente permitió el crecimiento de los clones donde tuvo lugar la interacción entre la proteína AGO4 de la planta y las proteínas p20 y p25 de CTV de ambos aislados (Figuras 14a y 14b).

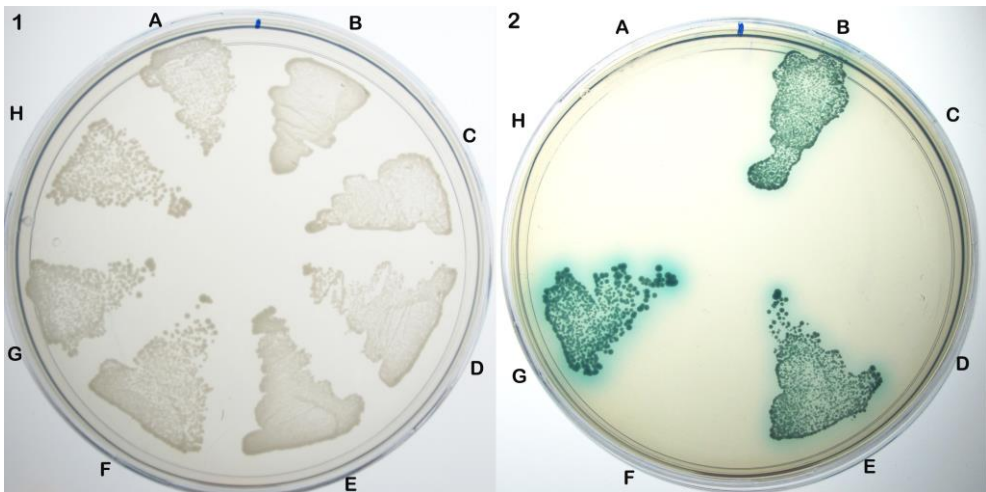


Figura 14a: Estudio de la interacción entre la proteína p20 de CTV y las proteínas de *N. benthamiana* mediante la técnica del doble híbrido de levadura. Crecimiento de clones de *S. cerevisiae* portadores de las diversas construcciones. **1)** Crecimiento en medio DDO/X (Clontech). **2)** Crecimiento en medio QDO/X/A (Clontech). **A:** p20-T318A-AGO1. **B:** p20-T318A-AGO4. **C:** p20-T318A-TRX. **D:** p20-T36-TRX. **E:** p20-T36-AGO4. **F:** p20-T36-AGO1. **G:** Control positivo. **H:** Control negativo.

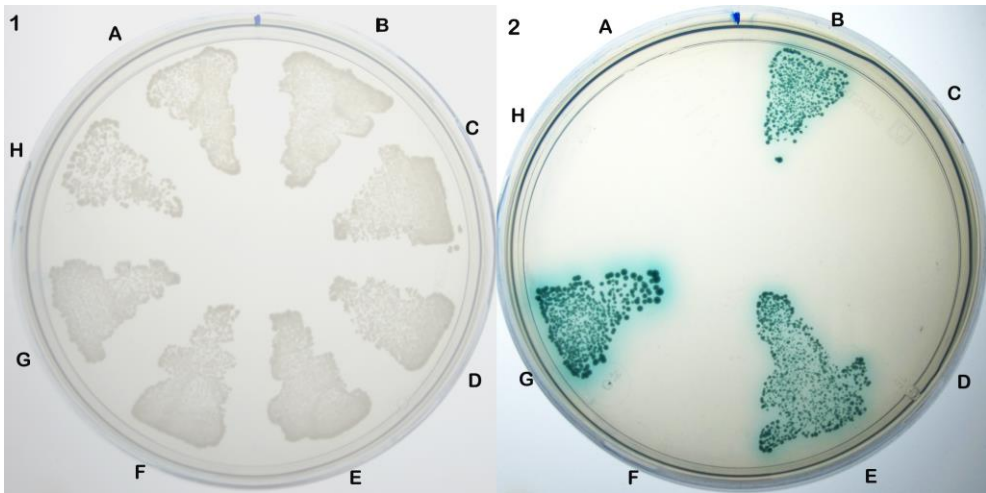


Figura 14b: Estudio de la interacción entre la proteína p25 de CTV y las proteínas de *N. benthamiana* mediante la técnica del doble híbrido de levadura. Crecimiento de clones de *S. cerevisiae* portadores de las diversas construcciones. **1)** Crecimiento en medio DDO/X (Clontech). **2)** Crecimiento en medio QDO/X/A (Clontech). **A:** p25-T318A-AGO1. **B:** p25-T318A-AGO4. **C:** p25-T318A-TRX. **D:** p25-T36-TRX. **E:** p25-T36-AGO4. **F:** p25-T36-AGO1. **G:** Control positivo **H:** Control negativo.

3.3.2. Análisis de la interacción mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC)

Para analizar la interacción directa *in planta* de p20 o p25 con proteínas de *N. benthamiana* mediante BIFC, se clonaron las proteínas de CTV en el vector pSPYNE y las proteínas de la planta en el vector pSPYCE. De este modo, las proteínas de CTV quedaron fusionadas al extremo N-terminal del marcador fluorescente YFP. Mientras que, las proteínas de la planta quedaron fusionadas a la mitad C-terminal de la YFP. Cuando ambas construcciones (CTV-pSPYNE y proteína de la planta-pSPYCE) coinciden en la misma célula y hay interacción específica entre ellas, las dos mitades de la YFP se unen para dar señal fluorescente, detectable mediante microscopía confocal.

Dado que la amplificación del mRNA de AGO2, CDC48B y CERK1 no tuvo éxito, las proteínas de la planta estudiadas fueron AGO1, AGO4 y TRX-H9.

Tras comprobar que las diferentes construcciones no daban señal inespecífica (Figura 13a), se procedió a su análisis. Para ello, cultivos de *A. tumefaciens* portadores de las construcciones problema se mezclaron entre sí siguiendo las combinaciones indicadas en el apartado 2.3.2. de material y métodos. Cada una de estas combinaciones se co-infiltró junto con el supresor de silenciamiento p19 en hojas de *N. benthamiana*. Transcurridas 48-72h se tomaron muestras de hojas agroinfiltradas y se examinaron en el microscopio confocal. Dada la elevada capacidad de interacción de p20 consigo misma se tomó ésta como control positivo de interacción, enfrentando las construcciones p20-T36-pSPYNE y p20-T36-pSPYCE. Su visualización mostró la formación de inclusiones perinucleares y nucleolares, resultado que concuerda con estudios de localización subcelular realizados previamente en nuestro grupo (Josep Navarro, 2017 y datos no publicados).

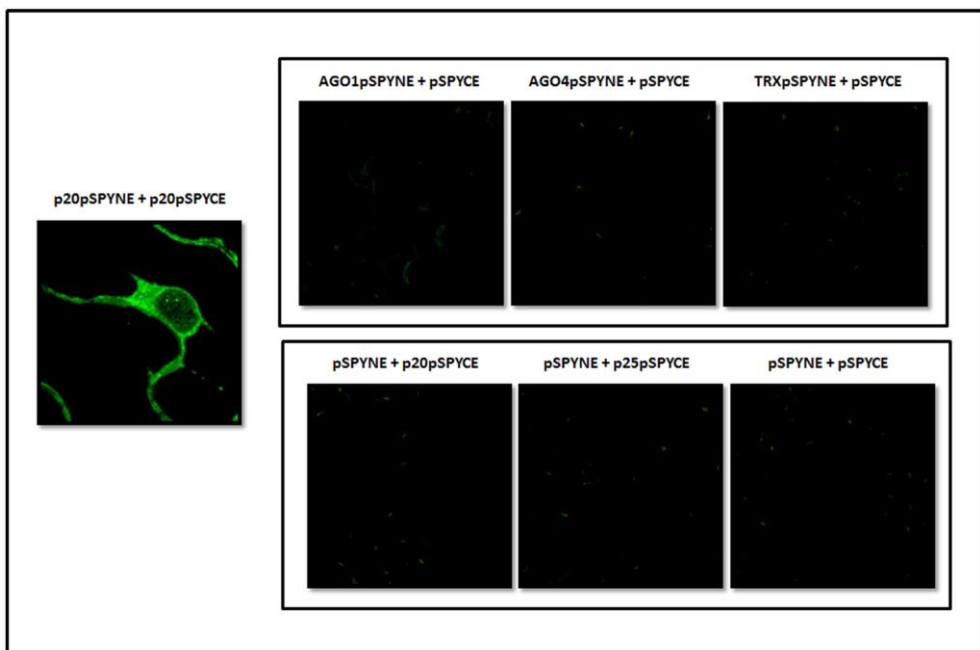


Figura 13a: Representación de las interacciones tomadas como controles positivos (interacción de p20 consigo misma) y negativos (proteínas del virus o de la planta enfrentadas al correspondiente vector vacío) en el estudio de la interacción de las proteínas de *N. benthamiana* y las proteínas de CTV mediante BIFC. Fotografías obtenidas a través de observación con microscopía confocal.

En la figura 13b se aprecia la interacción específica tanto de AGO1 como de AGO4 con p20 y p25 de ambos aislados. En todos los casos la señal YFP se visualizó en las membranas citoplasmática y nuclear, sin observarse diferencias significativas entre aislados. Por el contrario, no se detectó interacción específica de la proteína TRX-H9 de *N. benthamiana* con la proteína p20 de ninguno de los aislados y la interacción entre TRX-H9 y p25 resultó ser dependiente de aislado, pues se observó señal YFP al enfrentar TRX-H9 con p25-T318A pero no con p25-T36 (Figura 13c). La señal YFP observada se localizó en la membrana citoplasmática pero estuvo ausente en la membrana nuclear de las células. La interacción específica de p25-T318A con la proteína TRX-H9 de *N. benthamiana* apoya los resultados previos de localización citoplasmática observados para p25-T318A en contraste con la localización nuclear de su homóloga del aislado T36, que no presenta señal de exportación nuclear (Josep Navarro tesis doctoral 2017 y datos no publicados) ni interacción con TRX-H9.

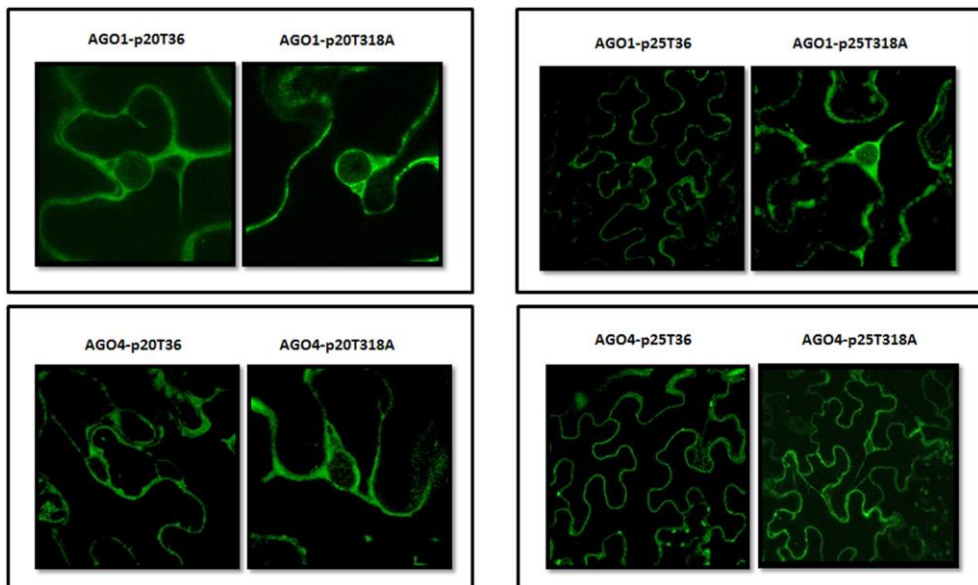


Figura 13b: Análisis de la interacción directa entre las proteínas AGO1 y AGO4 de *N. benthamiana* y las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A de CTV mediante BIFC y observación con microscopía confocal.

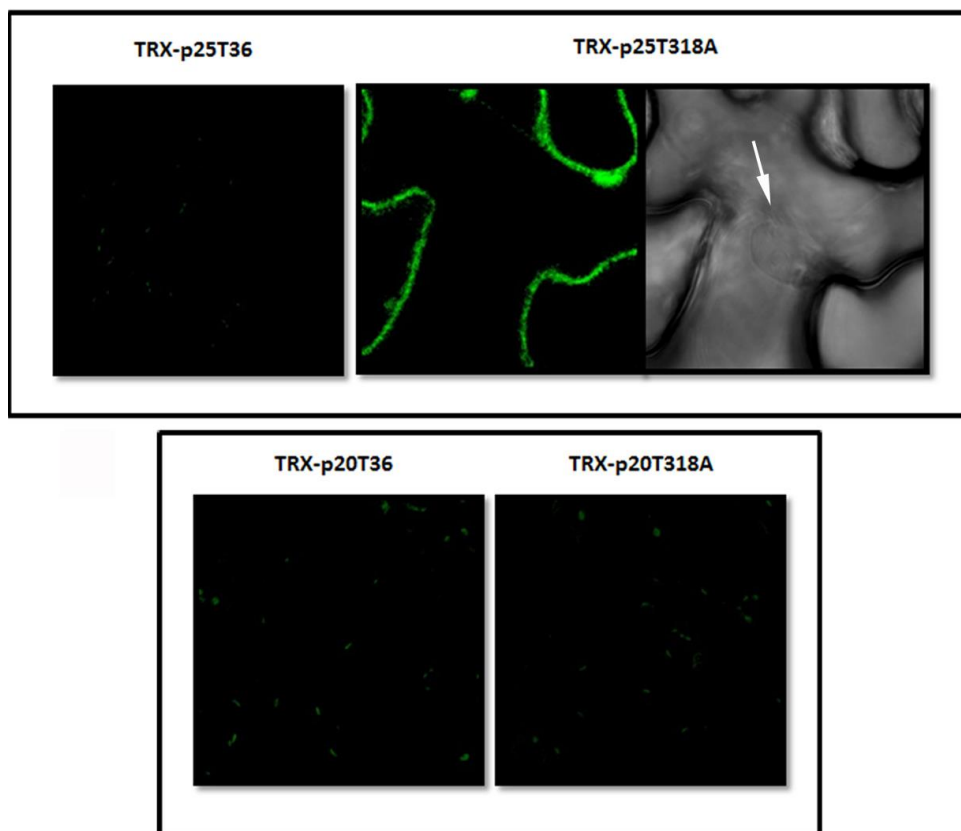


Figura 13c: Análisis de la interacción entre la proteína TRX-H9 (TRX) de *N. benthamiana* y las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A de CTV mediante BIFC y microscopía confocal. La fecha blanca señala el núcleo celular.

4. DISCUSIÓN

Las infecciones virales inducen cambios en el proteoma de la planta como consecuencia de las alteraciones metabólicas inducidas por la multiplicación y el movimiento del virus, así como, por los mecanismos de defensa de la planta frente a dicha infección. Muchas de estas interacciones entre proteínas del virus y el huésped son necesarias para el éxito de la infección sistémica de la planta. Diversos estudios proteómicos realizados en el curso de infecciones virales revelan que la fotosíntesis se ve alterada como consecuencia de una primera respuesta al estrés causada por la invasión del patógeno (Scharte *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2010). Los niveles de las proteínas alteradas únicamente retornan a la normalidad cuando el patógeno cesa su invasión (Monavar-feshani *et al.*, 2012). Diversos trabajos han mostrado que el proceso de infección suele provocar la disminución de proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Di Carli *et al.*, 2010; Nwugo y Huerta, 2011). Sin embargo, estudios proteómicos llevados a cabo con plantas de *Citrus sinensis* infectadas con la bacteria *Xanthomonas axonopodis*, mostraron un aumento de las proteínas relacionadas con la fotosíntesis, sugiriendo que este patógeno es capaz de inducir la expresión de dichas proteínas aumentando la tasa de fotosíntesis en su propio beneficio (Garavaglia *et al.*, 2010). Si bien no se conoce el efecto de la posible interacción indirecta de las enzimas RuBisCO, RuBisCO activasa, así como múltiples subunidades del fotosistema I y II con las proteínas p20 y p25 de CTV. Ésta podría explicar, en parte, los síntomas de aclaramiento de las nerviaduras que muestran algunos huéspedes y los síntomas de SY que algunos aislados inducen en NA o limonero. Aunque la expresión de síntomas se ha relacionado con la acción de p23 (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Soler *et al.*, 2015; Albiach-Martí *et al.*, 2010), algunas observaciones indican que p20 también podría estar implicada en la inducción de estos síntomas. Así, plantas transgénicas que expresan p20 también muestran clorosis en el nervio central (Dawson *et al.*, 2015) y dicha proteína viral actúa como un determinante de patogénesis en *N. benthamiana* del mismo modo que p23 cuando se expresa en el contexto de una infección viral heteróloga (Josep Navarro, tesis doctoral 2017). A pesar de ello, hay que tener en cuenta que este estudio representa una aproximación y algunas de las interacciones entre proteínas virales y el huésped experimental *N. benthamiana* podrían no ser idénticas en su huésped natural.

En relación con las proteínas implicadas en el metabolismo celular, se ha determinado la posible interacción de p20 y/o p25 con enzimas relacionadas con el metabolismo de proteínas y lípidos, así como con enzimas relacionadas con la producción de energía, como ATPasas y proteínas de unión al ATP. Estas mismas proteínas se vieron alteradas en plantas de pomelo y ND infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Dicha alteración resultó beneficiosa favoreciendo el proceso de infección (Nwugo *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2016).

La proteína multifuncional gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es un enzima que actúa como oxido-reductor en la glicólisis, como receptor de señalización celular (Raje *et al.*, 2007) e interviene en numerosos procesos relacionados con la fusión de membrana (Glaser *et al.*, 1995), el dinamismo citoesquelético de la célula (Muronetz *et al.*, 2002), la apoptosis celular (Hara *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2008; Gani *et al.*, 2016), el mantenimiento de la integridad genómica (Sundararaj *et al.*, 2004; Demarse *et al.*, 2009; Nicholls *et al.*, 2012), la replicación y reparación del DNA celular y en la traducción, síntesis y localización del RNA celular (Sirover *et al.*, 1999; 2005; 2011; 2014; Michael *et al.*, 2016), incluyendo el RNA de transferencia o incluso el RNA viral (Zasloff *et al.*, 1983; Carmona *et al.*, 1999). Estudios realizados en *N. benthamiana* mostraron la unión específica de la enzima GAPDH con las cadenas + del RNA viral del virus del mosaico del bambú (*Bamboo mosaic virus*, BaMV). Esta unión impide la síntesis del RNA negativo, deteniendo el proceso de replicación, lo que implica la disminución de la propagación viral y por tanto su función protectora frente a la infección viral (Prasanth *et al.*, 2011). Sin embargo, otros virus como TBSV o el virus de la necrosis del pepino (*Cucumber necrosis virus*, CNV) establecen una relación de cooperación con la enzima GAPDH, la cual secuestra las cadenas negativas del RNA viral en el complejo de replicación y facilita la acumulación de cadenas positivas, incrementando la replicación viral (Wang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). La replicación y acumulación de TBSV y CNV se vieron drásticamente afectadas en plantas de *N. benthamiana* silenciadas para GAPDH, lo que mostró que la inhibición de GAPDH disminuye la acumulación viral. En TBSV se ha observado que dicha proteína celular forma parte del complejo de replicación junto con la chaperona HSP70 y las proteínas virales p33 y p92^{pol} (Wang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). La posible interacción directa o indirecta de GAPDH con p20 y p25 de ambos aislados de CTV podría afectar a la multiplicación de CTV y al éxito de la infección.

La posible interacción de p25-T36 con proteínas del citoesqueleto, como las β -tubulinas, sugiere que p25 podría estar relacionada con el movimiento a corta distancia del virus. Se sabe que la β -tubulina interviene en la formación de los microtúbulos, que son esenciales para el movimiento célula a célula de los virus (Liu y Nelson, 2013). En estudios proteómicos que compararon plantas de cítricos infectadas y no infectadas por CTV se observó un aumento de la expresión de esta proteína en las plantas infectadas (Fujita *et al.*, 2013; Laino *et al.*, 2016). El hecho de que p25-T318A no parezca interactuar con este tipo de proteínas citoesqueléticas de la planta, podría explicar en parte, la falta de movimiento del virus en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con este aislado.

Entre las proteínas con función de unión encontradas en este estudio, cabe destacar la subunidad 25 KD del factor de especificidad de poliadenilación/escisión celular, la cual está implicada en la unión y transporte de proteínas y mRNAs al interior del núcleo celular en plantas de *A. thaliana* (Hunt *et al.*, 2008). Su posible interacción con p25-T36 podría explicar la localización nuclear observada (J. Navarro, 2017) para esta proteína de cubierta.

Se ha encontrado una potencial interacción de p20 de CTV con diversas proteínas relacionadas con la respuesta de defensa de la planta, dándose diferencias importantes según el aislado de CTV. Así, se ha observado la posible interacción de p20-T36, pero no de p20-T318A, con la proteína CERK1 (homóloga de Bti9), la cual presenta un dominio transmembrana que está relacionado con el reconocimiento extracelular de secuencias PAMPs producidas por patógenos (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009a). Estudios *in vitro* de la actividad quinasa de Bti9 han correlacionado su presencia con un aumento de la enzima Glutathione S-Transferasa TAU8, proteína relacionada con la respuesta a estrés y que también presenta posible relación indirecta con p20-T36. Mediante la técnica del doble híbrido en levadura se ha determinado la interacción directa del determinante de patogenicidad AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Pst) y Bti9, interacción que inhibe la actividad quinasa de Bti9 y suprime la defensa basal o PTI (Gómez-Gómez *et al.*, 2001; Abuqamar *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2012). Plantas de *A. thaliana* mutadas *cerk1* y plantas de tomate delecionadas *bti9* mostraron un incremento en la susceptibilidad a la infección por Pst, lo que demuestra que ambas proteínas quitinas juegan un papel importante en el reconocimiento de secuencias PAMPs del patógeno (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2012). Además, en *A. thaliana*, CERK1 es responsable de la detección de proteínas

fúngicas PAMPs necesarias para la inducción de la respuesta PTI. Así, plantas silenciadas para CERK1 mostraron un aumento de la sensibilidad a infecciones cursadas por el hongo *Zymoseptoria tritici*, cuya proteína efectora Mg3LysM interacciona con CERK1 para evadir las defensas PTI de la planta (Lee *et al.*, 2014). Adicionalmente, p20-T36 podría interactuar con la proteína SABP3 de la ruta del AS, cuya carboxilación es necesaria para el desencadenamiento de esta ruta de defensa. La inhibición de dicha carboxilación confiere una regulación negativa de las defensas de la planta (Wang *et al.*, 2009). Plantas de *N. benthamiana* *sabp3*, silenciadas para esta proteína, presentaron una mayor susceptibilidad a la infección cursada por el hongo *Phytophthora infestans* (Restrepo *et al.*, 2005). Estudios previos mostraron que la inhibición de la carboxilación de SABP3 resultó en la inhibición de la respuesta HR en plantas de *N. benthamiana* co-infiltradas con el gen de resistencia *Pto* del tomate y el gen de virulencia de Pst, *avrPto* (Slaymaker *et al.*, 2002). La posible interacción diferencial de p20 con estas proteínas de la planta podría relacionarse con un mecanismo de evasión de las defensas basales de *N. benthamiana* por parte del aislado T36, que no se daría en el aislado T318A.

La enzima glutamato descarboxilasa 1 (GAD1) es dependiente de Ca^{2+} y actúa mayoritariamente en las raíces de las plantas (Zik e *t al.*, 1998) con una función importante en la regulación del GABA frente a procesos de estrés biótico (Bouché *et al.*, 2004). De hecho, en plantas de *N. tabacum* infectadas con *A. tumefaciens*, el GABA modula la señal “quorum-sensing” entre el patógeno y la planta, actuando como una señal entre ambos que puede afectar a la virulencia del patógeno (Chevrot *et al.*, 2006). La posible interacción de la enzima GAD1 en plantas agroinfiltradas exclusivamente con p20-T36, podría indicar la implicación directa o indirecta de dicha proteína en la activación de GABA, y por consiguiente, en una alteración de la resistencia de la planta frente a este aislado de CTV.

Por el contrario, la proteína p20 del aislado T318A podría interactuar con la proteína SYTA. Esta proteína pertenece a una gran familia de proteínas de unión a Ca^{2+} y está descrita como proteína encargada de la sinapsis vesicular en procesos de endo/exocitosis (Chapman, 2008). Mediante doble híbrido en levadura se ha demostrado la unión específica de la proteína SYTA de *A. thaliana* con la proteína de movimiento del virus del rizado de la hoja de la col (*Cabbage leaf curl virus*, CaLCuV), del virus del rizado de la hoja de la calabaza (*Squash leaf curl virus* SqLCV) o de TMV. En plantas de *A. thaliana* mutadas para dicha proteína, se

observó una reducción en la acumulación viral en infecciones cursadas por estos virus, indicando que SYTA regula el movimiento del virus célula a célula. Las proteínas de movimiento de los virus facilitan su transporte hasta los plasmodesmos para el traspaso a las células vecinas aprovechándose de la vía de reciclaje endocítico mediada por SYTA (Lewis *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2015); alteran la permeabilidad de los plasmodesmos, forman parte de los complejos canales trans-membrana que regulan la comunicación célula-célula y coordinan la replicación y transporte de los genomas virales (Uchiyama *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2011). La proteína SYTA es necesaria para formar los sitios de unión entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática en los plasmodesmos, necesarios para que las proteínas de movimiento virales se acumulen en los plasmodesmos. De este modo, SYTA regula el tráfico de las proteínas de movimiento de los virus TMV, CaLCuV, el virus del mosaico de nabo (*Turnip mosaic virus* TuMV) y el virus del aclaramiento de las nerviaciones del nabo (*Turnip vein clearing virus*, TVCV) y es necesaria para que TuMV, CaLCuV y TVCV infecten *A. thaliana* (Lewis *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2015). Adicionalmente, la proteína de división celular CDC48 de *A. thaliana* se induce en infecciones causadas por TMV e interactúa con las proteínas de movimiento viral presentes en las inclusiones del retículo endoplasmático, promoviendo la conexión de las proteínas de movimiento con los microtúbulos de los plasmodesmos (Niehl *et al.*, 2012). La posible interacción de estas proteínas de la planta con p20-T318A refuerza su implicación como proteína de movimiento, algo sugerido previamente en plantas de cítricos (Tatineni, 2008). Su alteración podría explicar, en parte, el déficit de movimiento celular del aislado T318A observado en el huésped *N. benthamiana*. Por otro lado, esta proteína viral podría estar relacionada con la proteína LYK4, receptor quinasa rico en motivos LysM, el cual juega un papel importante en el reconocimiento de secuencias PAMPs (como la quitina) y en la respuesta inmune innata en plantas de *A. thaliana* infectadas con Pst y el hongo *Alternaria brassicicola* (Wan *et al.*, 2012).

Entre las proteínas que potencialmente interaccionarían con p25 de T36 pero no con p25-T318A, se encuentran diferentes factores del citoesqueleto celular, como los factores de despolimerización de la actina, ADF2, 6 y 8 que favorecen el movimiento viral célula a célula y su entrada en el floema de la planta, proceso necesario para la infección sistémica. De igual modo, esta proteína viral podría estar implicada en la regulación de las rutas de señalización dependientes de ROS, en el mantenimiento de la homeostasis redox, como la proteína 2-Cis-

Peroxiredoxina B (Cerveau *et al.*, 2016), en la regulación de CKs que controlan la respuesta inmune o en la interacción con enzimas relacionadas con el silenciamiento post-transcripcional y la metilación del DNA, como la proteína SAH1 (Mull *et al.*, 2006). Esto, podría explicar en parte, que T36 produzca una infección sistémica en *N.benthamiana* a diferencia de T318A.

Entre las interacciones específicas de p25 del aislado T318A, hay que destacar las proteínas PR4 y TRX-H9. La primera, se ha descrito como una proteína con fuerte actividad antifúngica y se ha observado el aumento de su mRNA en infecciones causadas por TCV (Bertini *et al.*, 2012). Por otra parte, las tioredoxinas participan en numerosas reacciones redox de la célula. Concretamente, las enzimas TRX tipo h regulan la degradación de la proteína NPR1 en el citoplasma (Tada *et al.*, 2008) y más específicamente TRX-H9, participa en: i) la regulación de la homeóstasis redox esencial para prevenir el daño celular y ii) en el crecimiento y desarrollo celular (Wu *et al.*, 2016). En plantas de pimiento, las tioredoxinas tipo h intervienen en los mecanismos de defensa frente a la infección por CMV (Luna-Rivero *et al.*, 2016). Mientras que en plantas de *A. thaliana*, TRX-H9 se ha relacionado con la comunicación entre células mediante la movilización de señales redox para prevenir el daño oxidativo (Meng *et al.*, 2010). Por otro lado, las tioredoxinas tipo h se han descrito en *E. coli* como proteínas necesarias para el ensamblaje de los fagos filamentosos fl y M13 (Russel y Model, 1985). La sobreexpresión de tioredoxinas tipo h en plantas de *N. tabaccum* confiere resistencia frente a la infección por TMV y CMV, los cuales ven reducida su multiplicación y patogenicidad (Sun *et al.*, 2010). La interacción directa de la TRX-H9 con p25-T318A, demostrada mediante BIFC en este trabajo, explicaría su localización citoplasmática, relaciona directamente a p25-T318A con estas rutas de defensa y podría explicar la falta de infectividad de *N. benthamiana*, observada en este aislado, como consecuencia del desencadenamiento de diferentes estrategias de defensa de la planta.

El PTGS es un mecanismo de defensa muy específico y versátil frente a las infecciones inducidas por múltiples virus de RNA (Ding *et al.*, 2013). Las principales enzimas implicadas en el silenciamiento antiviral son las enzimas DCL, las proteínas AGO y las polimerasas RDR. Las DCL están encargadas de degradar las moléculas de dsRNA y producir los siRNAs. Las proteínas AGO1 y AGO2 están asociadas con siRNAs de 21 y 22 nt, mientras que AGO4 lo está con siRNAs de 24 nt (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Alvarado *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006;

Csorba *et al.*, 2010). AGO1 está implicada en la defensa frente a CMV (Morel *et al.*, 2002), TCV (Qu *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010) y frente a BMV (Dzianott *et al.*, 2012). AGO2 está implicada en la defensa frente a TCV (Harvey *et al.*, 2011), PVX (Jaubert *et al.*, 2011), CMV (Zhang *et al.*, 2012; Harvey *et al.*, 2011) y TuMV (Zhang *et al.*, 2012). Mientras que AGO4 está implicada en la defensa frente a CMV mediada por el silenciamiento transcripcional (TGS) (Hamera *et al.*, 2012; 2016). Finalmente, las polimerasas RDR amplifican los productos resultantes del complejo RISC, aumentando la señal de silenciamiento. No obstante, la mayoría de los virus codifican una o más proteínas supresoras del silenciamiento como mecanismo de contra-defensa. Así, la proteína supresora 2b de CMV inhibe la acción de AGO1 (Zhang *et al.*, 2006) y se une al complejo AGO4 + siRNA alterando su acción (Hamera *et al.*, 2012) y las proteínas p0 de Polerovirus y p25 de PVX interaccionan directamente con AGO1, AGO2 y AGO4, provocando su degradación mediante el sistema UPS (Bortolamiol *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2010). El supresor de silenciamiento HCPro de TuMV actúa secuestrando los siRNAs virales, lo que imposibilita su integración en el complejo RISC y en consecuencia, la degradación del gRNA por las proteínas AGO (García-Ruiz *et al.*, 2015). Además, se han descrito diferentes determinantes de patogenicidad y/o proteínas de movimiento viral con capacidad supresora (Li y Ding, 2006) directa o indirecta. Así, se ha descrito la proteína de cubierta de ToRSV (Karran y Sanfacon, 2014), proteínas implicadas en el movimiento del virus a larga distancia, como la p38 de carmovirus y p19 de tombusvirus, que interceptan las moléculas de siRNA de 21 nt (Díaz-Pendón y Ding, 2008) o la proteína de movimiento TGBp3 del virus PVX. Esta última, induce el incremento de la proteína celular SKP1 (proteína de la familia E3 ubiquitin ligasa) y facilita la degradación de AGO1, a su vez unida a la proteína supresora TGBp1 del virus, lo que sugiere que ambas proteínas virales actuarían conjuntamente para regular las defensas de la planta, aumentando su susceptibilidad ante la infección viral (Ye *et al.*, 2011). La interacción directa de AGO1 y AGO4 con las proteínas p20 y p25 de ambos aislados de CTV, demostrada en este estudio mediante BIFC y en el caso de AGO4 también mediante doble híbrido, refuerza el papel crucial que juegan estas proteínas en la superación de las defensas de la planta como supresores del PTGS.

La extensa red de proteínas de la planta con capacidad de interacción directa o indirecta con p20 y/o p25 de CTV, que participan en numerosas rutas metabólicas como la fotosíntesis, la organización citoesquelética o las defensas de la planta frente a una invasión viral: i) muestran la capacidad multifuncional de p20 y p25

de ambos aislados, ii) corroboran el papel de ambas proteínas en la defensa de la planta como supresores del silenciamiento post-transcripcional a corta y/o larga distancia, previamente descrito (Lu *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2007) y iii) sugieren su implicación como posibles proteínas de movimiento, especialmente la de p25-T36 en *N. benthamiana* y la de ambas p20. Así mismo, las interacciones proteína-proteína diferenciales entre ambos aislados y la planta abren el camino al entendimiento de la sintomatología específica inducida por de cada aislado en *N. benthamiana* y en su huésped natural.

La reducida red de interacción observada para p25-T318A con factores de la planta, respecto al observado para el resto de proteínas virales estudiadas, así como, la detección de determinadas interacciones que pueden relacionarse con infecciones incompatibles virus-huésped, podría explicar la incapacidad de dicho aislado para inducir infección sistémica en *N. benthamiana*.

CAPÍTULO 3: IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO POST-TRANSCRIPCIONAL EN LA DEFENSA DEL NARANJO AMARGO FRENTE A LA INFECCIÓN POR CTV.

Adaptado del artículo:

Gómez-Muñoz N, Velázquez K, Vives MC, Ruiz-Ruiz S, Pina JA, Flores R, Moreno P, Guerri J (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*, doi: 10.1111/mpp.12488. [Epub ahead of print]

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos causa importantes enfermedades en los cítricos a nivel mundial, incluyendo el decaimiento de árboles propagados sobre NA, SY en pomelo y NA de semilla, y SP en diferentes variedades de cítricos (Dawson *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2008). El decaimiento de variedades de ND, pomelo y mandarino, propagadas sobre NA, ha provocado la pérdida de alrededor de 100 millones de árboles y ha forzado en los países afectados el desarrollo de una nueva citricultura basada en el uso de patrones tolerantes al decaimiento (Moreno y Garnsey, 2010), a pesar que el NA presenta excelentes cualidades agronómicas como son la adaptación a la mayoría de los tipos de suelo, la capacidad de inducir frutos de alta calidad y la tolerancia a muchos factores abióticos y bióticos, cualidades que no presentan los nuevos patrones (Lee y Keremane, 2013; Moreno y Garnsey, 2010).

En campo, las plantas propagadas sobre NA infectadas con CTV, suelen presentar necrosis en los tubos cribosos por debajo de la línea de unión entre el patrón y el injerto. Esta mala unión desencadena en el patrón una reducción del floema funcional que limita el aporte de carbohidratos a las raíces. Este hecho conduce a la muerte de las raíces secundarias, lo cual provoca un aporte insuficiente de agua y sales minerales a la parte aérea de la planta y favorece la aparición de los síntomas de decaimiento (Schneider, 1959). Sin embargo, la necrosis del floema no se observa en plantas de NA de semilla infectadas con CTV o en plantas propagadas sobre patrones tolerantes al decaimiento. Por otra parte, algunos aislados avirulentos de CTV, como el aislado de origen español T385, no inducen decaimiento de las variedades propagadas sobre el patrón NA (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Vives *et al.*, 1999).

Los desórdenes observados en la unión entre el injerto y el patrón NA podrían ser consecuencia de la activación de los mecanismos de defensa del NA para prevenir o retrasar la invasión y acumulación de CTV. Existen evidencias indirectas de la resistencia del NA frente a la infección cursada por CTV. Así, i) la carga viral observada en huéspedes susceptibles a CTV como el ND o la LM alcanza su máximo en la primera brotación después de la inoculación, mientras que en el NA esta carga aumenta progresivamente a lo largo de varios meses tras la infección (Comellas, 2009), ii) la distribución de CTV en NA es irregular y presenta una acumulación menor en comparación con los huéspedes susceptibles (Comellas,

2009; Folimonova *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007), iii) la inoculación de plantas de NA con una construcción del aislado T36 de CTV que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) reveló que el virus presenta un movimiento célula a célula deficiente (Folimonova *et al.*, 2008) y iv) la expresión ectópica de la proteína supresora del silenciamiento p23 en plantas transgénicas de NA produjo un incremento en la acumulación del aislado de CTV T36 (Fagoaga *et al.*, 2011). Además, la acumulación viral y su distribución entre la parte aérea y las raíces del NA pueden diferir entre aislados de CTV (Comellas, 2009; Harper *et al.*, 2014).

En general, la acumulación y el movimiento de los virus en sus huéspedes están restringidos por la activación de mecanismos de defensa como las rutas del AS y del PTGS. El AS es una hormona de la planta que puede ser inducida por diversos patógenos, incluidos los virus. Esta fitohormona es necesaria para la activación de las defensas basales, incluyendo la ETI y la SAR. La acumulación de AS en interacciones incompatibles patógeno-planta desencadena la ETI y la PCD, que impide la invasión de otros tejidos por el patógeno. El aumento de AS también se ha observado en interacciones compatibles patógeno-planta, en las que no se producen los síntomas de necrosis celular (Fu and Dong, 2013; Mandani and Scholthof, 2013). Así mismo, la sobre-expresión de los genes de biosíntesis del AS o tratamientos directos con AS sobre plantas de *N. benthamiana* aumentan su resistencia frente a infecciones víricas (Lee *et al.*, 2011; White, 1979). Por el contrario, la expresión en plantas transgénicas de la enzima bacteriana salicilato hidroxilasa, que hidroliza el AS, compromete la defensa de la planta (Baebler *et al.*, 2014; Jovel *et al.*, 2011). El gen *NPR1* es el regulador por excelencia de la ruta de señalización del AS (Dong, 2004). En diversos trabajos, se ha descrito que plantas mutantes *npr1* (deficientes en la expresión de NPR1) presentan comprometida su resistencia frente a patógenos, mientras que las plantas mutantes *npr3-npr4* (ambos parálogos de *npr1*), que codifican dos proteínas receptoras del AS involucradas en la degradación de la proteína NPR1, presentan esta resistencia basal aumentada (Fu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006). Del mismo modo, mutantes *npr3-npr4* de *A. thaliana* son incapaces de inducir una PCD en infecciones causadas por el patógeno *Pseudomonas syringae* (Zheng *et al.*, 2012).

Otro mecanismo importante de defensa de la planta frente a virus es el de PTGS. Como se ha indicado en la introducción general, este proceso se desencadena por la presencia de moléculas de dsRNA. Éstas son digeridas por ribonucleasas DCL que producen siRNAs de 21-24 nt, lo cuales se incorporan al complejo RISC que

contiene ribonucleasas tipo AGO y dirige la digestión de RNAs homólogos a estos siRNAs. A su vez, los siRNAs pueden ser utilizados como cebadores en la síntesis de nuevas moléculas de dsRNA mediante la acción de RDRs. Estas nuevas moléculas de dsRNA serán digeridas por DCLs produciendo la acumulación de siRNAs secundarios y amplificando así la señal de silenciamiento (Baulcombe, 2004).

Existen diversas polimerasas RDR, entre las que se encuentra la RDR1 que está involucrada en la resistencia a virus mediada tanto por la ruta del AS como por la de PTGS (Alamillo *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2013). Se ha descrito que la expresión del gen *RDR1* aumenta en LM tras la infección por CTV (Gandía *et al.*, 2007) y que la producción de los siRNAs de 21 y 22 nt está mediada por la expresión de los genes *DCL2* y *DCL4* (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Estos siRNAs son los más abundantes en plantas de cítricos infectadas con CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011).

Como contra-defensa, los virus de plantas codifican una serie de proteínas que actúan como supresores del PTGS (Csorba, 2015) o de la ruta de señalización del AS (Laird *et al.*, 2013) con el fin de vencer los mecanismo de defensa de la planta y progresar en la infección. En el caso de CTV, como se ha comentado anteriormente, las proteínas p20, p23 y p25 actúan como supresores del PTGS a corta y/o a larga distancia (Lu *et al.*, 2004).

Una estrategia muy atractiva, utilizada durante los últimos años para la determinación de la función génica, es el uso de VIGS. Esta tecnología, se basa en el PTGS para silenciar genes de interés de la planta y estudiar su función mediante genética reversa. Para ello, se emplea el genoma de un virus como vector donde insertar los genes (o fragmentos de genes) de interés de la planta. Tras la inoculación de las construcciones víricas en la planta, el procesamiento del dsRNA viral por las enzimas DCL da lugar a siRNAs que guían la degradación tanto del virus como de los mRNAs del gen o conjunto de genes homólogos a la secuencia insertada en el vector. De este modo, la planta muestra un fenotipo de pérdida de función de los genes en estudio. (Burch-Smith *et al.*, 2004; Senthil-Kumar y Mysore, 2011). El uso de vectores virales presenta ventajas frente a la mutagénesis o transformación genética, como la posibilidad de estudiar la función de muchos genes en un corto periodo de tiempo. Este hecho es muy importante en cítricos ya que estos presentan largos períodos juveniles (6-8 años) y la

transformación genética de cítricos adultos es muy complicada (Cervera *et al.*, 2008).

Anteriormente, en el laboratorio se desarrollaron varios vectores virales basados en el genoma completo de CLBV (Agüero *et al.*, 2012, 2014). CLBV pertenece a la familia *Betaflexiviridae* y es la especie tipo del género *Citivirus*. Sus viriones presentan una morfología filamentososa, con una longitud media de 960 nm y un diámetro de 14 nm. Están formados por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva, de 8.747 nt, organizada en tres ORFs y dos extremos UTRs de 73 y 541 nt. La ORF 1 se expresa a partir del gRNA y codifica una poliproteína requerida para la replicación del virus, mientras que las ORFs 2 y 3 se expresan a través de sgRNAs que codifican las proteínas de movimiento y de cubierta, respectivamente (Renovell *et al.*, 2010, Vives *et al.*, 2001, 2002). Los vectores virales desarrollados se han utilizado para la sobre-expresión de un gen concreto de la planta, la expresión de un gen foráneo o para el estudio de la función de genes de la planta mediante genética reversa (Agüero *et al.*, 2012, 2014; Velázquez *et al.*, 2016).

La recuperación del uso del patrón NA sería del máximo interés para la citricultura española, dada su superioridad agronómica en comparación con los actuales patrones tolerantes. Sin embargo, dado el carácter endémico de CTV en la mayoría de las zonas cítricas españolas, esto requeriría el desarrollo de técnicas capaces de reducir o evitar el decaimiento y muerte de las plantas propagadas sobre NA. El conocimiento del mecanismo molecular de la resistencia del NA frente a la infección por CTV es un paso previo imprescindible para el desarrollo de estas técnicas. Con el fin de avanzar en este conocimiento, se estableció como objetivo para el tercer capítulo de esta tesis analizar la implicación de las rutas del PTGS o de señalización del AS en la defensa del NA frente a la infección por CTV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Utilización de VIGS con un vector viral basado en el genoma completo de CLBV para analizar la implicación de las rutas del AS y el PTGS en la defensa del NA frente a CTV

2.1.1. Obtención de los vectores virales basados en el genoma de CLBV

Para estudiar la función de los genes *RDR1*, *NPR1*, *NPR3*, *NPR4*, *DCL2* y *DCL4* en la defensa del NA frente a CTV mediante genética reversa, se obtuvieron los genes ortólogos de cítricos correspondientes a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas *RDR1*, *NPR1*, *NPR3*, *NPR4*, *DCL2* y *DCL4* de *A. thaliana* usando la base de datos Phytozome 9.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.htm>) y un alineamiento entre secuencias mediante BLASTX. La identidad nucleotídica entre las secuencias de *A. thaliana* y *C. sinensis* fue del 66 % para *RDR1*, del 67% para *NPR1*, del 73 % para *NPR3*, del 72 % para *NPR4*, del 67 % para *DCL2* y del 88 % para *DCL4*, con una región solapante (query cover) del 93, 54, 8, 40, 89 y 73% respectivamente.

Los diferentes fragmentos de los genes de cítricos *RDR1* (GenBank [102608479](#)), *NPR1* (GenBank [102617188](#)), *NPR3* (GenBank [102621158](#)), *NPR4* (GenBank [102622086](#)), *DCL2* (GenBank [102617691](#)) y *DCL4* (GenBank [102621372](#)) se amplificaron mediante RT-PCR a partir de extractos de RNA_t de ND. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo con la enzima *Pfu* DNA polymerase (PROMEGA) y los cebadores *RDR1F-RDR1R*, *NPR1F-NPR1R*, *NPR3F-NPR3R*, *NPR4F-NPR4R*, *DCL2F-DCL2R* y *DCL4F-DCL4R* (Tabla 1) para amplificar fragmentos de 280 (*RDR1*), 240 (*NPR1*), 171 (*NPR3*), 134 (*NPR4*), 142 (*DCL2*) y 178 pb (*DCL4*), respectivamente. El programa térmico incluyó una etapa de retro-transcripción de 30 min a 48°C seguida de una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, 5 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 65°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. En el caso de las parejas de genes *NPR3-NPR4* y *DCL2-DCL4*, se amplificó por separado cada fragmento génico, posteriormente se fusionaron en tandem los dos elementos de cada pareja mediante ligación con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) y se amplificaron los fragmentos fusionados mediante PCR con la enzima *Pfu* DNA polymerase y los iniciadores externos *NPR3F-NPR4R* o *DCL2F-DCL4R* siguiendo un programa térmico similar al descrito anteriormente. Así se obtuvieron los

fragmentos NPR3-NPR4 de 305 pb y DCL2-DCL4 de 320 pb, respectivamente. Todas las reacciones se llevaron a cabo con cebadores fosforilados.

Para la clonación de los distintos fragmentos se utilizó el vector viral *clbv3'*. Este vector se obtuvo modificando el clon infeccioso CLBV-IC previamente descrito (Vives *et al.*, 2008a), que contiene la secuencia completa de cDNA del gRNA de CLBV clonado en el vector binario pBIN19, entre la secuencia duplicada del promotor 35S de CaMV y el NOS-T. Este plásmido se mutó para introducir un único sitio de restricción *PmlI* entre el codón de parada del gen de la CP y la 3'UTR, generando el vector *clbv3'* (Agüero *et al.*, 2012). Los distintos fragmentos foráneos RDR1, NPR1, NPR3-NPR4 y DCL2-DCL4 se clonaron en el vector *clbv3'*, previamente digerido con *PmlI* y defosforilado siguiendo técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Las construcciones *clbv3'*-RDR1, *clbv3'*-NPR1, *clbv3'*-NPR3-4 y *clbv3'*-DCL2-4 generadas (Figura 1) se confirmaron por secuenciación. Cada una se utilizó para transformar células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa COR 308 (amablemente cedida por la Dra. C.M. Hamilton, Cornell Research Foundation) portadora del plásmido pCH32 que contiene copias extra de los genes de virulencia *virG* y *virE*.

2.1.2. Agroinfiltración de *N. benthamiana* con las construcciones derivadas de *clbv3'* e inoculación en cítricos de los viriones producidos

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de materiales y métodos del capítulo 1, se agroinfiltraron 6 plantas de *N. benthamiana* con cada una de las construcciones *clbv3'*-RDR1, *clbv3'*-NPR1, *clbv3'*-NPR3-4 y *clbv3'*-DCL2-4, utilizando como control el vector *clbv3'* vacío.

Transcurridos 28 dpi, se realizó la semi-purificación de viriones de cada construcción. Para ello, todas las hojas y tallos de las 6 plantas de *N. benthamiana* se pulverizaron con N₂ líquido y el polvo se homogenizó en un tampón 50 mM Tris-HCl, 0,1% de ácido ascórbico y 0,2% de cisteína a pH 6,5. La mezcla se incubó 30 min en hielo con una agitación suave, se filtró a través de varias capas de muselina y el extracto bruto se clarificó mediante centrifugación durante 10 min a 4.000 g, 10 min a 6.000 g y 10 min a 10.000 g, a 4 °C, con la finalidad de eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó durante 1,5 h a 225.000 g y el precipitado resultante se re-suspendió en tampón 50 mM Tris-HCl con 20% de

sacarosa. Estas preparaciones, que contenían los viriones semi-purificados de las correspondientes construcciones derivadas de *clbv3'* o del control *clbv3'* (*wild type* CLB, WT-CLB), se inocularon mecánicamente en plantas de limonero rugoso mediante la utilización de un escalpelo, siguiendo el protocolo previamente descrito (Garnsey *et al.*, 1977). Tras la detección de CLB mediante RT-PCR, dichas plantas se utilizaron como fuente para inocular por injerto plantas de NA de semilla o de patrón limonero rugoso utilizado para propagar yemas de NA.

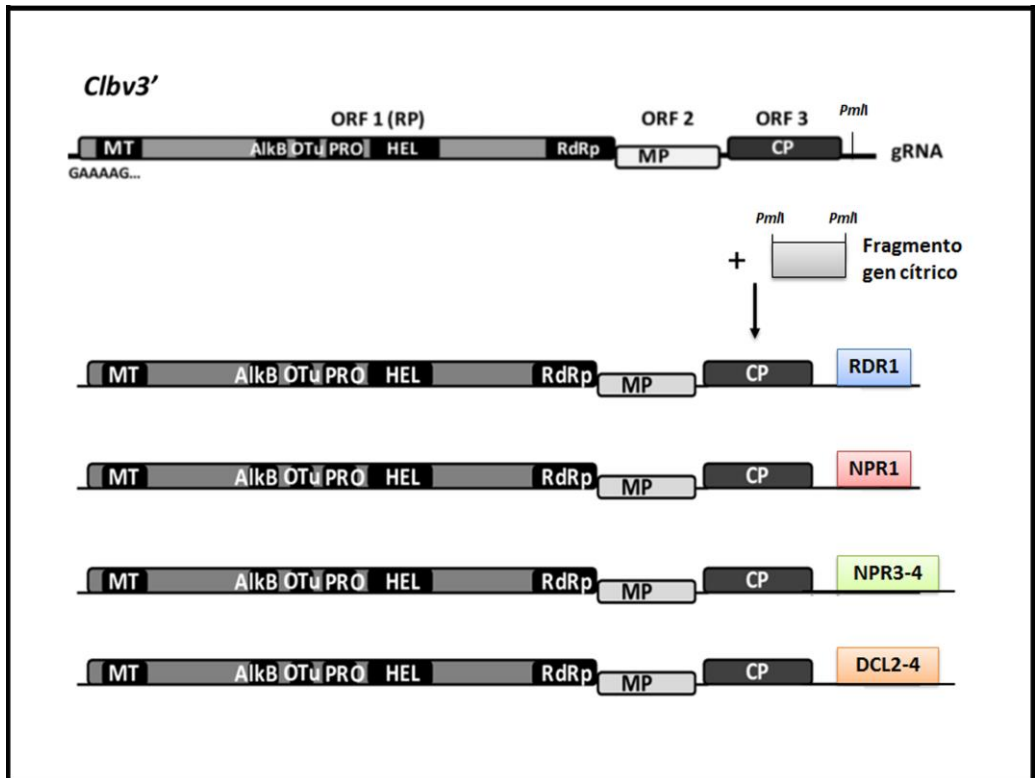


Figura 1: Esquema de los vectores utilizados en VIGS. Los rectángulos representan las ORFs y en su interior se indican los dominios que codifican: RP, replicasa; MT, metiltransferasa; AlkB y OTu, peptidasas del tipo AlkB y OTu; PRO, proteasa; HEL, helicasa; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; MP, proteína de movimiento; CP, proteína de cápsida. Los rectángulos de color representan los fragmentos de los genes *RDR1*, *NPR1*, *NPR3-4* y *DCL2-4* de cítricos clonados en el sitio único *PmlI* del vector viral *clbv3'*.

Se realizaron 2 experimentos diferentes. En el primero, se inocularon 15 plantas de NA de semilla con cada una de las construcciones *clbv3`-RDR1*, *clbv3`-NPR1*, *clbv3`-NPR3-4* y *clbv3`-DCL2-4*, así como con el control *clbv3`* (WT CLBV). Transcurrido un mes, 5 plantas de NA inoculadas con cada una de las construcciones derivadas de *clbv3`* o con el control y 5 plantas de NA sanas, se inocularon con el aislado T36-GFP, el aislado virulento T318A (GenBank DQ151548) o el aislado asintomático T385 de CTV (GenBank Y18420). En el segundo experimento, se propagaron yemas de NA sobre 5 plantas de limonero rugoso que simultáneamente se inocularon con viriones derivados de cada una de las construcciones *clbv3`-RDR1*, *clbv3`-NPR1* y *clbv3`-DCL2-4* o del control *clbv3`* y con el aislado de CTV T36-GFP. Por otra parte, se propagó NA sobre 10 plantas de limonero rugoso simultáneamente inoculadas con la construcción *clbv3`-NPR3-4*. Cinco de estas plantas se inocularon con el aislado T36-GFP y otras 5 con el aislado T318A de CTV.

Durante el desarrollo de los experimentos, los cítricos se mantuvieron en invernadero a 18/26°C (día/noche) y se cultivaron en macetas de plástico de 2 L con una mezcla de 50% de arena y 50 % de turba y se fertilizaron siguiendo un procedimiento estándar (Arregui *et al.*, 1982).

2.2. Estudio de los síntomas y distribución viral en plantas de NA infectadas con distintos aislados de CTV

El crecimiento de las plantas de NA de semilla se comparó midiendo la longitud de los brotes y el peso de corteza y raíces secundarias en la primera y segunda brotación (3 y 6 meses post-inoculación, aproximadamente), mientras que en las plantas de NA propagado sobre limonero rugoso se analizó únicamente la corteza. Para estimar la carga viral en ambas brotaciones se utilizó toda la corteza de los brotes y una muestra de raíces secundarias. En la primera brotación, y tras tomar las muestras de raíces de NA, las plantas se repusieron en sus macetas, mientras que en la segunda brotación se desenterró, limpió y pesó el sistema radicular completo para analizar posibles diferencias en su crecimiento como consecuencia de la infección por CTV.

Para cuantificar la carga viral de CTV mediante RT-qPCR, se extrajo el RNAt de 500 mg de las muestras de corteza y raíces secundarias pulverizando el tejido fresco con N₂ líquido y utilizando un protocolo estándar consistente en dos extracciones con fenol en tampón TCES (0,2 M Tris-Cl, pH 8, 50 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 2% SDS y H₂O tratada con dietil-piromcarbonato), seguidas de una precipitación con acetato sódico 3 M, pH 5,2, y etanol absoluto. Los extractos de RNAt se re-suspendieron en 100 µl de agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las concentraciones de estas alícuotas se cuantificaron por duplicado en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), se ajustaron a 10 ng/µl y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación absoluta del número de copias genómicas de los diferentes aislados de CTV se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando las alícuotas de RNAt obtenidas y la plataforma LightCycler® de Roche siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; 2009) tal como se ha explicado en la sección de material y métodos del Capítulo 1. La carga viral de CTV en plantas sanas o en plantas con los genes *RDR1*, *NPR1*, *NPR3*, *NPR4*, *DCL2* y *DCL4* silenciados se comparó con la de muestras control pre-inoculadas con WT-CLBV.

Para analizar la eficacia del silenciamiento de los genes en estudio, se cuantificó los niveles de mRNA de los genes *RDR1*, *NPR1*, *NPR3*, *NPR4*, *DCL2* y *DCL4* en plantas inoculadas con los distintos viriones recombinantes, con WT-CLBV o en plantas sanas, mediante RT-qPCR usando la plataforma LightCycler® de Roche. Para ello, las correspondientes muestras de RNAt de corteza o de raíces secundarias se sometieron a una retro-transcripción de 40 min a 42°C seguida de qPCR usando 0,3 µM de las correspondientes parejas de cebadores qRDR1F-qRDR1R, qNPR1F-qNPR1R, qNPR3F-qNPR3R, qNPR4F-qNPR4R, qDCL2F-qDCL2R o qDCL4F-qDCL4R (Tabla 1). Éstos se diseñaron sobre un fragmento del gen diferente al clonado en los vectores virales. El programa térmico incluyó una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C y 45 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 62°C y 15 s a 72°C. Se añadió de nuevo un cuarto segmento de 2 s a 82°C, después de la etapa de extensión para leer la fluorescencia. La cantidad del mRNA de cada gen fue normalizada respecto al nivel de expresión del gen *actin11* de cítricos, que en estudios previos mostró una expresión constante en distintos tejidos de la planta (Gandia *et al.*, 2007), utilizando en este caso los cebadores CiACT11qF y CiACT11qR (Tabla 1). El cálculo de la cantidad del mRNA de cada gen silenciado se

midió de forma independiente en las 5 plantas utilizadas y se llevó a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La expresión relativa de los transcritos *RDR1*, *NPR1*, *NPR3*, *NPR4*, *DCL2* y *DCL4* en plantas silenciadas se comparó con la de muestras control inoculadas con viriones WT-CLBV.

Finalmente, se monitorizaron las plantas infectadas con el aislado T36-GFP mediante la observación de fluorescencia producida por la replicación del virus. Para ello, se examinaron muestras de corteza y de raíces secundarias de la primera y segunda brotación con un estereomicroscopio Leica MZ16 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland), usando una fuente de luz de alta energía y un filtro de GFP. Las imágenes se tomaron con una cámara digital Leica DFC490 y el software IM50 (Leica Microsystems).

2.3. Efecto de las proteínas supresoras del silenciamiento de CTV en la ruta de señalización del ácido salicílico

2.3.1. Construcción de los *cassettes* de expresión de las proteínas p20, p23 y p25 de CTV en el vector binario pCAMBIA para su expresión *in planta*

Los genes codificantes para las proteínas p20, p23 y p25 de los diferentes aislados de CTV se clonaron en un vector pCAMBIA 2300 (Genbank AF2343315), que contiene la secuencia del promotor 35S de CaMV y el terminador Nos-T. Para ello, se amplificaron mediante RT-PCR las secuencias del gen *p6*, a partir de una muestra de dsRNA de CaMV (amablemente cedida por la Dra. Aranzazu Moreno, C.S.I.C., Madrid), o de los genes *p20*, *p23* y *p25* de CTV a partir de dsRNA de los aislados T36, T318A y T385 utilizando la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) y las parejas de cebadores p6CaMVf-p6CaMVR, p20T36F-p20T36R, p23T36F-p23R, p25T36F-p25T36R, p20T318AF-p20T318R, p23T318A-p23R, p25T318AF-p25T318AR, p20T385F-p20T385R, p23T385F-p23R o p25T385F-p25T385R (Tabla 1), respectivamente. El programa térmico incluyó una primera etapa de retro-transcripción de 30min a 48°C, seguida de una etapa de desnaturalización inicial de 30 s a 94°C y 35 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 62°C y 1 min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Todos los cebadores contenían la secuencia *BamHI* en el extremo 5' y tras la digestión de los productos de PCR con dicha enzima, se clonaron en el vector binario pCAMBIA previamente digerido

y defosforilado. Los productos de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* cepa JM109 mediante electroporación. Una vez confirmadas por secuenciación las distintas construcciones pCAMBIA-p6CaMV, pCAMBIA-p20T36, pCAMBIA-p20T318A, pCAMBIA-p20T385, pCAMBIA-p23T36, pCAMBIA-p23T318A, pCAMBIA-p23T385, pCAMBIA-p25T36, pCAMBIA-p25T318A y pCAMBIA-p25T385, éstas se transformaron en células electrocompetentes de *A. tumefaciens* cepa *COR 308*.

2.3.2. Ensayos de la actividad supresora de la ruta de señalización del AS en un huésped experimental

Se utilizaron dos ensayos de expresión transitoria de las proteínas virales mediante agroinoculación de *A. tumefaciens* en los huéspedes experimentales *N. tabacum* L. cv. Xanthi y *N. benthamiana*.

2.3.2.1. Retraso de la reacción de HR mediada por la ruta de señalización del AS

Se infiltraron cultivos de *A. tumefaciens* cepa *COR 308*, portadores de las construcciones pCAMBIA-p20T36, pCAMBIA-p20T318A, pCAMBIA-p20T385, pCAMBIA-p23T36, pCAMBIA-p23T318A, pCAMBIA-p23T385, pCAMBIA-p25T36, pCAMBIA-p25T318A, pCAMBIA-p25T385 o pCAMBIA-p6CaMV, junto con cultivos de *A. tumefaciens* portadores de la construcción pBIN-19, en hojas totalmente expandidas de plantas de *N. tabacum* L. cv. Xanthi de 2 semanas de edad. Los cultivos se prepararon siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.1 de materiales y métodos del capítulo 1 y se mezclaron en una proporción 1:1. Se agroinfiltraron 4 hojas por planta de un total de 3 plantas por experimento y construcción. El experimento se repitió 3 veces. El vector pCAMBIA vacío se utilizó como control negativo de la capacidad supresora. La aparición de necrosis en las hojas agroinfiltradas se examinó durante los 4 días posteriores a la inoculación.

2.3.2.2. Expresión de *PR1α*, gen indicador de respuesta al AS

Se infiltraron cultivos de *A. tumefaciens* portadores de las construcciones pCAMBIA-p20T36, pCAMBIA-p20T318A, pCAMBIA-p20T385, pCAMBIA-p23T36, pCAMBIA-p23T318A, pCAMBIA-p23T385, pCAMBIA-p25T36, pCAMBIA-p25T318A, pCAMBIA-p25T385 o pCAMBIA-p6CaMV en hojas expandidas de plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad. La construcción pCAMBIA-p6CaMV se utilizó como control positivo de actividad supresora, mientras que el vector vacío pCAMBIA o plantas sanas se emplearon como controles negativos, el primero de activación de las defensas de la planta y el segundo como control sin activación de dichas defensas. Se agroinfiltraron 4 hojas por planta de un total de 3 plantas por experimento y construcción. Las hojas no se agroinfiltraron completamente sino que se formaron 5-6 halos de agroinfiltración por hoja. A los 3 dpi se recortaron las diferentes secciones agroinfiltradas y se mezclaron los fragmentos pertenecientes a cada hoja por separado, estas mezclas se analizaron separadamente tomando cada hoja como una muestra independiente. El experimento se repitió 3 veces.

Los halos de infiltración mezclados se pulverizaron con N₂ líquido y el RNAt se extrajo mediante el protocolo estándar descrito previamente.

Para cuantificar el mRNA de *PR1α* de *N. benthamiana*, aproximadamente 20 ng del RNAt de cada muestra se retro-transcribió durante 40 min a 42°C, tiempo tras el cual, se sometió a qPCR en la plataforma LightCycler® platform (Roche Molecular Diagnostics) utilizando 0,3 μM de la pareja de cebadores universales *NbPR1α* directo y reverso (Dean *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2012) (Tabla1). Cada muestra problema se analizó por duplicado y se incluyeron controles de RNAt de *N. benthamiana* sana o agua en lugar de RNAt. El programa térmico incluyó una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 62°C y 15 s a 72°C, añadiendo un cuarto segmento de 2 s a 80°C para medir la fluorescencia. La síntesis de un único producto de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler. La cantidad de mRNA de *PR1α* se normalizó respecto a la del gen endógeno *EF1α*, cuantificado en las mismas muestras y siguiendo el protocolo estándar descrito por Dean y colaboradores (2005). La cantidad de mRNA de *PR1α* se estimó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La expresión relativa de

este mRNA se comparó con la de muestras control de pCAMBIA vacío y se analizó mediante ANOVA de un único factor utilizando el programa estadístico SPSS vs17.

CEBADOR	SECUENCIA 5´- 3´		POSICIÓN GÉNICA
RDR1F	*CCACTGCTTGATTCTAACTCTACCG	D	214-239 ^a
RDR1R	*CGATTTGATACATTAATCTCAGGACCAC	R	467-494 ^a
qRDR1F	TTTACACAAGGATTCTTTCCACTC	D	629-652 ^a
qRDR1R	GCCCATATCTTGACGCAATCC	R	631-651 ^a
NPR1F	*TCAAGAATGTATTTGCT	D	531-547 ^a
NPR1R	*GCAAAGACACATAAAG	R	755-771 ^a
qNPR1F	AAAGACCACAAGTGAAGCT	D	1.180-1.197 ^a
qNPR1R	GCTCCTTCTCATTGCAG	R	1.263-1.280 ^a
NPR3F	*TCATAACCAATCTTCTTTTTCGG	D	185-207 ^a
NPR3R	TGGGATACCCTCAACAATTATTT	R	334-356 ^a
qNPR3F	GTGTTCTTGTTGCTTTTG	D	567-584 ^a
qNPR3R	TAAGAGTGTAAAGTCTG	R	645-662 ^a
NPR4F	CTTATGCTCTGCACTATGCCGCTG	D	539-562 ^a
NPR4R	CCTTACGCCGTGCAGCCACATG	R	652-673 ^a
qNPR4F	*TTATGCTATTGAGTTGATGTAT	D	156-177 ^a
qNPR4R	CATAAGGATTGGGATTAC	R	238-255 ^a
DCL2F	*AGTTGCTGATGTAGTTGAGGCTCT	D	917-940 ^a
DCL2R	TGCATGTACTIONGGAAGTCCGCTG	R	1.036-1.059 ^a
qDCL2F	TATAATTTTTGTAGAAAG	D	1458-1475 ^a
qDCL2R	ATTTCCCGCAACATATTC	D	1551-1567 ^a
DCL4F	TGATCCCTGCCAATTCTTTGCTTT	R	3.405-3.429 ^a
DCL4R	*TTCAACCACATCAGCTATAGTTTTCT	D	3.557-3.583 ^a
qDCL4F	ATATTAACGTATGCCTGG	R	203-220 ^a
qDCL4R	TGACAGCGCAGATTTTGG	D	330-348 ^a
p20T36F	TGACGAGGATCCATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAATGA	R	1-26 ^b
p20T36R	TGACGAGGATCCCTACACGCAAGATGGAGAGACTAAATTAATG	D	520-549 ^b
p20T318AF	TGACGAGGATCCATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAACGATTA	R	1-29 ^b
p20T318AR	TGACGAGGATCCCTACACGCATGAAGGAGAACTAAATTA	D	522-549 ^b
p20T385F	TGACGAGGATCCATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAACGATTAC	R	1-30 ^b
p20T385R	TGACGAGGATCCCTACACGCAAGACGGAGAACTAAAT	D	524-549 ^b
p23T36F	TTTCTGGATCCATGGTAATACTAGCGGACAAAC	D	1-22 ^b
p23T318AF	TTTCTGGATCCATGGACGATACTAGCGGACAAAC	D	1-23 ^b
p23T385F	TTTCTGGATCCATGGATGATACTATCGGACAAAC	D	1-23 ^b
p23R	AAAGAGGATCCAATCAGATGAAGTGGTGTTAC	R	608-630 ^b
p25T36F	TGACGAGGATCCATGGACGACGAAACAAAGAAATTGA	D	1-25 ^b

p25T36R	TGACG GAGGATCCT CAACGTGTGTTGCCTTTCCAAGCTG	R	646-673 ^b
p25T318AF	TGACG GAGGATCC ATGGACGACGAGACAAAGAAATTGAAG	D	1-26 ^b
p25T318AR	TGACG GAGGATCCT CAACGTGTGTTAAATTTCCAAGCTGCC	R	644-673 ^b
p25T385F	TGACG GAGGATCC ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAG	D	1,26 ^b
p25T385R	TGACG GAGGATCCT CAACGTGTGTTAAATTTCCAAGCTGCC	R	644-673 ^b
p6CaMVF	TGACG GAGGATCC ATGGAGAACATAGAAAACTCCTCATGCAAG	D	1-31 ^c
p6CaMVR	TGACG GAGGATCCT CAATCCACTTGCTTTGAAGATGTCGTAGTG	R	1539-1569 ^c
CiACT11q-F	CAGTGTGGATTGGAGGATCA	D	1146-1167 ^d
CiACT11q-R	TCGCCCTTGAGATCCACAT	R	1198-1217 ^d

Tabla 1. Secuencia y posiciones nucleotídicas de los cebadores utilizados para las distintas construcciones en los vectores *cbv3*³ y pCAMBIA, o en las cuantificaciones mediante RT-qPCRs. D y R indican el sentido directo y reverso de las secuencias de cada cebador, respectivamente.

^a Posiciones en la secuencia de los mRNAs de *Citrus sinensis*: *RDR1* (GenBank [102608479](#)), *NPR1* (GenBank [102617188](#)), *NPR3* (GenBank [102621158](#)), *NPR4* (GenBank [102622086](#)), *DCL2* (GenBank [102617691](#)) y *DCL4* (GenBank [102621372](#)). El símbolo * indica que dichas secuencias están fosforiladas en su extremo 5'.

^b Posiciones en la secuencia de los genes *p20*, *p23* y *p25* de los aislados de CTV T36 (GenBank [AY170468](#)), T318A (GenBank [DQ151548](#)) y T385 (GenBank [Y18420](#)). Los nucleótidos en negrita marcan el sitio de restricción *Bam*HI.

^c Posiciones en la secuencia del gen *p6* de CaMV (GenBank [KF015296.1](#)). Los nucleótidos en negrita marcan el sitio de restricción *Bam*HI.

^d Posiciones en la secuencia del gen homólogo *actin11* en *C. sinensis* (Citrus Functional Genomic database: aCL563 Contig1).

3. RESULTADOS

3.1. Intensidad de los síntomas y distribución viral en NA de semilla infectado con distintos aislados de CTV

Para determinar si la intensidad de los síntomas en plantas de NA está relacionada con una mayor o menor acumulación de CTV en los tejidos infectados, un grupo de 5 plantas de NA de semilla fueron inoculadas por injerto con los aislados de CTV T36-GFP, T318A y T385. El aislado T36-GFP induce el síndrome de decaimiento en plantas propagadas sobre el patrón NA y síntomas moderados de SY o SP en huéspedes susceptibles como NA y pomelo o LM, respectivamente (Santayana-rayana *et al.*, 2001). El aislado español T318A causa decaimiento severo en plantas propagadas sobre NA e intensos síntomas de SY y SP en diferentes huéspedes, incluyendo pomelo y ND (Moreno *et al.*, 1993; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2007). Por el contrario, el aislado de origen español T385 es un aislado poco patogénico que únicamente induce clorosis nervial suave en LM, pero no los síndromes de SP o SY (Moreno *et al.*, 1991, 1993; Vives *et al.*, 1999).

Las plantas de NA de semilla inoculadas con el aislado T318A mostraron síntomas severos de SY con acortamiento de los entrenudos, enanismo, reducción del tamaño y amarillamiento de las hojas (Figura 1A). Las plantas inoculadas con el aislado T36-GFP mostraron un retraso moderado en el crecimiento, sin amarillamiento de las hojas. En cambio, plantas inoculadas con T385 permanecieron asintomáticas como los controles sanos. Estas diferencias de comportamiento se reflejaron en el peso de la corteza y de la raíz de las plantas inoculadas con los distintos aislados (Figura 1B). Se observó una correlación entre el crecimiento de la parte aérea y el tamaño del sistema radicular (Figura 1C), que mostró un crecimiento menor en las plantas infectadas con el aislado T318A, seguidas de las infectadas con T36-GFP. Por el contrario, las plantas infectadas con T385 mostraron un peso de corteza y un tamaño de raíz comparable al de las plantas control no inoculadas.

Para comparar la carga viral y distribución de los diferentes aislados de CTV en plantas de semilla de NA, se cuantificó mediante RT-qPCR (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007) el gRNA de CTV presente en muestras de corteza y de raíces secundarias tanto en la primera como en la segunda brotación (Figura 1D). La acumulación de CTV en plantas inoculadas con el aislado T36-GFP o con T318A fue mayor en la corteza de los brotes que en la raíz.

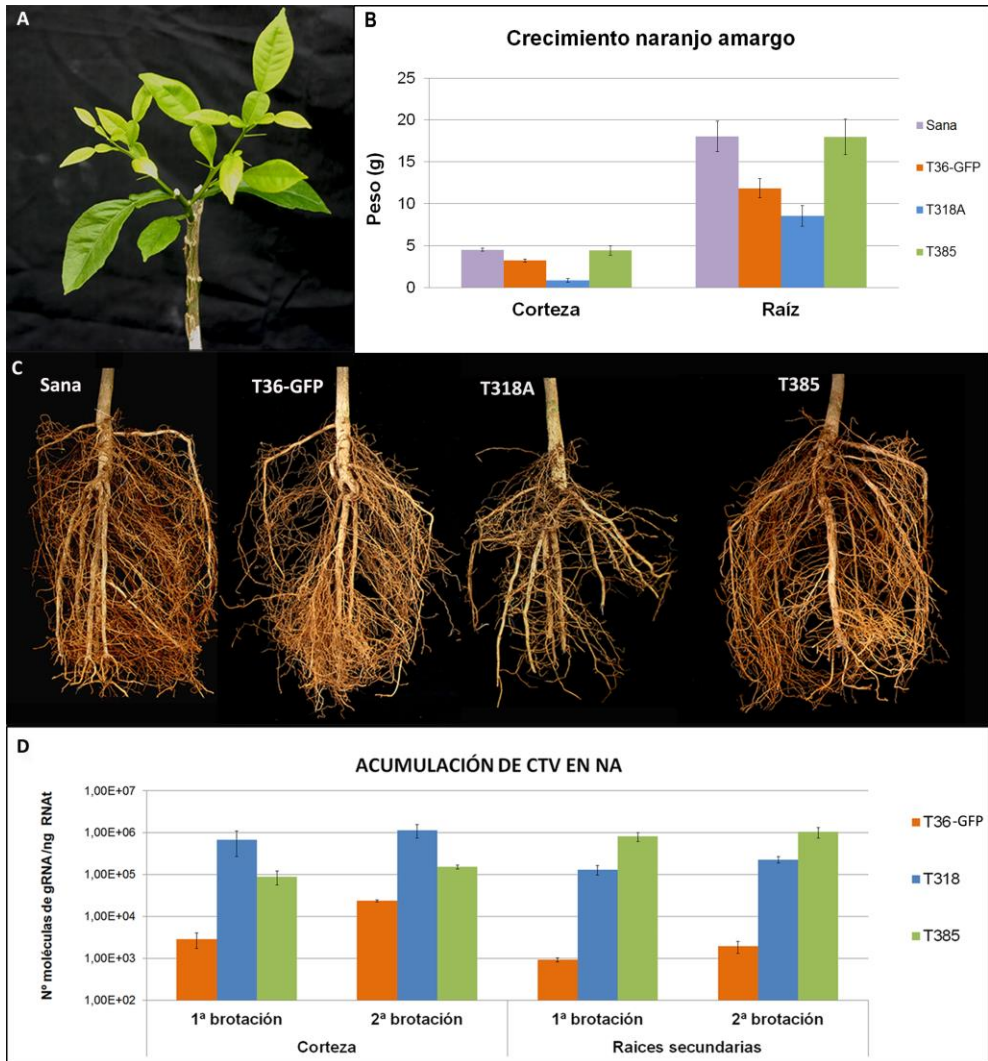


Figura 1: Síntomas inducidos y acumulación viral en plantas de NA de semilla infectado con los aislados de CTV T36-GFP, T318A y T385. **A)** Síntomas de amarillamiento SY en plantas de NA inoculadas con el aislado T318A de CTV. **B)** Efecto de CTV en el crecimiento de brotes del NA, expresado como peso de la corteza y la raíz en la segunda brotación de plantas de NA inoculadas con los tres aislados de CTV. **C)** Crecimiento de las raíces de plantas sanas o inoculadas con los diferentes aislados de CTV. **D)** Comparación de los títulos virales de CTV, estimados en muestras de corteza y raíz secundaria de las dos brotaciones consecutivas mediante RT-qPCR. Las barras representan los valores de la desviación estándar.

En contraposición, la mayor carga viral en plantas inoculadas con T385 se detectó en la raíz. En corteza, el mayor título viral fue el del aislado severo T318A, mientras que en raíz fue el del aislado asintomático T385, tanto en la primera como en la segunda brotación. La menor acumulación de virus tanto en corteza como en raíz se observó en plantas inoculadas con el aislado T36-GFP. Este resultado sugiere que la intensidad de síntomas en NA no está asociada con la carga viral. En todas las plantas infectadas se observó un aumento de la acumulación viral en la segunda brotación con respecto a la primera, lo que indica que la invasión del NA por CTV aumenta con el tiempo.

3.2. Estudio de los síntomas y distribución viral en plantas de semilla de NA con los genes *RDR1*, *NPR1* y *DCL2-4* silenciados

Con el objetivo de estudiar si los mecanismos de defensa de la planta basados en PTGS y/o en la señalización del AS están implicados en la resistencia del NA frente a la invasión por CTV, se silenciaron mediante VIGS los genes *RDR1* (relacionado con ambas rutas de defensa), *NPR1* (gen regulador de la ruta de señalización del AS) y *DCL2* y *DCL4* (ambos juegan un papel importante en la defensa mediante PTGS).

En todas las plantas de NA pre-inoculadas con los viriones recombinantes *clbv3'-RDR1*, *clbv3'-NPR1* o *clbv3'-DCL2-4* (por lo tanto silenciadas para *RDR1*, *NPR1* o *DCL2* y *DCL4*, respectivamente,) y posteriormente inoculadas con CTV, se observó una ligera disminución del peso de corteza y de raíz en comparación con plantas no silenciadas, para todos los aislados de CTV (Figura 2). La reducción del sistema radicular fue especialmente significativa en plantas silenciadas para *RDR1* y *DCL2-4*, y especialmente acusada en las plantas inoculadas con el aislado severo T318A (Figura 3). Por otra parte, el título viral de todos los aislados fue mayor en plantas de NA con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-4* silenciados que en las plantas control pre-inoculadas con WT-CLBV y por tanto no silenciadas, tanto en corteza de brotes como en raíz. Estas diferencias de acumulación fueron más evidentes en el aislado T36-GFP que en los aislados T318A o T385, que normalmente presentan mayor acumulación viral. El mayor título viral para los tres aislados se encontró en plantas de NA de semilla con los genes *DCL2-4* silenciados, seguidas por las plantas silenciadas para *RDR1* y *NPR1* (Figura 4).

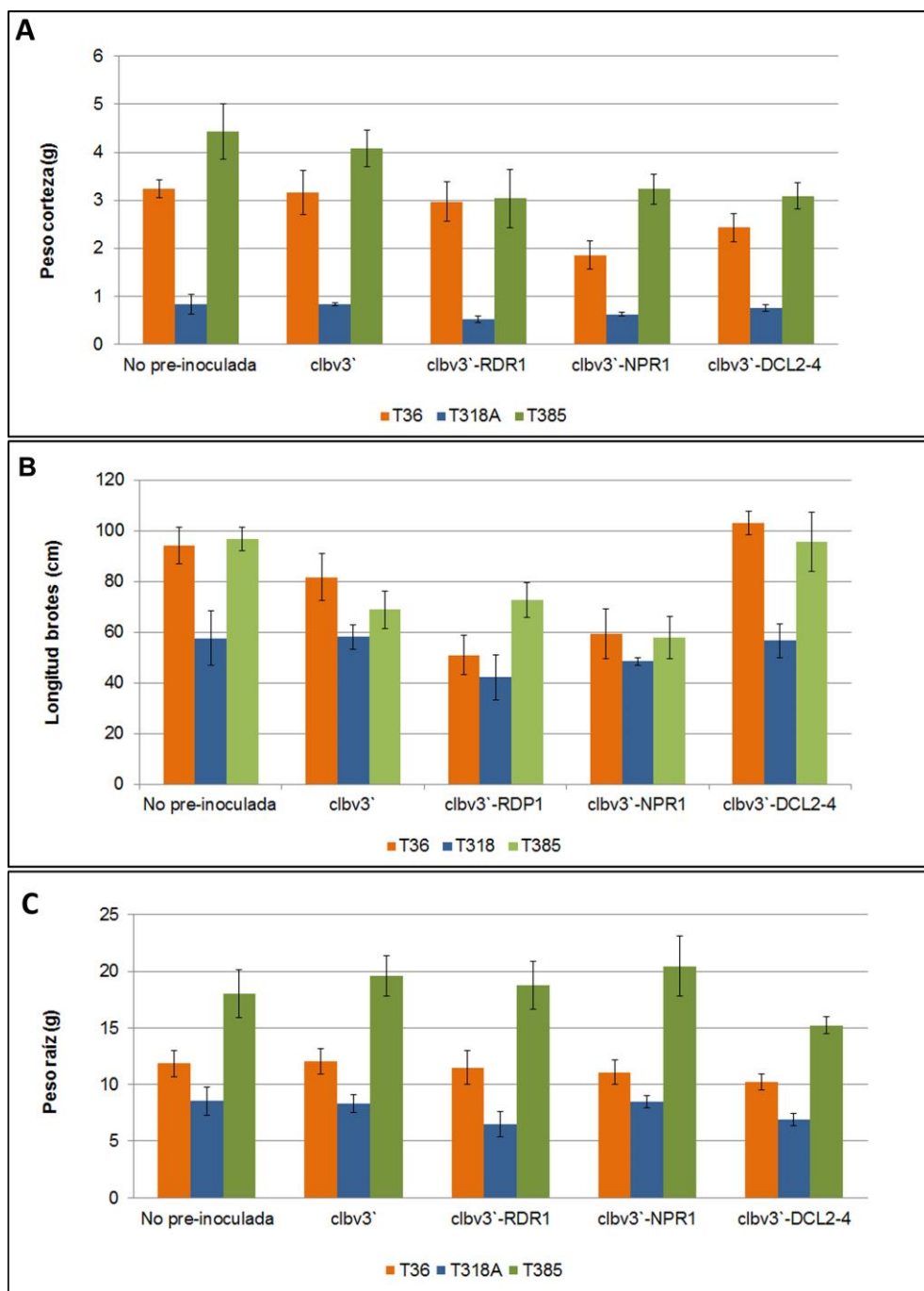


Figura 2: Crecimiento de los brotes y la raíz en la segunda brotación de plantas de NA de semilla con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-4* silenciados y en controles de plantas no silenciadas (sanas o preinoculadas con WT-CLBV) e inoculadas con los aislados T36-GFP,

T318A o T385. **A)** Peso de la corteza de los brotes. **B)** Longitud de los brotes de las mismas plantas. **C)** Peso del sistema radicular de dichas plantas.

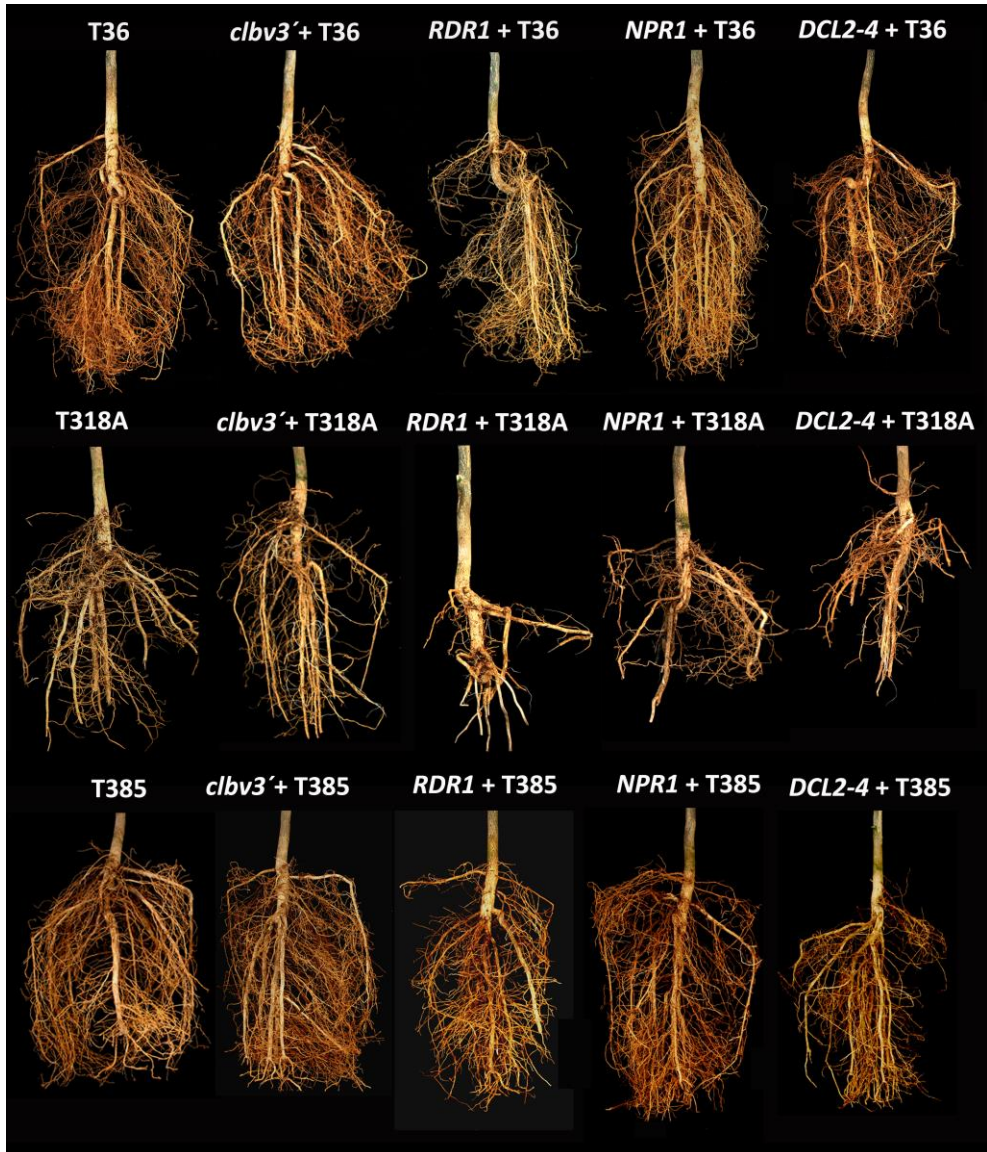


Figura 3: Crecimiento del sistema radicular de plantas de NA de semilla silenciadas o no silenciadas e infectadas con los aislados T36-GFP (T36), T318A y T385. Las fotografías fueron tomadas al final de la segunda brotación. Las plantas pre-inoculadas con los

viriones *clbv3'-RDR1*, *clbv3'-NPR1* o *clbv3'-DCL2-4*, se indican señalando únicamente el nombre del gen silenciado.

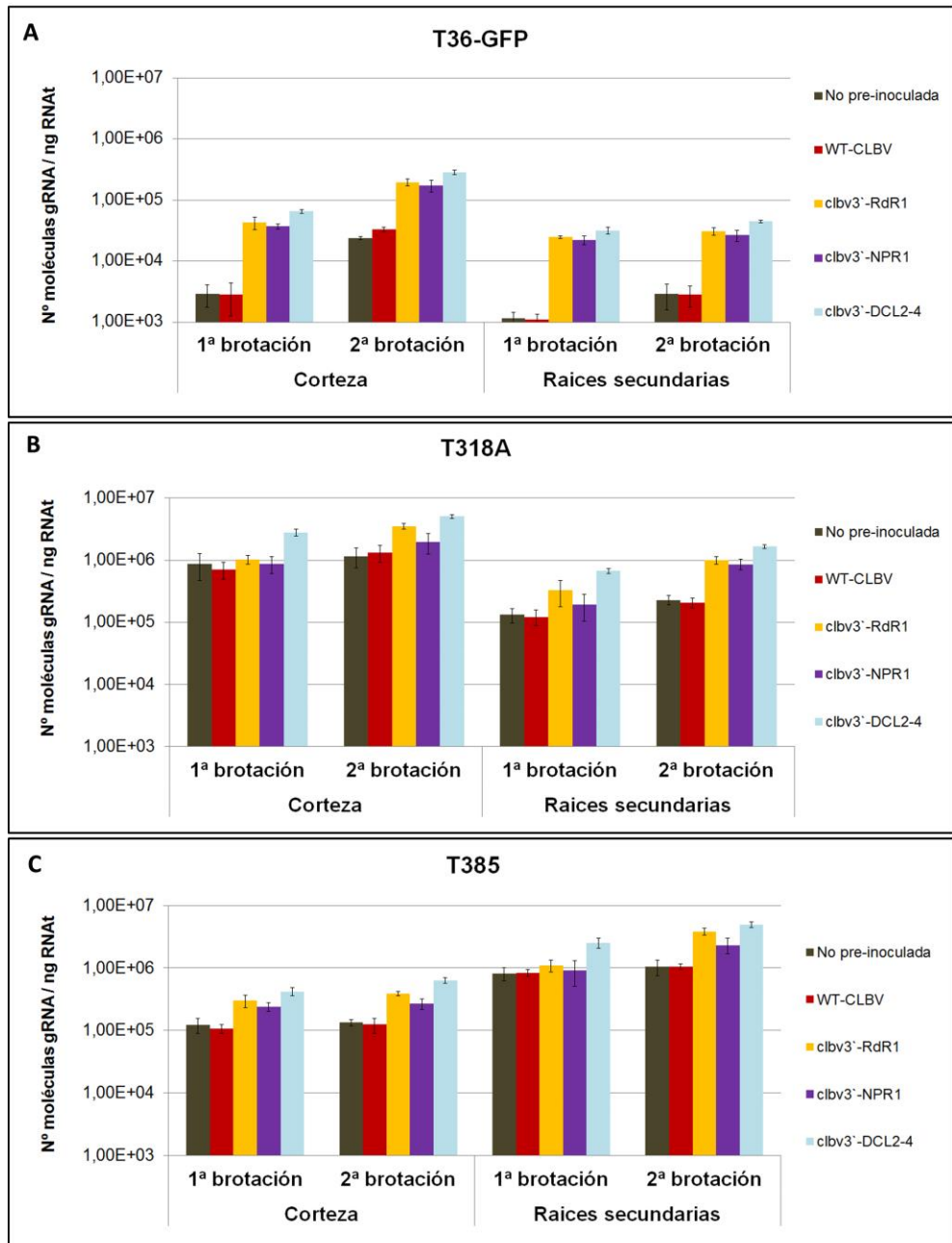


Figura 4: Acumulación viral en plantas de NA de semilla no silenciadas o con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-4* silenciados e inoculadas con los aislados de CTV: **A)** T36-GFP, **B)**

T318A y C) T385. El número de copias de gRNA se estimó mediante RT-qPCR en muestras de corteza de brotes y raíz secundaria de la primera y segunda brotación. Las barras representan la desviación estándar.

El análisis ANOVA seguido del test de Tukey para comparación de medias (Tabla 2) mostró que en la segunda brotación (donde el efecto de CTV es más acusado) las diferencias en la acumulación viral en corteza y en raíz entre plantas silenciadas y no silenciadas eran estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En plantas inoculadas con el aislado T36-GFP existen diferencias estadísticamente significativas entre la acumulación viral de plantas de NA no silenciadas y silenciadas para cualquiera de los genes, pero no entre plantas silenciadas para *RDR1* y silenciadas para *NPR1* (tanto en corteza como en raíz), o entre silenciadas para *RDR1* y para *DCL2-4* (en raíz). En el caso de las plantas de NA infectadas con el aislado T318A las únicas diferencias estadísticamente significativas de acumulación viral entre plantas no silenciadas y silenciadas se observó en corteza, entre plantas de NA no silenciadas y plantas silenciadas para *RDR1* por un lado y para *DCL2-4* por otro. En raíz, en cambio, se vieron diferencias entre cada uno de los grupos de plantas silenciadas y el control no silenciado. Al comparar los grupos de plantas silenciadas entre sí, la acumulación de CTV en corteza únicamente presentó diferencias estadísticamente significativas entre las plantas silenciadas para *NPR1* y las silenciadas para *DCL2-4*, mientras que en raíz se observaron diferencias entre las plantas silenciadas para *NPR1* y para *DCL2-4* y entre las silenciadas para *RDR1* y para *DCL2-4*, pero no entre las silenciadas para *RDR1* y para *NPR1*. Finalmente, en las plantas inoculadas con el aislado T385, se observaron diferencias en la acumulación entre corteza y raíz. En la corteza, observamos diferencias significativas entre plantas no silenciadas y plantas silenciadas para *RDR1* o *DCL2-4*, entre plantas silenciadas para *RDR1* y para *DCL2-4* y entre plantas silenciadas para *DCL2-4* y para *NPR1*. Por el contrario, en raíz donde la acumulación de gRNA del aislado T385 es mucho mayor, se vieron diferencias significativas entre cualquier planta silenciada respecto al control no silenciado y entre los distintos grupos de las plantas silenciadas entre sí (Tabla 2).

Análisis de la variabilidad	DHS Tukey en corteza	Sig ^a
No pre-inoculada + T36	<i>clbv3</i> ⁺ + T36	0,993
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T36	0,001*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,001*
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T36	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,959
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	0,109
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,019*
No pre-inoculada + T318A	<i>clbv3</i> ⁺ + T318A	0,999
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T318A	0,014*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,760
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T318A	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,156
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	0,190
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,001*
No pre-inoculada + T385	<i>clbv3</i> ⁺ + T385	1
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T385	0,003*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,204
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T385	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,295
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	0,006*
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,001*

Análisis de la variabilidad	DHS Tukey en raíz	Sig ^a
No pre-inoculada + T36	<i>clbv3</i> ⁺ + T36	1
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T36	0,004*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,007*
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T36	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,993
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	0,888
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T36	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T36	0,999
No pre-inoculada + T318A	<i>clbv3</i> ⁺ + T318A	1
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T318A	0,002*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,008*
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T318A	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,157
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T318A	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T318A	0,002*
No pre-inoculada + T385	<i>clbv3</i> ⁺ + T385	1
	<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T385	0,004*
	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,007*
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	0,001*
<i>clbv3</i> ⁻ -RDR1 + T385	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,005*
	<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	0,006*
<i>clbv3</i> ⁻ -DCL2-4+ T385	<i>clbv3</i> ⁻ -NPR1 + T385	0,003*

Tabla 2: Test estadístico Tukey's Studentized Range para contrastar pares de medias en el análisis del efecto del silenciamiento de los genes *RDR1*, *NPR1* y *DCL2-4* del NA en la acumulación viral de los aislados T36 (T36-GFP), T318A y T385 de CTV en comparación con

plantas no silenciadas. Análisis efectuados en la segunda brotación. ^a P-valor $\leq 0,05$. * Indica las diferencias estadísticamente significativas.

El aislado T36-GFP empleado en este estudio expresa la proteína GFP, lo que permite monitorizar la infección mediante un estereomicroscopio con un filtro de GFP. Bajo estas condiciones, la corteza de NA presenta auto-fluorescencia roja debida a la excitación de la clorofila con luz UV. En muestras de corteza de plantas NA silenciadas para *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-4* se visualizaron numerosos focos fluorescentes correspondientes a CTV (Figura 5). Éstos eran más abundantes en plantas silenciadas para *DCL2-4*, seguidas de las silenciadas para *RDR1*, a su vez, seguidas de las silenciadas para *NPR1*. Se observó una correlación positiva entre el número de focos fluorescentes y el título viral estimado por RT-qPCR (Figuras 4-5).

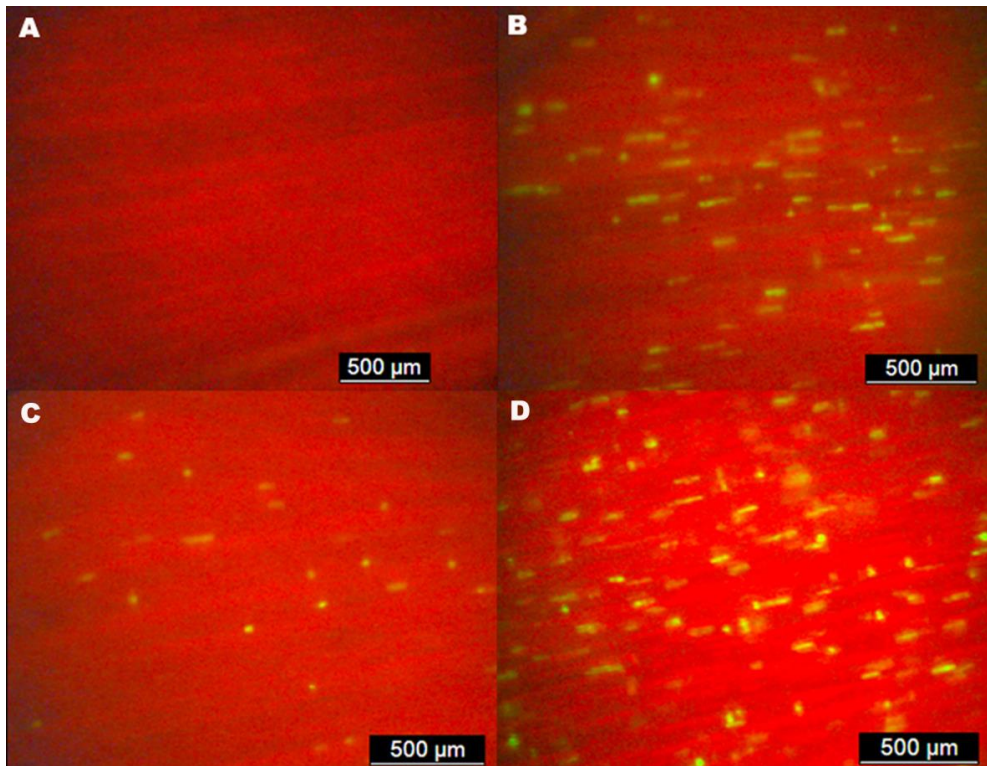


Figura 5: Detección de fluorescencia de GFP en la superficie interna de la corteza de NA de semilla inoculado con el aislado T36-GFP en: **A)** plantas control no pre-inoculadas, **B)** plantas silenciadas para *RDR1*, **C)** plantas silenciadas para *NPR1* y **D)** plantas silenciadas

para *DCL2-DCL4*. Los puntos fluorescentes verdes corresponden a células infectadas. Las muestras se observaron en un estereomicroscopio con filtro GFP.

La expresión de GFP también se observó en muestras de raíz secundaria, donde las plantas de NA con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-4* silenciados mostraron focos de fluorescencia verde intenso, en comparación con las plantas no silenciadas que sólo presentaron autofluorescencia amarillenta debido a la presencia de lignina (Figura 6).

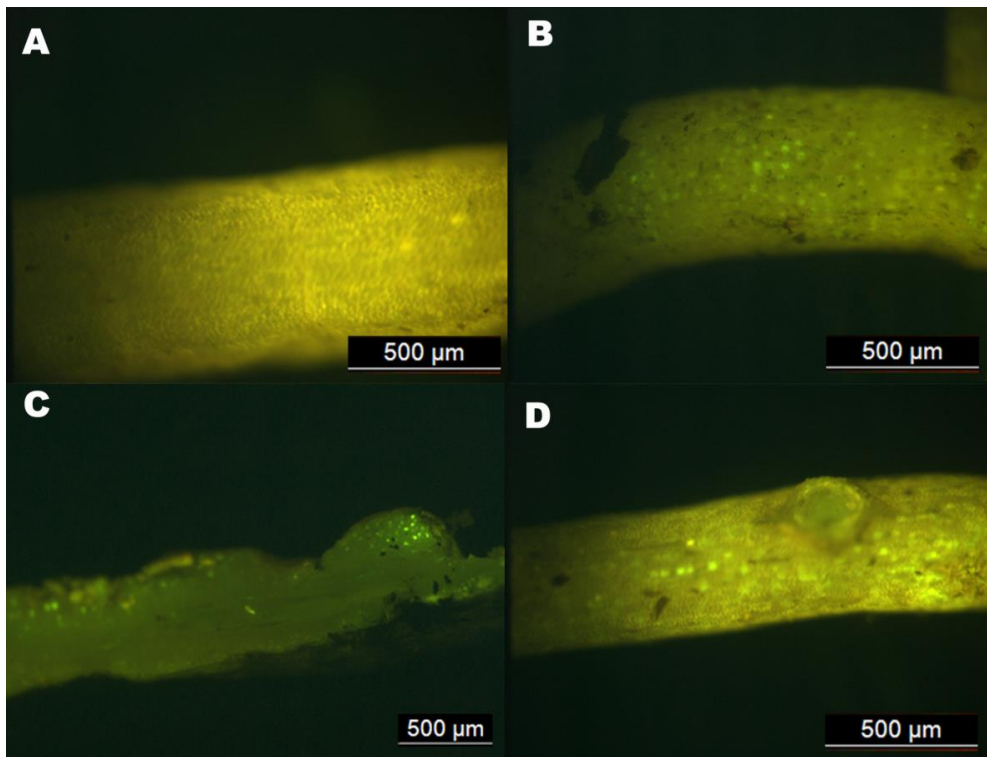


Figura 6: Detección de fluorescencia de GFP en la superficie externa de las raíces secundarias de NA de semilla inoculado con el aislado T36-GFP en: **A)** plantas control no pre-inoculadas, **B)** plantas silenciadas para *RDR1*, **C)** plantas silenciadas para *NPR1* y **D)** plantas silenciadas para *DCL2-DCL4*. Las raíces muestran una coloración verde-amarillenta por la auto-fluorescencia de la lignina, mientras que los puntos fluorescentes verdes

corresponden a células infectadas por CTV. Las muestras se observaron en un estereomicroscopio con filtro GFP.

La eficiencia de la técnica VIGS en el silenciamiento de genes en NA de semilla se evaluó comparando la expresión de mRNA de los genes *RDR1*, *NPR1*, *DCL2* y *DCL4* en la corteza y raíz de dos brotaciones en las plantas silenciadas y en las no silenciadas. Esta expresión se estimó mediante RT-qPCR, normalizando los datos obtenidos con el nivel de expresión del gen de cítricos homólogo a *actina 11*, que en estudios previos mostró niveles de expresión similares en distintos tejidos de la planta (Gandia *et al.*, 2007). Las plantas pre-inoculadas con viriones de la construcción *clbv3`-RDR1* mostraron una reducción del 60-70% en la acumulación del mRNA de *RDR1* en la corteza y raíz de ambas brotaciones con respecto a las plantas no silenciadas. La reducción en la acumulación del mRNA de *NPR1* fue en torno al 70-80% en la corteza de ambas brotaciones, sin embargo, no se pudo detectar expresión del gen *NPR1* en raíz, lo que sugiere que este gen no se expresa o lo hace a muy bajos niveles en las raíces de los cítricos. La cantidad de mRNA del gen *DCL2* en plantas pre-inoculadas con viriones de la construcción *clbv3`-DCL2-4* disminuyó en un 90% en corteza y en un 65-75 % en raíz, mientras que las correspondientes disminuciones de mRNA del gen *DCL4* en la corteza y raíz de estas mismas plantas fue sólo del 40-50% en ambas brotaciones (Figuras 7a y b).

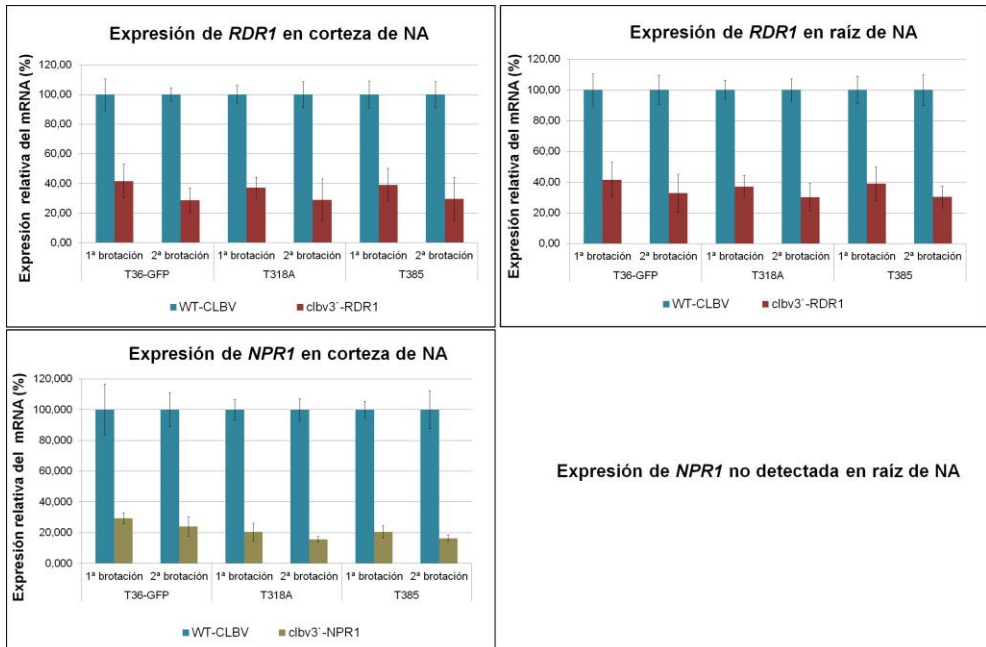


Figura 7a: Acumulación relativa (%) de mRNA de los genes *RDR1* y *NPR1* en plantas de NA de semilla silenciadas para estos genes en comparación con las no silenciadas. La acumulación de los mRNA se determinó en la corteza y en la raíz de las plantas mediante RT-qPCRs con cebadores específicos para cada gen. Las barras representan los valores de la desviación estándar.

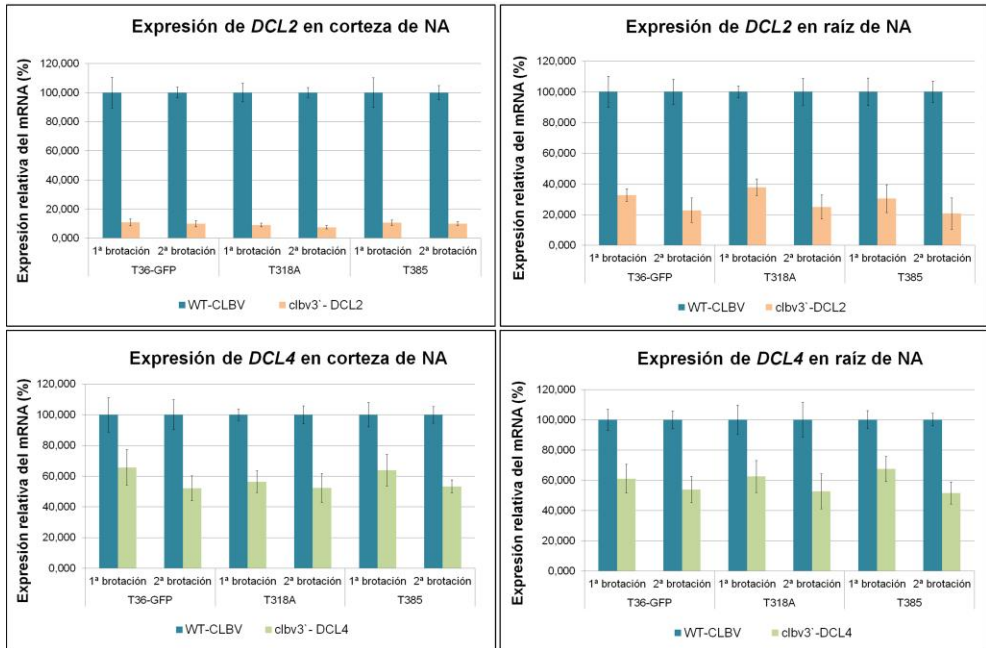


Figura 7b: Acumulación relativa (%) de mRNA de los genes *DCL2* y *DCL4* en plantas de NA de semilla silenciadas para estos genes en comparación con las no silenciadas. La acumulación de los mRNA se determinó en la corteza y en la raíz de las plantas mediante RT-qPCRs con cebadores específicos para cada gen. Las barras representan los valores de la desviación estándar.

3.3. Efecto del silenciamiento de los genes *RDR1*, *NPR1*, *DCL2-4* y *NPR3-4* en el crecimiento y acumulación viral de plantas de NA propagadas sobre un patrón de limonero rugoso infectado con CTV

En el presente experimento, además de estudiar el papel que juegan los genes *RDR1*, *NPR1* y *DCL2-4* en la defensa del NA frente a CTV, también se analizó la implicación de los genes *NPR3* y *NPR4* en la defensa de la planta. La principal diferencia con respecto al estudio realizado en plantas de NA de semilla es que, en este caso, el NA fue propagado sobre limonero rugoso, una especie susceptible a CTV en la que el virus alcanza altos niveles de acumulación. El hecho de inocular un patrón susceptible y propagar el NA sobre éste, hace que los brotes de NA estén sometidos a un aporte continuo de viriones producidos en el patrón.

Para evaluar el comportamiento de las plantas de NA con los genes *RDR1*, *NPR1*, *DCL2-4* o *NPR3-4* silenciados, sujetas a un aporte continuo de viriones de CTV, se propagaron yemas de NA sobre plantas de limonero rugoso simultáneamente con viriones recombinantes *clbv3`-RDR1*, *clbv3`-NPR1*, *clbv3`-DCL2-4* o *clbv3`-NPR3-4* y con el aislado de CTV T36-GFP. Como controles negativos se utilizaron plantas inoculadas simultáneamente con viriones WT-CLBV y con T36-GFP. El efecto del silenciamiento de dichos genes sobre la acumulación de T36-GFP en NA se cuantificó mediante RT-qPCR (Figura 8) y el efecto sobre la distribución de CTV en los tejidos, mediante visualización de la fluorescencia de GFP en la corteza de NA con un estéreo-microscopio con filtro para GFP (Figura 9).

Al igual que en las plantas de NA de semilla, la mayor carga viral se detectó en plantas silenciadas para *DCL2-4*, seguidas de las silenciadas para *RDR1* y *NPR1*. No obstante, la acumulación viral fue más acusada en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso que en las de semilla, como consecuencia del aporte continuo de viriones desde el patrón susceptible. Por el contrario, las plantas de NA silenciadas para *NPR3-4* presentaron una disminución del título viral respecto a las plantas control no silenciadas (inoculadas con viriones WT-CLBV) (Figura 8), probablemente debido a un aumento de la resistencia basal como consecuencia de la mayor acumulación de la proteína NPR1, cuya hidrólisis es producida por las proteínas NPR3 y NPR4.

Estos resultados fueron confirmados mediante la observación de la fluorescencia de GFP. Donde las plantas control no silenciadas ni las silenciadas para *NPR3-4* mostraban puntos fluorescentes. Sin embargo, éstos focos eran abundantes en las plantas con los genes *RDR1*, *NPR1* y *DCL2-4* silenciados, lo que sugiere una mayor acumulación del virus en estas últimas.

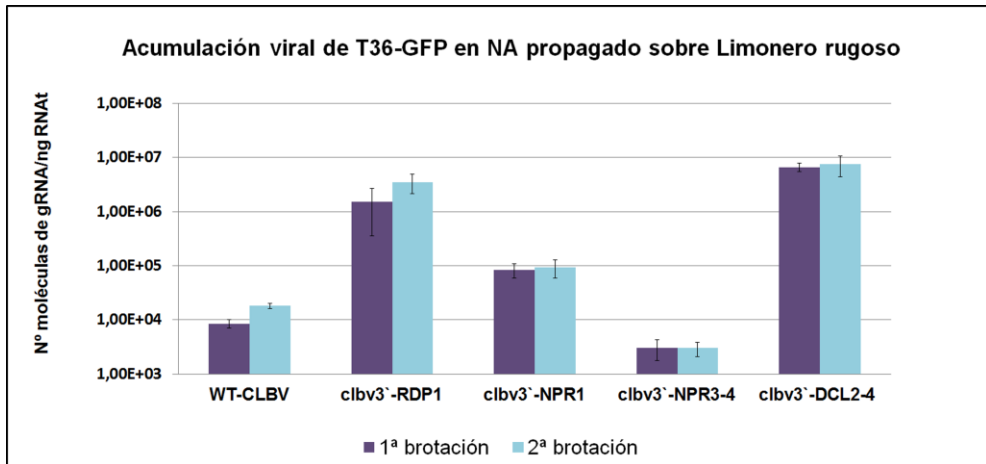


Figura 8: Acumulación viral del aislado T36-GFP en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso, no silenciadas (inoculadas con viriones WT-CLBV) o silenciadas para los genes *RDR1*, *NPR1*, *NPR3-4* o *DCL2-4*. La carga viral se estimó mediante RT-qPCR en muestras de corteza de dos brotaciones consecutivas. Las barras representan el valor de la desviación estándar.

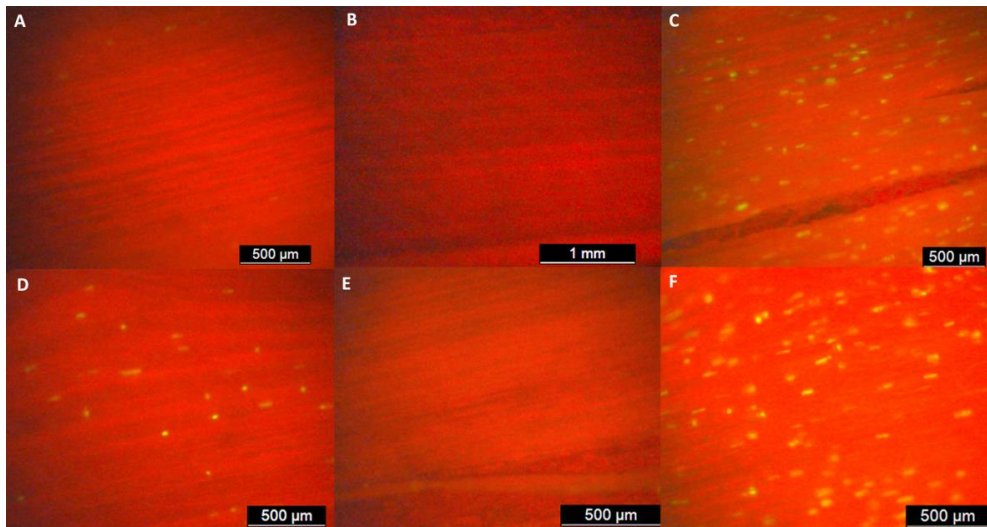


Figura 9: Detección de fluorescencia de GFP en la superficie interna de la corteza de plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso e inoculadas con el aislado T36-GFP: **A)** plantas sanas, **B)** plantas pre-inoculadas con viriones WT-CLBV, **C)** pre-inoculadas con viriones *clbv3`-RDR1*, **D)** pre-inoculadas con viriones *clbv3`-NPR1*, **E)** pre-inoculadas con

viriones *clbv3`-NPR3-4* y **F**) pre-inoculadas con viriones *clbv3`-DCL2-4*. Las muestras de corteza se observaron en un estereomicroscopio con filtro para GFP. Los puntos verdes fluorescentes corresponden a células infectadas por CTV.

3.4. Estudio de la implicación de la ruta de señalización del AS en la mala unión inducida por CTV entre variedades de cítricos y el patrón NA

Estudios previos pusieron de manifiesto que los mutantes *npr3-npr4* de *A. thaliana* no inducen la HR tras una infección con patógenos virulentos (Fu *et al.*, 2012). Así mismo, se observó que el enanismo de plantas de NA propagadas sobre un patrón ND infectado con el aislado de CTV T318A está generalmente asociado a una necrosis en la zona de unión patrón-injerto (Pina *et al.* 2005). Para ver si los genes *NPR3* y *NPR4* estaban también implicados en la inducción de esta necrosis se propagaron yemas de NA sobre plantas de limonero rugoso simultáneamente inoculadas por injerto con viriones derivados de la construcción *clbv3`-NPR3-4* y con el aislado T318A de CTV. Como control se utilizaron plantas inoculadas simultáneamente con viriones WT-CLBV y con T318A. El crecimiento de las plantas silenciadas para *NPR3-4* fue mayor que el de las no silenciadas, reduciéndose así los síntomas de enanismo inducidos normalmente por T318A en las combinaciones de NA con otra variedad susceptible. Además, la acumulación de gRNA de T318A en las plantas silenciadas fue menor que las de las plantas control no silenciadas (Figura 10). Sin embargo, no se observó necrosis en la unión patrón-injerto de las plantas silenciadas ni en las plantas control (Figura 11), por lo que no pudo demostrarse la implicación de los genes *NPR3-4* en la necrosis observada previamente.

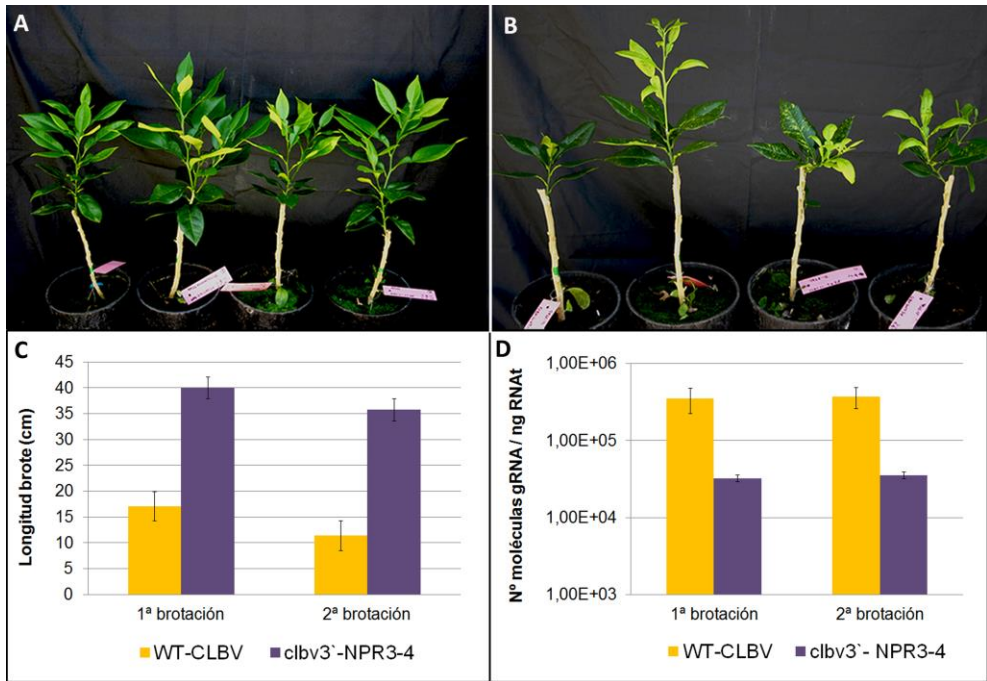


Figura 10: Crecimiento y acumulación de CTV en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso silenciadas para *NPR3-4* e infectadas con el aislado T318A en comparación con plantas control no silenciadas (inoculadas con WT-CLBV). Aumento del crecimiento en plantas silenciadas para *NPR3-4* (A) respecto de las no silenciadas (B) y síntomas de amarillamiento de las hojas y enanismo en estas últimas. C) Longitud de tallos en plantas control y en plantas silenciadas en dos brotaciones consecutivas. D) Acumulación viral de T318A en corteza de ambas brotaciones, estimada mediante RT-qPCR. Las barras muestran los valores de la desviación estándar.

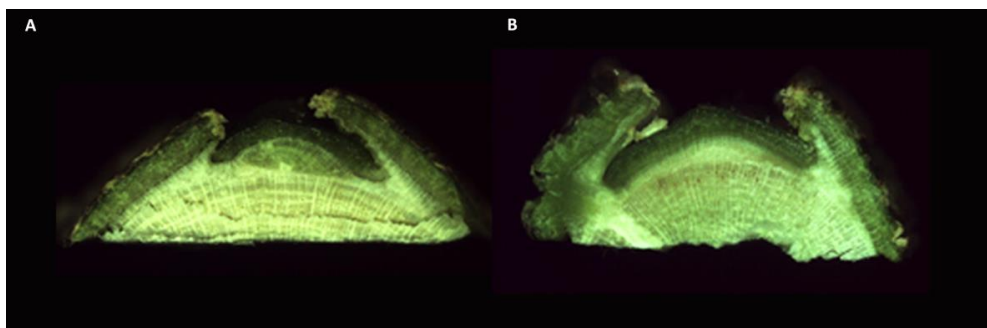


Figura 11: Zona de unión entre NA y el patrón limonero rugoso infectado con el aislado de CTV T318A en plantas no silenciadas (A) y en plantas silenciadas para *NPR3-4* (B).

3.5. Análisis de las proteínas p20, p23 y p25 de CTV como supresores de la ruta de señalización del AS en un huésped experimental

Las diferencias en la acumulación viral, tropismo y síntomas observadas entre los tres aislados de CTV estudiados, podrían resultar de la distinta capacidad de sus proteínas supresoras p20, p23 y p25 para vencer las defensas del NA. Se ha demostrado que estas proteínas actúan como supresores del PTGS en plantas de *N. benthamiana* (Lu et al, 2004), pero no se sabe su implicación en la ruta de señalización del AS. Con el objetivo de estudiar si p20, p23 o p25 pudieran tener también actividad supresora en esta ruta, se llevaron a cabo ensayos de expresión transitoria de dichas proteínas en dos huéspedes experimentales. En el primer ensayo, se examinó la capacidad de estas proteínas para retrasar la aparición de la necrosis asociada a la HR y en el segundo, su capacidad para suprimir la expresión del gen *PR1a*, que es un marcador de la ruta del AS (Laird et al, 2013).

3.5.1. Retraso de la necrosis asociada a la HR mediada por la ruta de señalización del AS

La expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* de la proteína p19 de TBSV en *N. tabacum* L. cv. Xanthi, induce una fuerte HR que alcanza su máximo a las 36 h tras su agroinoculación (Angel y Schoelz, 2013). Sin embargo, la co-infiltración de dos vectores que expresan p19 y la proteína p6 de CaMV, respectivamente, retrasa 24 h la aparición de los síntomas y reduce su intensidad. Este retraso, es consecuencia de que la proteína p6 actúa como supresor de la ruta de señalización del AS (Laird et al, 2013).

En este estudio se examinó la capacidad de las proteínas p20, p23 o p25 de los aislados T36-GFP, T318A o T385 de CTV para suprimir la ruta de señalización del AS co-infiltrando hojas de *N. tabacum* L. cv. Xanthi con cultivos de *A. tumefaciens* capaces de expresar cada una de estas proteínas a partir de un vector binario pCAMBIA, junto con cultivos similares portadores del vector pBIN-p19. Como controles se efectuaron co-infiltraciones de pBIN-p19 y pCAMBIA-p6 (control positivo) y de pBIN-p19 y pCAMBIA vacío (control negativo).

La expresión de las proteínas p20 y p23 de los tres aislados de CTV retrasaba la aparición de la necrosis, aunque con una eficiencia menor que la proteína p6 de

CaMV. La proteína p20 de cada uno de los aislados presentó una mayor eficiencia supresora que la p23. A su vez, las proteínas p20 y p23 del aislado T318A presentaron una actividad supresora ligeramente mayor que las del aislado T36-GFP y éstas, una actividad mayor que las del aislado T385. La proteína p25 del aislado T36-GFP indujo cierto retraso en la aparición de necrosis, pero no sus proteínas homólogas de los otros dos aislados (Figura 12a-b).

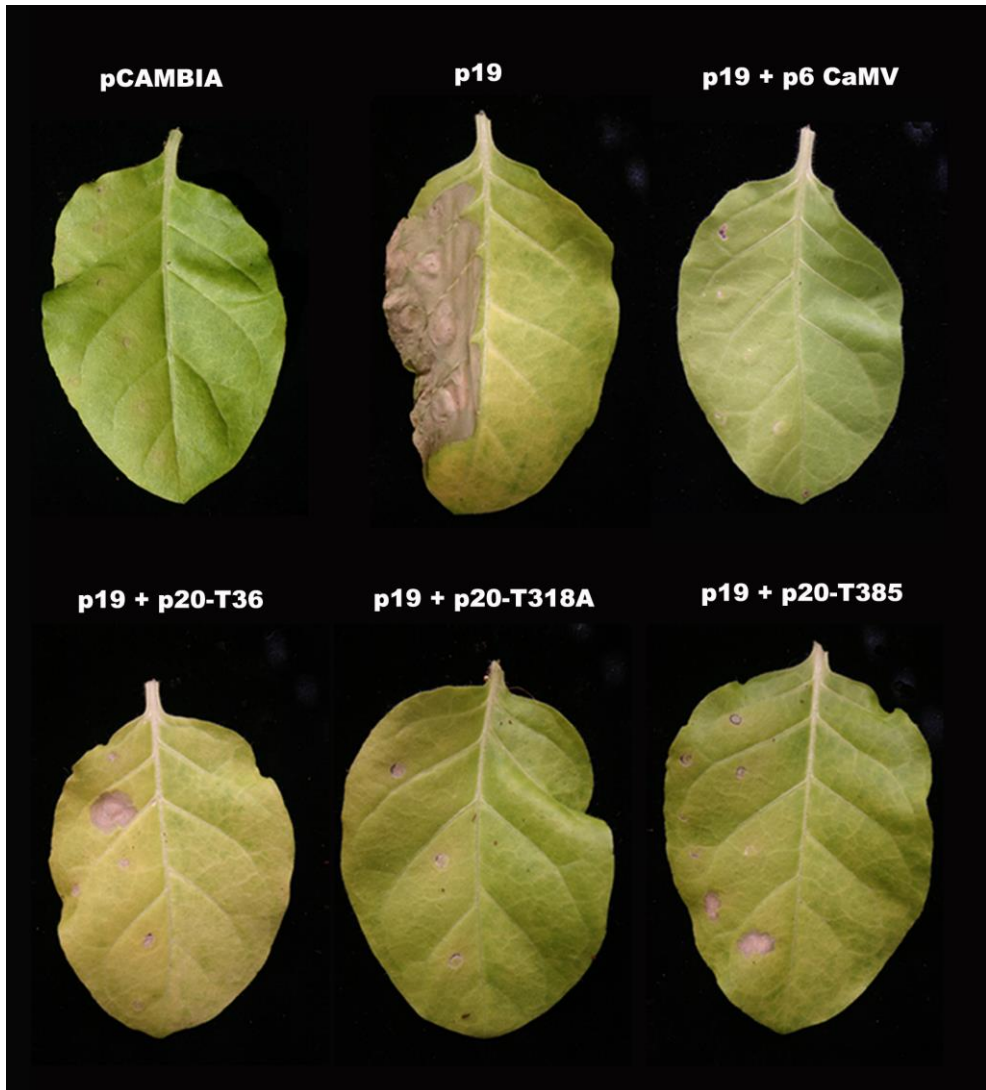


Figura 12a: Efecto supresor de la proteína p20 de los aislados de CTV T36, T318A y T385 sobre la ruta de señalización del AS. La actividad supresora se muestra como un retraso en la aparición de la necrosis inducida por la proteína p19 de TBSV en plantas de *N. tabacum*

Xanthi. Las hojas se infiltraron con cultivos de *A. tumefaciens* portadores del vector vacío pCAMBIA (control negativo), con el vector pBIN-19 (control positivo de HR), o se co-infiltraron con cultivos de *A. tumefaciens* portadores de pBIN-19 y de p6 de CaMV (control positivo de supresor del AS), o de pBIN-19 y pCAMBIA portador de *p20* de cada uno de los aislados de CTV. Las fotografías se tomaron a los 3 dpi.

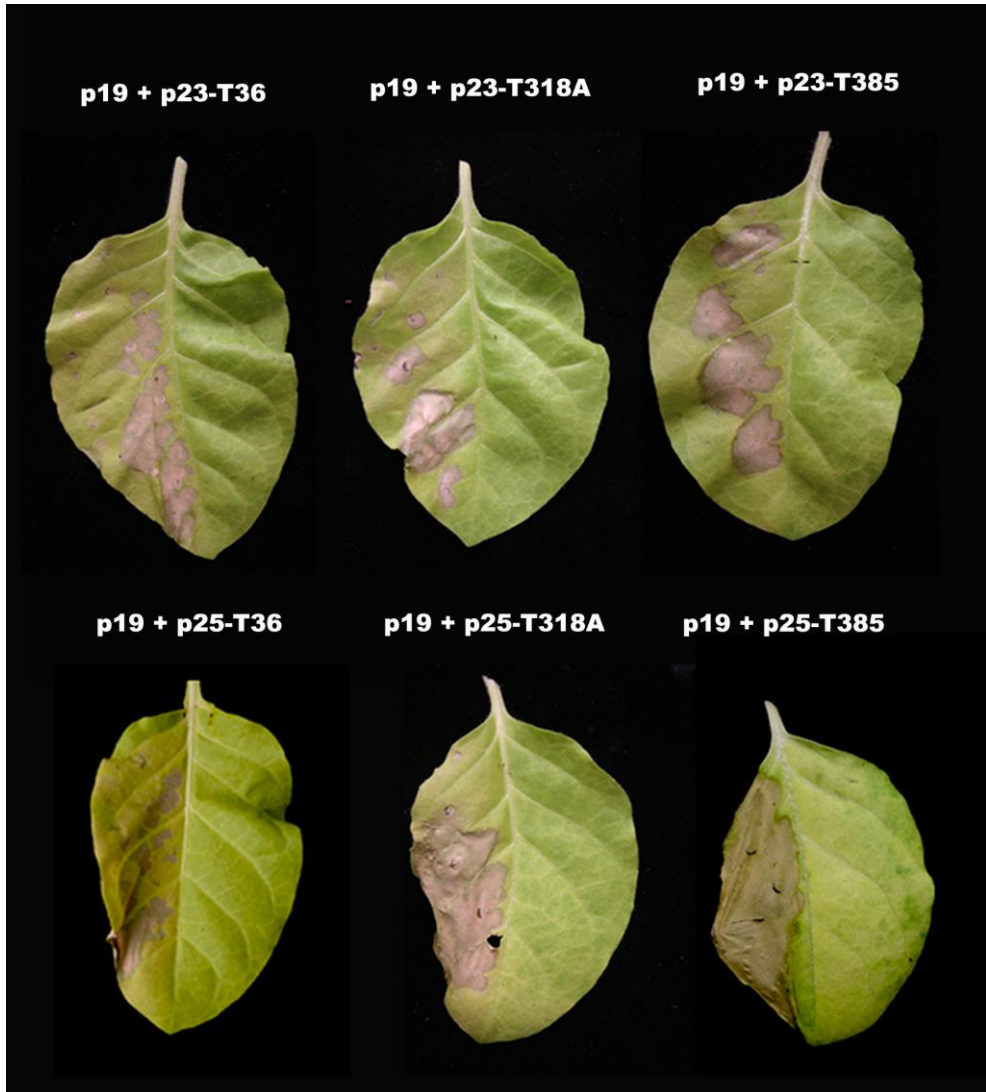
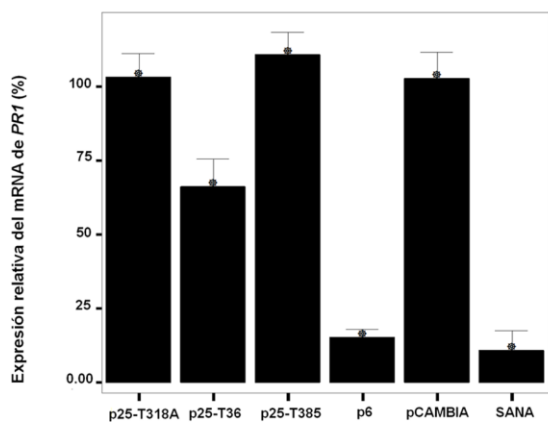
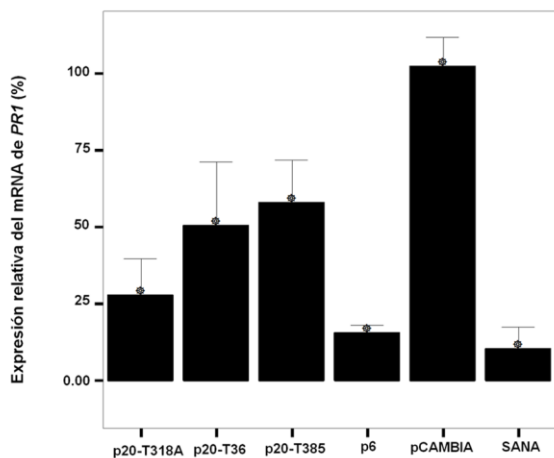


Figura 12b: Efecto supresor de las proteínas p23 y p25 de los aislados T36, T318A y T385 de CTV sobre la ruta de señalización del AS (como en Figura 12a).

3.5.2. Análisis de la expresión del gen *PR1a*

La expresión del gen *PR1a* en hojas *N. benthamiana* se induce tras la agroinfiltración de un plásmido binario como pCAMBIA. Sin embargo, esta respuesta puede ser suprimida cuando dicho plásmido expresa una proteína supresora de la ruta de señalización del AS, como la proteína p6 de CaMV. Para comprobar la capacidad supresora de las proteínas p20, p23 y p25 de CTV y confirmar los resultados del ensayo anterior, cultivos de *A. tumefaciens* portadores de las construcciones pCAMBIA-p20, pCAMBIA-p23 y pCAMBIA-p25 de los aislados de CTV T36, T318A y T385, se infiltraron en hojas totalmente expandidas de *N. benthamiana*. Plantas agroinfiltradas con un plásmido portador de p6 de CaMV se utilizaron como control positivo de supresión de *PR1a* (Lairs et al, 2013; Love et al, 2012). Mientras que plantas agroinoculadas con el vector pCAMBIA vacío o plantas sanas, se emplearon como control negativo de supresión de *PR1a* o control negativo de inducción de la ruta del AS, respectivamente. A los 3 dpi se extrajo el RNA de las zonas agroinfiltradas, se cuantificó la expresión del mRNA de *PR1a* mediante RT-qPCR y se calculó la expresión relativa de *PR1a* en las plantas agroinfiltradas con las distintas proteínas de CTV respecto a las agroinfiltradas con pCAMBIA vacío.

Las plantas agroinfiltradas con las construcciones de p20 o p23 de los tres aislados de CTV mostraron una fuerte reducción en los niveles de mRNA de *PR1a*, si bien este efecto supresor fue de nuevo menos intenso que el inducido por la proteína p6 de CaMV. La actividad supresora de las proteínas p20 y p23 de los aislados T318A y T36-GFP fue mucho mayor que la observada para las proteínas homólogas del aislado T385. De igual modo que en el experimento del retraso de la necrosis asociada a HR, sólo la proteína p25 del aislado T36-GFP produjo una reducción significativa en la expresión de mRNA de *PR1a* respecto al control pCAMBIA y respecto a sus proteínas homólogas de los aislados T318A y T385. La expresión relativa de cada muestra respecto al control pCAMBIA vacío, se comparó mediante análisis ANOVA de un factor (Figura 13). Estos resultados sugieren nuevamente, que las proteínas p20 y p23 de CTV y únicamente p25-T36 presentan actividad supresora de la ruta de señalización del AS y que ésta actividad tiende a ser mayor en las proteínas de los aislados más virulentos.



ANOVA	Sig ^a
p20-T318A	0,000 *
p20-T36	0,002 *
p20-T385	0,004 *
p23-T318A	0,002 *
p23-T36	0,000 *
p23-T385	0,008 *
p25-T318A	0,068
p25-T36	0,000 *
p25-T385	0,368

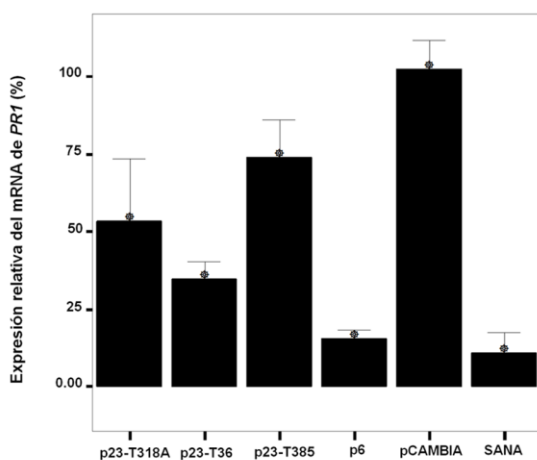


Figura 13: Efecto supresor de las proteínas p20, p23 y p25 de los aislados de CTV T36, T318A y T385 sobre la ruta de señalización del AS. La actividad supresora se evaluó estimando mediante RT-qPCR la acumulación relativa de mRNA de *PR1a* (%) en hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las construcciones pCAMBIA que expresan cada una de las proteínas de CTV en comparación con las infiltradas con pCAMBIA vacío (control negativo, 100% de expresión). Plantas infiltradas con la proteína p6 de CaMV se utilizaron como control positivo de actividad supresora. Las barras indican los valores de la desviación estándar y la tabla el análisis ANOVA de un factor realizado con el programa estadístico IBM SPSS vs17. ^aSignificación para un pvalor $\leq 0,05$. * Indica las diferencias significativas.

4. DISCUSIÓN

Estudios previos sobre la acumulación y distribución de CTV en diversos huéspedes mostraron que el NA presenta una resistencia inicial a la infección sistémica, que varía según los aislados del virus (Comellas, 2009). Así mismo, al estudiar el movimiento y distribución de una versión mutada del aislado T36 que expresa GFP, se observó que el número y tamaño de los núcleos de fluorescencia en la corteza de huéspedes susceptibles como *C. macrophylla* eran mayores que en la corteza de NA (Folimonova *et al.*, 2008). Los mecanismos de PTGS y/o de la ruta de señalización del AS están asociados a la defensa basal y a larga distancia frente a virus (Mandadi and Scholthof, 2013). En este trabajo se ha estudiado el efecto del silenciamiento de los genes *RDR1*, *NPR1* y *DCL2-4* asociados a estas rutas en la infección por CTV de plantas de NA amargo de semilla o propagado sobre limonero rugoso, mediante la técnica VIGS utilizando un vector viral basado en el genoma de CLBV. Las plantas de NA con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-DCL4* silenciados mostraron mayor acumulación de CTV que las plantas control. Éste aumento se observó con tres aislados diferentes del virus y tuvo lugar tanto en plantas de NA de semilla como en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso. Sin embargo, el silenciamiento de los genes *NPR3-NPR4* dio lugar a una disminución significativa en la acumulación de CTV en plantas de NA propagado sobre limonero rugoso en comparación con plantas control no silenciadas. Así mismo, en la corteza y la raíz de plantas de NA inoculadas con el aislado T36-GFP se observó un incremento en el número y tamaño de los focos con fluorescencia de GFP en plantas con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-DCL4* silenciados, respecto a plantas control no silenciadas o a plantas silenciadas para *NPR3-NPR4*, que se comportaron como las plantas control. El aumento de la fluorescencia de GFP

implica mayor movimiento célula a célula y a larga distancia, probablemente como consecuencia del silenciamiento parcial de las defensas basales de la planta. Globalmente, estos resultados indican que tanto el PTGS como la ruta de señalización del AS están involucrados en la resistencia del NA frente a CTV.

El gen *RDR1* está implicado en las defensas de las plantas frente a virus y participa tanto en PTGS como en la ruta de señalización del SA (García-Ruiz *et al.*, 2010). La expresión de este gen está inducida por tratamientos con AS o por infecciones virales (Yu *et al.* 2003; Xie *et al.*, 2001). Los mutantes *rdr1* de *A. thaliana* presentaron una marcada susceptibilidad frente a infecciones por TMV (Yu *et al.*, 2003). Así mismo, plantas de *N. benthamiana* transformadas con el gen *RDR1* de *Medicago truncatula*, mostraron resistencia a infecciones por tobamovirus, resistencia que no se observa en las plantas *N. benthamiana* no modificadas (Yang *et al.*, 2004). Además, la expresión del gen *RDR1* en cítricos se ve incrementada en plantas de LM infectadas por CTV (Gandía *et al.*, 2007).

La proteína NPR1 actúa como regulador clave en la ruta de señalización del AS (Wu *et al.*, 2012). La acumulación de NPR1 es necesaria para la expresión de los genes de defensa basal, mientras que se requiere su posterior degradación para desencadenar la SAR. La proteína NPR1 es necesaria para inducir la expresión de los genes *PR* dependientes del AS y para la resistencia a patógenos en *A. thaliana* (Dong, 2004). Así, plantas mutantes *npr1* mostraron un aumento de la susceptibilidad frente a distintos patógenos (Zhang *et al.*, 2006). El bloqueo de la degradación de la proteína NPR1 con inhibidores proteosómicos o mediante mutantes de pérdida de función del gen *cullin 3* (*cul3*, componente de la ligasa ubiquitina cullin-RING) en *A. thaliana*, incrementa la resistencia basal pero bloquea la respuesta SAR (Spoel *et al.*, 2009). Del mismo modo, el doble mutante *npr3-npr4* de *A. thaliana* mostró un aumento de la resistencia a la enfermedad al incrementar la defensa basal, mientras que el triple mutante *npr1-npr3-npr4* mostró el fenotipo del mutante simple *npr1*, con una susceptibilidad aumentada a patógenos. Esto indica que el aumento de resistencia del doble mutante *npr3-npr4* es dependiente de NPR1 (Zang *et al.*, 2006). De hecho, los genes *NPR3* y *NPR4* interactúan directamente con *cul3* en la degradación de la proteína NPR1 (Fu *et al.*, 2012), interacción que es mediada por el AS.

Finalmente, las enzimas DCL2 y DCL4 son las responsables de la generación de los siRNAs derivados de los virus (García-Ruiz *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2005). La

pérdida de la función de estos genes en mutantes *dcl2-dcl4* es suficiente para comprometer la defensa de la planta y aumentar significativamente su susceptibilidad frente a virus de RNA (Deleris *et al.*, 2006). En cítricos infectados con CTV se encontró, mediante la técnica de secuenciación masiva, que los siRNAs más abundantes eran los de 21-22 nt (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Estos siRNAs están producidos por DCL2 y DCL4, lo que sugiere que ambos genes están implicados en la defensa frente a CTV mediante PTGS.

La intensidad de los síntomas inducidos en plantas de NA por los diferentes aislados de CTV no se correlacionó con el título viral alcanzado por cada aislado en dichas plantas. Esto sugiere que la sintomatología de CTV depende más de las características patogénicas de cada aislado que de la acumulación de los mismos. Se ha demostrado que la región 3'-terminal en el genoma de CTV incluyendo el gen *p23* y la 3'UTR es responsable del síndrome de SY (Albiach-Martí *et al.*, 2010). En este estudio no se encontró una correlación entre la cantidad expresada de *p23* y la intensidad de los síntomas de SY inducidos por el aislado T36 o el híbrido T36/T30, que no induce SY en NA, lo que sugiere que los síntomas de SY están determinados por la secuencia de *p23* de cada aislado y no por su mayor o menor acumulación en la planta (Albiach-Martí *et al.*, 2010). En el mismo sentido, estudios con clones infecciosos de CMV preparados con distintas versiones del gen *2b* mostraron que la sintomatología inducida no dependía de la acumulación viral, sino de la secuencia del gen *2b* (Shi *et al.*, 2002).

Las plantas de semilla de NA inoculadas con los aislados de CTV que producen SY (T36-GFP y T318A) mostraron mayor acumulación viral en la corteza que en la raíz. En cambio, la mayor carga viral en plantas infectadas con el aislado asintomático T385 se situó en la raíz, alcanzando valores más altos que los aislados virulentos. Éste tropismo apoya resultados anteriores que mostraban que las raíces de cítricos considerados resistentes a CTV podían infectarse, a pesar de la incapacidad del virus para multiplicarse en los brotes, y que esta capacidad de infección dependía de los aislados de CTV (Harper *et al.*, 2010). En vista de estos resultados, se podría especular que la expresión de la defensa antiviral en los cítricos es menos efectiva en las raíces que en la corteza. Andika y colaboradores (2005; 2013) ya observaron este fenómeno en plantas de *N. benthamiana*, donde la defensa frente a virus es menos eficiente en las raíces que en la parte aérea. Ésto daría lugar a un reservorio en la raíz que, posteriormente, podría servir de fuente de viriones capaces de superar la defensa basal e invadir los tejidos aéreos

de la planta, como parece ocurrir con el aislado de CTV T385 en cítricos (Comellas, 2009 y el presente trabajo). A favor de ésta hipótesis está el hecho que el mRNA de *NPR1* no se detecte en las raíces de NA mediante RT-qPCR y que el aislado T385 tarde mucho tiempo en alcanzar un título viral alto en las partes aéreas de la planta.

La acumulación viral variable encontrada en la corteza de plantas de NA infectadas con diferentes aislados de CTV puede ser debida, en parte, a la distinta capacidad de sus proteínas p20 y p23 para suprimir la ruta de señalización del AS, dado que la capacidad supresora de estas proteínas resultó ser mayor en los aislados de CTV que presentan una sintomatología más intensa en NA. Lo que refuerza que las interacciones entre el virus y los factores de la planta requeridos para la multiplicación y movimiento del mismo, puedan diferir dependiendo del aislado y del huésped utilizado (Harper *et al.*, 2014; Tatineni *et al.*, 2011). La expresión ectópica de la proteína p23 del aislado de CTV T36 en plantas transgénicas incrementó la acumulación de T36 en NA pero no en LM o ND que son especies susceptibles a CTV (Fagoaga *et al.*, 2011). La proteína p23 de CTV ha resultado ser un supresor tanto de PTGS como de la ruta de señalización del SA, por lo que estos resultados refuerzan la idea de que ambas rutas están involucradas en la resistencia del NA frente a CTV. De hecho, se han descrito diversas proteínas con actividad supresora de ambas rutas en otros virus, como es el caso de las proteínas 2b de CMV (Hui and Ding, 2001), HC-Pro de los potivirus (Alamillo *et al.*, 2006) o p6 de CaMV (Lairs *et al.*, 2013; Love *et al.*, 2012).

Las plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso, silenciadas para *NPR3-NPR4* e infectadas con el aislado de CTV T318A mostraron menos enanismo que las plantas no silenciadas. El enanismo inducido por CTV en variedades de cítricos propagadas sobre NA, observado en campo, está generalmente asociado a la necrosis del floema en la zona de unión patrón-injerto. Esta necrosis podría deberse a que CTV indujese una PDC en el patrón NA para impedir la diseminación del virus. La reducción del floema funcional causaría la muerte radicular y ésta a su vez, un deficiente suministro de agua y sales minerales a la parte aérea, dando lugar a la aparición de los síntomas de decaimiento y SP típicos de los aislados más agresivos de CTV. Sin embargo, el mayor crecimiento de las plantas de NA con los genes *NPR3-4* silenciados podría deberse a que, en dichas plantas silenciadas, la PDC esté comprometida.

Al mismo tiempo, la acumulación de NPR1 aumentaría la defensa basal de las plantas reduciendo así la carga viral. De hecho, el doble mutante *npr3-npr4* de *A. thaliana* infectadas con patógenos virulentos mostraron un deterioro significativo de los síntomas de la respuesta ETI, respecto a las plantas control no mutadas (Fu *et al.*, 2012). Sin embargo, el hecho de que en nuestro experimento las plantas control no mutadas de NA propagadas sobre limonero rugoso e infectadas con CTV T318A no llegasen a mostrar necrosis junto a la línea de injerto impidió determinar la implicación de los genes *NPR3-NPR4* y la proteína NPR1 en dicha necrosis. La ausencia de necrosis en las plantas control no mutadas podría ser debido a que i) para la inducción de necrosis parecen ser necesarios periodos más largos de infección y ii) la cantidad de viriones que llegan al NA desde una variedad susceptible a CTV, sería mayor cuando la variedad susceptible se usa como injerto en vez de como patrón (lo cual es común en campo donde sí se observa necrosis). En apoyo a la primera idea, está la observación que, en invernadero, las plantas de ND propagadas sobre NA e infectadas por CTV durante 1-2 años no mostraron el síndrome de decaimiento, a pesar que los aislados de CTV utilizados provenían de árboles decaídos en campo (Ballester-Olmos *et al.*, 1993 y el presente trabajo).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el NA presenta una clara resistencia inicial frente a la invasión por CTV y que ésta varía dependiendo del aislado. Puesto que la acumulación de CTV en protoplastos de NA es similar a la observada en protoplastos de huéspedes susceptibles (Albiach Martí *et al.*, 2004), la resistencia del NA debe ser consecuencia de una deficiencia en el movimiento célula a célula o a larga distancia. El silenciamiento de los genes asociados a PTGS o a la ruta de la señalización del AS en plantas de NA, mejora ambos tipos de movimiento viral. Comellas (2009) observó que en los huéspedes susceptibles inoculados con CTV, la mayor acumulación viral y de siRNAs derivados de CTV se detectó en la primera brotación, mientras que en las plantas de NA el título viral aumentaba en brotaciones sucesivas a lo largo de los dos primeros años y los siRNA derivados de CTV no se detectaban hasta un año después de la inoculación (aproximadamente en la 4ª brotación). Así mismo, en huéspedes susceptibles infectados con CTV como la LM, el 53.3% de los siRNAs detectados mediante secuenciación masiva eran derivados de CTV, mientras que en las plantas de NA infectadas con CTV únicamente el 3,5% de los siRNAs provenían del virus (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que la resistencia inicial a la acumulación de CTV en el NA es debida al

desencadenamiento de la ruta de señalización del SA más que a PTGS y que éste último se induciría en fases posteriores, una vez que el virus ha alcanzado una acumulación suficiente. Aunque tampoco puede descartarse la activación de otras rutas de defensa alternativas.

La importancia relativa de estas dos rutas de defensa en la resistencia del NA frente a CTV es difícil de analizar, ya que existen claras evidencias de la interconexión entre ambas rutas. Así, los tratamientos con AS incrementan la expresión del gen *RDR1* (también implicado en PTGS) en plantas de *N. tabacum* y *A. thaliana* (Alamillo *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2013). La acumulación de siRNAs derivados del virus de la viruela del ciruelo (*Plum pox virus*, PPV) se redujo en plantas de *N. tabacum* que expresan la enzima hidrolasa salicilato (NahG) que degrada el AS (Alamillo *et al.*, 2006). Además, en plantas de tomate infectadas con TMV o con tratamientos de AS se indujo la expresión de los genes *DCL1*, *DCL2*, *RDR1* o *RDR2* (Campos *et al.*, 2014), comúnmente asociados a la ruta PTGS.

Finalmente, las diferencias de acumulación y distribución de los distintos aislados de CTV en NA, podrían ser debidas, en parte, a la distinta capacidad de supresión de la ruta de señalización del AS que presentan sus proteínas p20 y p23. Esta capacidad supresora parece mayor en las proteínas de los aislados más virulentos de CTV en NA.

DISCUSIÓN GENERAL

La enfermedad de la tristeza causada por CTV ha sido responsable de la muerte, tan sólo en España, de alrededor de 50 millones de árboles de ND, mandarino y pomelo injertados sobre NA. Aunque algunos de los aislados son esencialmente asintomáticos, la mayoría de ellos pueden causar uno o más de los síndromes de tristeza, SP o SY. La progresiva sustitución del NA por otros patrones tolerantes al decaimiento (Moreno y Garnsey, 2010) permitió evitar los daños de la tristeza en campo. No obstante, el NA sigue siendo un patrón muy deseable por sus excelentes cualidades agronómicas. Los aislados que se dispersan en España sólo inducen el decaimiento de árboles de ND, mandarino y pomelo injertados sobre NA pero no inducen daños directos sobre las variedades, por lo que el uso de patrones tolerantes es suficiente para su control. Sin embargo, en otros países encontramos aislados de CTV más virulentos que inducen daños directos sobre ND o pomelo. Estos aislados pueden llegar a ser introducidos en España (Moreno *et al.*, 1993). Para el control de los aislados más virulentos de CTV se requiere desarrollar métodos rápidos y sensibles en la identificación de los mismos. Para ello, sería necesario conocer los determinantes de patogenicidad asociados a los síndromes de SP y decaimiento mediante el uso de un sistema genético basado en la utilización de clones infecciosos de cDNA del virus. Ésto, ayudaría a recuperar el uso del NA como patrón, lo cual sería de máximo interés para la citricultura española.

Al inicio de esta tesis el único clon infeccioso funcional del que se disponía era el del aislado T36 de Florida (Satyanarayana *et al.*, 1999; 2001) que no causa SP en ND ni pomelo. Para estudiar las secuencias o determinantes del virus responsables de la inducción del síndrome SP era conveniente disponer de un clon infeccioso de cDNA de un aislado de CTV inductor de SP en dichos huéspedes, y poder sustituir en el mismo distintos fragmentos del genoma por sus homólogos de un aislado asintomático. En nuestro laboratorio se disponía de clones de longitud completa del aislado severo de origen español T318A, si bien su agroinoculación en hojas de *N. benthamiana* nunca produjo infección sistémica (Ruiz-Ruiz, 2009; Ambrós *et al.*, 2013). Dado que estos clones tenían varias mutaciones en el gen *p27* que podían causar su incapacidad para invadir *N. benthamiana*, se procedió a la corrección de dichas mutaciones y se insertó el gen marcador *gfp* para poder visualizar la distribución del virus en la planta. La agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* wt y *RdRp6i* con los nuevos clones de T318A de longitud completa obtenidos en este trabajo, dio lugar a replicación viral en los primeros días tras la inoculación. Sin embargo, esta replicación,

quedaba reducida a células individuales o a pequeños grupos celulares, y la cinética de acumulación del gRNA era muy diferente a la observada para el clon infeccioso de T36. Así, mientras los gRNA de T36 se acumulaban hasta 28 dpi y los viriones invadían sistémicamente la planta, los gRNA de T318A disminuían a partir de los 14 dpi y eran prácticamente indetectables a partir de 21 dpi.

Este comportamiento diferencial entre los aislados T36 y T318A podría ser debido a diferencias en su interacción con factores del huésped. Esta idea se ve reforzada por las diferencias que hemos encontrado en el estudio de la interacción entre las proteínas p20 y p25 de ambos aislados y las proteínas del huésped *N. benthamiana*. A lo largo de este trabajo se ha mostrado que dichas diferencias afectan a factores de la planta posiblemente involucrados en el movimiento a través de los plasmodesmos y en los procesos de defensa de la planta frente a la infección. Así, la proteína p20-T36 podría interactuar con la proteína CERK1 relacionada con el reconocimiento extracelular de secuencias PAMPs producidas por patógenos (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009a) y con SABP3 de la ruta del AS (Wang *et al.*, 2009), lo que ayudaría a T36 a evadir la defensa basal de la planta. Así mismo, la proteína p25 del aislado T36 interaccionaría con factores del citoesqueleto como la β -tubulina y los factores de despolimerización de la actina, que intervienen en la formación de los microtúbulos y son esenciales para el movimiento célula a célula de los viriones. Por el contrario, p25-T318A no muestra interacción potencial con dichos factores. Adicionalmente, p25-T318A pero no p25-T36, mostró interacción potencial con la PR4 y la TRX-H9, ambas involucradas en procesos de infección. El mRNA de PR4 aumenta en infecciones cursadas por TCV (Bertini *et al.*, 2012) y la TRX-H9 actúa como una de las enzimas que participan en la degradación de NPR1 citoplasmática necesaria para la activación de los genes PR (Tada *et al.*, 2008) y como reguladora esencial de la homeóstasis redox para prevenir el daño celular (Meng *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016). La interacción directa de p25-T318A con TRX-H9, confirmada mediante la técnica BIFC en esta tesis, sugiere que el movimiento de T318A en *N. benthamiana* podría verse dificultado por dicha interacción, como consecuencia de la alteración de la defensa de la planta, o bien que su secuestro aumente el daño oxidativo celular al ver alterada su función aumentando la muerte celular. El hecho de que p25-T318A tenga una localización citoplasmática mientras que p25-T36 la tenga nuclear, es consistente con la interacción diferencial de dichas proteínas virales con TRX-H9 y podría explicar, en parte, la distinta capacidad infectiva de T36 y T318A en *N. benthamiana*.

La interacción específica de ambas p20 y p25 con las proteínas de defensa de la planta AGO1 y AGO4, demostrada por BIFC en este trabajo, y en el caso de AGO4 también por doble híbrido en levadura, corroboraría la implicación de estas proteínas en contrarrestar las defensas de la planta. Así mismo, la variada red de interacciones proteínas virus-proteínas huésped observada, refuerza la capacidad multifuncional de p20 y p25, incluyendo su papel como supresores del PTGS a corta y/o larga distancia previamente descrito (Lu *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2007), y su posible implicación como proteínas de movimiento. Estos hallazgos abren el camino para estudiar posibles rutas metabólicas asociadas a la inducción de los síntomas por el virus.

Por otra parte, los estudios proteómicos llevados a cabo sugieren que la incapacidad del clon T318A para infectar sistémicamente *N. benthamiana*, podría ser debida en parte a la reducida red de interacciones de p25-T318A con factores de la planta, particularmente con las proteínas del citoesqueleto celular, que dificultaría el movimiento célula a célula de los viriones de T318A. La incapacidad de movimiento de este aislado también podría ser explicada por un mal ensamblaje de los viriones, que es fundamental para el movimiento de los closterovirus. La cinética de acumulación del gRNA de los clones de T318A estudiados en esta tesis y la no detección de p25 mediante ELISA, también podría apoyar la hipótesis de un ensamblaje deficiente de T318A en *N. benthamiana*.

La diversidad en el tipo e intensidad de los síntomas inducidos por CTV, varía en función de los aislados virales y del huésped utilizado, lo que sugiere la existencia de múltiples interacciones diferenciales virus-planta entre aislados y especies hospedadoras. En campo, las plantas propagadas sobre NA infectadas con CTV suelen presentar necrosis en los tubos cribosos por debajo de la línea de injerto. Esta necrosis en el NA podría ser consecuencia de la activación de los mecanismos de defensa del NA, en particular de las rutas de señalización del AS y PTGS para prevenir o retrasar la invasión y acumulación de CTV. Existen evidencias indirectas de la resistencia del NA a la acumulación y movimiento del virus (Comellas, 2009; Folimonova *et al.*, 2008), avaladas por los resultados obtenidos en este trabajo. En interacciones incompatibles patógeno-planta la acumulación de AS desencadena la ETI y PCD en la zona de infección, así como la SAR, ésta última requiere de una fase de degradación de su proteína reguladora NPR1. Por el contrario, el PTGS se desencadena por la presencia de dsRNA, que mediante la acción de diferentes

proteínas (DLC, AGO y RDR) y vía la formación de siRNAs, provoca la degradación de RNAs homólogos.

El silenciamiento de los genes *RDR1*, *NPR1*, *DCL2-4* y *NPR3-4* del NA, implicados en estas rutas de defensa, mediante VIGS y la posterior infección de estas plantas con distintos aislados de CTV: i) confirmó que el NA presenta una clara resistencia inicial frente a la invasión por CTV y que ésta varía dependiendo del aislado y ii) puso de manifiesto que el silenciamiento de las rutas de defensa mejora el movimiento viral célula a célula y a larga distancia. Nuestros resultados y los datos previos disponibles (Comellas, 2009) indican que la resistencia inicial a la acumulación de CTV en NA sería inicialmente debida al desencadenamiento de la ruta de señalización del AS, mientras que la del PTGS se iniciaría en fases posteriores, una vez que el virus ha alcanzado una acumulación suficiente para inducirlo (Comellas 2009; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2011). Las plantas de NA con los genes *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-DCL4* silenciados, mostraron mayor acumulación de CTV que las plantas control. Este aumento se observó con tres aislados patogénicamente diferentes de CTV (T36, T318A y T385) y tuvo lugar tanto en plantas de NA de semilla como en plantas de NA propagadas sobre un patrón susceptible a CTV como el limonero rugoso. Sin embargo, el silenciamiento de los genes *NPR3-NPR4* dio lugar a una disminución significativa en la acumulación de CTV en plantas de NA propagado y un aumento del crecimiento, incluso en plantas infectadas con el aislado virulento T318A, en comparación con plantas control no silenciadas. El enanismo causado por CTV en las combinaciones con NA está generalmente asociado a la necrosis del floema en la zona de unión patrón-injerto, probablemente debida a una PDC que impide la diseminación del virus. Sin embargo, la no degradación de NPR1 en las plantas de NA silenciadas para *NPR3-NPR4* podría comprometer la PDC del NA frente a CTV, facilitando así el flujo de agua y nutrientes entre el patrón y la variedad y permitiendo el crecimiento de la planta. Así, se ha observado que plantas de *A. thaliana* con los genes *npr3-npr4* mutados mostraron un deterioro significativo de los síntomas de PCD y ETI, respecto a las plantas control no mutadas, al ser infectadas con patógenos virulentos (Fu *et al.*, 2012). Así mismo, la no degradación de NPR1 aumentaría la defensa basal de las plantas, reduciendo la carga viral. No obstante, aunque esta explicación resulta verosímil, la disminución de la necrosis en el NA propagado sobre limonero rugoso, no pudo ser contrastada en la presente tesis al no observarse necrosis en las plantas control en nuestras condiciones experimentales.

La intensidad de los síntomas inducidos en plantas de NA por los diferentes aislados de CTV no muestra correlación con el título viral alcanzado por cada aislado en dichas plantas. Así, el aislado asintomático T385 es capaz de alcanzar en corteza de NA de semilla, títulos más elevados que T36, un aislado de virulencia intermedia. Este hecho, sugiere que la sintomatología de CTV depende más de las características patogénicas de cada aislado que de la acumulación de los mismos. Sin embargo, sí se observó una asociación entre la virulencia de los aislados y su distribución en la planta. Así, los aislados inductores de SY (T36 y T318A) mostraron mayor acumulación viral en los brotes que en la raíz, mientras que el aislado asintomático T385 mostró mayor carga viral en la raíz que en los brotes. Este tropismo apoya resultados anteriores en los que algunos aislados de CTV infectaban las raíces de cítricos considerados resistentes (Harper *et al.*, 2010). Estos resultados y la aparente ausencia de expresión del gen *NPR1* en la raíz del NA sugieren que los mecanismos de defensa en este órgano podrían ser menores que en la parte aérea de la planta, pudiendo constituir un reservorio viral que, posteriormente, serviría como fuente de viriones para invadir poco a poco la parte aérea, tal y como se observó con el aislado T385 (Comellas, 2009 y el presente trabajo).

Los datos obtenidos en este trabajo indican que tanto el PTGS como la ruta de señalización del SA están involucrados en la resistencia del NA frente a CTV. El hecho de que las proteínas p20 y p25 de CTV interaccionen con diferentes proteínas de ambas rutas como AGO1, AGO4, TRX-H9 directamente, y putativamente con PR4, SABP3, confirmaría esta hipótesis. Así mismo, las diferencias en la acumulación viral encontrada en la corteza de plantas de NA infectadas con diferentes aislados de CTV puede ser debida, en parte, a la distinta capacidad de sus proteínas p20 y p23 para suprimir la ruta de señalización del AS. De hecho, los análisis de supresión realizados demostraron que la capacidad supresora de la ruta del AS de estas proteínas es mayor en los aislados más virulentos de CTV.

La diferente sintomatología observada tanto en el huésped experimental *N. benthamiana* como en NA puede ser explicada, en gran parte, por la interacción diferencial de las proteínas virales con la planta. Así mismo, los estudios llevados a cabo en esta tesis refuerzan el carácter multifuncional de dichas proteínas virales y demuestran su importante papel en la superación de las defensas de la planta para conseguir la infección sistémica.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los clones de longitud completa del aislado virulento T318A restaurados y marcados con *gfp*, se replican en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Sin embargo, su replicación queda restringida a células aisladas sin existir movimiento célula a célula o a larga distancia.
2. La cinética de acumulación del gRNA de los clones T318A-GFP difiere de la del clon infeccioso del aislado T36. Así, T318A alcanza un máximo a los 14 dpi y luego decae hasta hacerse indetectable, mientras que el gRNA de T36 aumenta con el tiempo hasta producir una infección sistémica al cabo de un mes aproximadamente.
3. El estudio proteómico de la interacción entre las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A y las del huésped *N. benthamiana*, muestra una extensa red de proteínas de la planta como potenciales interactores como proteínas del fotosistema, metabolismo celular, metabolismo de proteínas o lípidos, organización citoesquelética de la célula y proteínas relacionadas con diferentes rutas de defensa de la planta. Ello refuerza el carácter multifuncional de estas proteínas virales.
4. La escasa red de interacción de la proteína p25-T318A con proteínas de *N. benthamiana* y la ausencia de interacción con proteínas del citoesqueleto celular implicadas en el movimiento de viriones célula a célula explica, en parte, la incapacidad de T318A para inducir una infección sistémica en *N. benthamiana*.
5. La interacción específica de las proteínas p20 y p25 de los aislados T36 y T318A con AGO1 y AGO4, demostradas mediante BIFC y también mediante doble híbrido de levadura en el caso de AGO4, refuerza el papel que juegan estas proteínas virales como supresores del PTGS en *N. benthamiana*.
6. La interacción directa de p25-T318A con la TRX-H9, demostrada mediante BIFC, es consistente con su localización citoplasmática, en contraste con la proteína homóloga de T36. La relación de las tioredoxinas tipo h con la degradación de la proteína citoplasmática NPR1, proteína implicada en la activación de las rutas de defensa del AS, los genes PR, la HR o la SAR, y

concretamente la implicación de la TRX-H9 en la regulación de la homeóstasis redox, relacionan directamente a p25-T318A con estas rutas de defensa.

7. Las plantas de NA silenciadas para *RDR1*, *NPR1* o *DCL2-DCL4* e infectadas con los aislados T36, T318A y T385 de CTV muestran mayor acumulación viral que las plantas control, tanto en plantas de semilla como en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso, lo que apoya la implicación de las rutas del AS y del PTGS en la defensa del NA frente a CTV.
8. Por el contrario, el silenciamiento de los genes *NPR3-NPR4* en plantas de NA propagadas sobre limonero rugoso e inoculadas con CTV da lugar a una disminución significativa de la acumulación viral y un aumento del crecimiento en comparación con las plantas control no silenciadas, en parte, debido a un incremento de *NPR1* que aumenta la defensa basal de las plantas silenciadas.
9. La distribución de los aislados de CTV en NA aparece asociada con la virulencia de los mismos. Así, mientras las plantas inoculadas con aislados productores de SY (T36 y T318A) muestran mayor acumulación viral en los brotes que en la raíz, las infectadas con el aislado asintomático T385 muestran mayor carga viral en la raíz que en los brotes, lo que apoya la idea de que las raíces de NA constituyen un reservorio para los aislados menos virulentos de CTV.
10. Las proteínas p20 y p23 de los aislados T36, T318A y T385, además de suprimir el PTGS, presentan función supresora de la ruta del AS, mostrando los aislados más virulentos mayor capacidad supresora. Por el contrario, sólo la proteína p25 del aislado T36 mostró una supresión significativa de la ruta del AS.

ANEXO

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT4G00630	KEA2, BOMBA DE EXPORTACIÓN DE K ⁺ 2
AT5G05000	TOC34, TRANSLOCÓN EXTERIOR 34 DE LA MEMBRANA DEL CLOROPLASTO
AT4G03280	PGR1, ELECTRON TRANSFERASA C FOTOSINTÉTICA
AT1G08490	ATSUFS, DESULFURASA CLOROPLÁSTICA TIPO CISTEINA: "NIFS-LIKE"
AT2G20260	PSAE-2, SUBUNIDAD E2 DEL FOTOSISTEMA I
Defensa	
AT5G17330	GAD1, GLUTAMATO DECARBOXILASA
AT1G55150	RH20, RNA HELICASA 20
AT3G14470	PROTEÍNA QUE CONTIENE EL DOMINIO NB-ARC RELACIONADO CON RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD
AT4G00660	RH8, HELICASA RNA 8
AT5G67500	VDAC2, CANAL DE VOLTAGE 2 DEPENDIENTE DE ANIONES
AT3G21630	CERK1, RECEPTOR QUINASA LysM TIPO Bti9
AT3G01500	SABP3, PROTEÍNA 3 DE UNIÓN A ÁCIDO SALICÍLICO
Unión a proteínas	
AT5G61210	SNP33, FACTOR ADAPTADOR DE LA PROTEÍNA 33 N-ETHYLMALEIMIDA
AT4G34110	ATPAB2, PROTEÍNA 2 DE UNIÓN A POLY(A)
AT5G56500	CPN60BETA3, CHAPERONINA 60 BETA 3
AT5G19400	SMG7 (PROTEÍNA DE ACTIVIDAD TELOMERASA PROTECTORA)
Transporte	
AT3G16240	DELTA-TIP1, PROTEÍNA INTEGRAL DELTA DEL TONOPLASTO
AT5G46110	TPT, TRANSLOCADOR TRIOSA-FOSFATO / FOSFATO
AT5G52450	MATE, FAMILIA DE PROTEÍNAS DE EXPORTACIÓN
AT4G24570	DIC2, TRANSPORTADOR DICARBOXILATO 2
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT5G43940	ADH2, ALCOHOL DESHIDROGENASA 2
AT2G33220	PROTEÍNA GRIM-19
AT4G28510	PHB1, PROHIBITINA 1
AT2G18450	SDH1-2, SUCCINATO DESHIDROGENASA 1-2
AT1G17180	GSTU25, GLUTATHION S-TRANSFERASA TAU 25
AT3G55610	P5CS2, DELTA 1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO SINTETASA 2
Glicolisis	
AT3G12780	PGK1, FOSFOGLICERATO QUINASA 1
Biosíntesis de proteínas	
AT5G23540	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA Mov34/MPN/ PAD-1

AT3G44890	RPL9, PROTEÍNA RIBOSOMAL L9
AT1G12360	SEC11, SUBUNIDAD CATALÍTICA DEL COMPLEJO DE SEÑAL PEPTIDASA
Catabolismo proteínas	
AT5G13520	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA PEPTIDASA M1
AT3G48340	CEP2, CISTEÍN ENDOPEPTIDASA 2
AT4G05050	UBQ11, UBIQUITINA 11
Unión a ácidos nucleicos	
AT2G32080	PUR ALPHA-1, PROTEÍNA ALFA 1, RICA EN PURINAS
AT5G23710	PROTEÍNA RNA POLIMERASA DEPENDIENTE DE DNA
AT3G21175	GATA24, FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GATA 24
AT3G28580	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA SUPER FAMILIA NUCLEOTIDA TRIFOSFATO HIDROLASA
AT1G06920	OPF4, PROTEÍNA DE LA FAMILIA "OVATE" 4
AT5G35695	NUCELASA "HARBI1-like"
AT1G17370	UBP1B, PROTEÍNA DE UNIÓN OLIGOURIDILATO 1B
AT2G21660	PROTEINA RICA EN GLICINA 7
AT1G28370	ERF11, FACTOR DE RESPUESTA A ETILENO (ERF) 11
AT1G29880	SINTETASA/LIGASA tRNA-GLICIL
AT2G43640	SRP9, SEÑAL DE RECONOCIMIENTO 9
AT3G01540	DRH1, RNA HELICASA "DEAD BOX" 1
Unión a ATP	
AT5G40010	AATP1, AAA-ATPASA 1
Respuesta a estrés	
AT3G47340	ASN1, SINTETASA GLUTAMINA-ASPARAGINADEPENDIENTE 1
AT2G27140	HSP20, SUPERFAMILIA DE CHAPERONAS
AT5G52640	HSP90, PROTEINA 90 DE CHOQUE TÉRMICO
AT3G15730	PLD1, FOSFOLIPASA D ALFA 1
AT5G37770	CML24, CALMODULINA 24
AT2G43230	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE QUINASAS
AT1G75690	LQY1, PROTEÍNA 1 DE BAJO RENDIMIENTO QUANTUM DEL FOTOSISTEMA II
AT3G44110	ATJ3, PROTEÍNA HOMÓLOGA A DNAJ 3 DE <i>E. coli</i>
AT2G42010	PLDBETA, FOSFOLIPASA D BETA 1
AT1G65930	CICDH, ISOCITRATO DESHIDROGENASA NADP+ CITOSÓLICO DEPENDIENTE
Citoesqueleto	
AT5G37478	TPX2, PROTEÍNA DE LA FAMILIA Xklp2
Función desconocida	

AT1G23710

PROTEÍNA DESCONOCIDA (DUF1645)

Tabla 1: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar sólo con la proteína p20 del aislado T36, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT4G15530	PPDK1 PIRUVATO FOSFATO DESQUITINASA 1
AT1G06430	FTSH8, FTSH PROTEASA 8
AT4G35250	HCF244, PROTEÍNA CLOROFILA FLUORESCENTE FENOTIPO 244
AT2G34420	LHCB1.5, GEN 1,5 DEL COMPLEJO "LIGHT HARVESTING" DEL FOTOSITEMA II
AT3G14940	PPC3, FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA 3,
AT1G12000	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA FOSFOFRUCTOQUINASA
AT5G56350	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA PIRUVATO QUINASA
AT1G76550	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA FOSFOFRUCTOQUINASA
Defensa	
AT4G29040	RPT2A, AAA-ATPASA 2
AT2G20990	SYTA , SINAPTOTGAMINA A
AT5G03340	CDC48C, PROTEÍNA DE CICLO DEL DIVISIÓN CELULAR 48C
AT2G23770	LYK4, PROTEÍNA QUINASA 4 CON RECEPTOR LYSM
Unión a proteínas	
AT5G35790	G6PD1 GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA 1
AT1G65480	PROTEÍNA DE FLORACIÓN T
AT1G24510	TCP-1, PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE CHAPERONAS cpn60
AT2G16850	PIP3B, PROTEÍNA INTRÍNECA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA 3B
AT5G22060	ATJ2, PROTEÍNA HOMÓLOGA A LA DNAJ 2 DE <i>E. coli</i>
AT1G55490	CPN60B, CHAPERONINA 60 BETA 1
ATCG00500	ACCD, SUBUNIDAD BETA DE LA ACETIL-COA CARBOXILASA CARBOXIL TRANSFERASA
Transporte	
AT4G34450	CRB41, PROTEÍNA DE UNIÓN AL RNA CLOROPLÁSTICO
AT1G76670	URGT1, TRANSPORTADOR 1 UDP-RHA/UDP-GAL
AT2G21390	COATÓMERO SUBUNIDAD ALFA
AT5G56350	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA PIRUVATO QUINASA
AT4G31480	COATÓMERO SUBUNIDAD BETA
AT1G01790	KEA1, BOMBA DE EXPORTACIÓN DE K ⁺ 1,
AT1G31730	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE LAS ADAPTINAS
AT5G11490	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE LAS ADAPTINAS

AT5G60790	GCN1, PROTEÍNA DE CONTROL GENERAL NO-REPRESIBLE 1
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT4G16760	ACX1, OXIDASA ACIL-COA 1
AT5G04140	GLU1, GLUTAMATO SINTETASA 1
AT4G39830	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE CUPREDOXINAS
AT4G34200	PGDH1, FOSFOGLICERATO DESHIDROGENASA 1
AT2G15620	NIR1, NITRITO REDUCTASA 1
AT1G76160	SKS5, PROTEÍNA SIMILAR A SKU5
AT2G02850	ARPN, PLANTOCIANINA
AT2G20800	NDB4, DESHIDROGENASA B4 NAD(P)H
Biosíntesis de Carbohidratos	
AT1G63000	UER1, PROTEÍNA SINTASA/REDUCTASA NUCLEÓTIDO-RAMNOSA
AT3G55440	TPI, ISOMERASA TRIOSEFOSFATASA
Catabolismo de carbohidratos	
AT3G29320	PHS1, FOSFORILASA 1 ALPHA-GLUCANO
AT3G46740	TOC75-III, TRANSLOCÓN EXTERIOR 75-III DE LA MEMBRADA DEL CLOROPLASTO
AT5G63680	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE QUINASAS PIRUVATO
AT5G03650	SBE2.2, ENZIMA 2,2 DE RAMIFICACIÓN DEL ALMIDÓN
Biosíntesis proteínas	
AT3G57030	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA FOSFOTRIESTERASA DEPENDIENTE DE CALCIO
AT1G74040	IMS1, 2-ISOPROPILMALATO SINTASA 1
AT5G46290	KASI, PROTEÍNA 3-QUETOACIL-ACIL SINTASE I
AT3G12915	FACTOR G/III/V DE ELONGACIÓN
AT1G17745	PGDH2, FOSFOGLICERATO DESHIDROGENASA 2
AT1G74960	ATKAS2, BETA QUETOACIL-ACP SINTETASA 2
AT1G14205	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA RIBOSOMAL L18p
AT1G29900	CARB, CARBAMOIL FOSFATASA SINTETASA B
AT4G05020	NDB2, DESHIDROGENASA NAD(P)H B2
AT2G43750	ACS1, CISTEÍN SINTASA 1
AT1G34130	STT3B, PROTEÍNA HOMÓLOGA A LA STAUROSPORINA – SENSIBLE T ³ 3B DE LEVADURA
Catabolismo de proteínas	
AT5G17380	PIRUVATO DESCARBOXILADA TIAMINA PIROFOSFATO DEPENDIENTE
AT4G33090	APM1, AMINOPEPTIDASA M1
AT5G03240	UBQ3, POLIUBIQUITINA 3
Unión a ácidos nucleicos	

AT1G62750	ATSCO1, "SNOWY COTILEDÓN" (UNIÓN A GTP)
AT4G13780	METIONINA-tRNA LIGASA
AT1G14900	HMGA, PROTEÍNA DEL GRUPO A DE ELEVADA MOVILIDAD
AT4G35830	ACO1, ACONITASA 1
AT4G12080	AHL1, PROTEÍNA 1 NUCLEAR CON MOTIVO DE UNIÓN A DNA TIPO "AT-HOOK"
AT2G29190	PUM2, PUMILIO 2
AT3G23300	METRILTRANSFERASA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE S-ADENOSIL-L-METIONINA DEPENDIENTE
AT3G61860	RS31, FACTOR 31 DE ESCISIÓN RICO EN ARGININAS/SERINAS
AT1G04430	METRILTRANSFERASA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE S-ADENOSIL-L-METIONINA DEPENDIENTE
Unión a ATP	
AT1G27770	ACA1, ATEPasa AUTOINHIBIDORA DE Ca ²⁺
AT3G06650	ACLB-1, LIASA B-1 ATP-CITRATO
AT4G04770	ATNAP1, PROTEÍNA 1 DE UNION A ATP
AT2G05710	ACO3, ACONITASA 3
ATMG00410	ATP6, SUNUNIDAD 6 ATPasa
AT3G47950	HA4, ATPasa 4 H(+) DEPENDIENTE
AT1G07670	ECA4, CA-ATPasa 4 ENDOMEMBRANA
Respuesta a estrés	
AT2G04030	HSP90,5, PROTEÍNA 90.5 DE CHOQUE TÉRMICO
AT5G67030	PROTEÍNA ABA DEFICIENTE 1,
AT5G56010	HSP81.3, PROTEÍNA 81.3 DE CHOQUE TÉRMICO
Reguladores metabolismo	
AT5G23060	CAS, RECEPTOR DE CALCIO
AT2G46690	SAUR32, RNA 32 REGULADO POR AUXINAS
AT2G30490	C4H, HIDROXILASA CINNAMATO 4-
AT3G10380	SEC8, SUBUNIDAD DEL COMPEJO 8 EXOCISTICO
AT5G12470	RER4, RETICULATA 4
Función desconocida	
AT3G52520	PROTEÍNA DESCONOCIDA
AT1G23170	PROTEÍNA DESCONOCIDA

Tabla 2: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar sólo con la proteína p20 del aislado T318A, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT3G48730	GSA2, GLUTAMATO-1-SEMIALDEHIDO 2,1-AMINOMUTASA 2
AT5G23120	HCF136, "HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE 136"
AT1G54780	TLP18.3, PROTEÍNA DEL LUMEN TILACOIDAL
AT4G05180	LHCB1.4, "LIGHT HARVESTING" PROTEÍNA CLOROFÍLICA DEL FOTOSISTEMA II
AT1G31330	PSAF, SUBUNIDAD F FOTOSISTEMA I
AT5G54270	LHCB3, "LIGHT-HARVESTING" CHLOROFILA B-PROTEÍNA DE UNIÓN 3
AT5G64040	PSAN, PROTEÍNA DEL LUMEN DEL TILACOIDE Y DEL FOTOSISTEMA I
AT3G26710	CCB1, COFACTOR 1 DE ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO C
AT4G12800	PSAL, SUBUNIDAD L DEL FOTOSISTEMA I
AT4G09650	ATPD, ATP SINTASA SUBUNIDAD DELTA
AT3G56650	PPD6, PROTEÍNA DEL FOTOSISTEMA I
AT3G56130	BLP3, PROTEINA 3 "BCCP-LIKE"
AT4G05180	PSBQ, SUBUNIDAD Q-2 DEL FOTOSISTEMA II
AT4G01150	CURT1A, PROTEÍNA 1A DE CURVATURA TILACOIDA
AT1G79530	GAPCP-1, GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA DE PLASTIDIOS
Defensa	
AT3G09270	GST8, GLUTATION S-TRANSFERASA TAU8
AT4G01850	SAM-2, S-ADENOSILMETIONINA SINTETASA 2
AT4G13940	SAH1, S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA HIDROLASA 1
AT5G06290	2-CYS PRX B, 2-CYS PEROXIREDOXINA B
Unión a proteínas	
AT3G24590	PLSP1, PEPTIDASA 1 PLASTÍDICA TIPO L
AT3G57560	NAGK, N-ACETIL-L-GLUTAMATO QUINASA
AT4G25550	CPSF5, SUBUNIDAD 25KDa DEL FACTOR ESPECÍFICO DE CORTE Y POLIADENEIZACIÓN
AT5G59840	FAMILIA PROTEÍCA DE UNIÓN A GTP
Transporte	
AT5G24650	HP30-2, IMPORTADOR tRNA MITOCONDRIAL
AT1G12520	CCS, CHAPERONA DISMUTASA SOD1 DEL COBRE
AT5G05010	,PROTEÍNA DE LA SUPERFAMILIA DE ADAPTADORES CLATRINA
AT5G55190	RAN3, RAN GTPASA 3
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT1G06680	PSBP1,SUBUNIDAD P DEL FOTOSISTEMA II "OXYGEN EVOLVING"

AT1G74910	KJC1, KONJAC 1 (RESPUESTA A CADMIO)
AT2G02390	GSTZ1, GLUTATION S-TRANSFERASA ZETA 1
AT3G52730	UBIQUINOL CITOCROMO C REDUCTASA MITOCONDRIAL
AT5G50850	MAB1, "MACCI-BOU"
AT1G16300	GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DEHIDROGENASA DE LOS PLASTIDIOS
AT1G59670	GST15, GLUTATION S-TRANSFERASA TAU15
AT1G24360	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE UNION A NAD(P) "ROSSMANN-FOLD"
AT5G11770	NADH-UBIQUINONA REDUCTASA 20KD MITOCONDRIAL
AT5G06060	SUPER FAMILIA DE PROTEÍNAS NAD(P)-UNIÓN "ROSSMANN-FOLD"
AT3G10920	MSD1, PROTEÍNA DISMUTASA 1 SUPEROXIDO DE MANGANESO
AT1G07440	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE UNION A NAD(P) "ROSSMANN-FOLD"
Catabolismo de carbohidratos	
AT4G38970	FBA2, FRUCTOSA BISFOSFATO ALDOLASA 2
AT5G61410	RPE, D-RIBULOSA-5-FOSFATO-3-EPIMERASA
Biosíntesis proteínas	
AT3G61440	CYSC1, CISTEINA SINTASA C1
AT5G48760	RPL13, PROTEÍNA RIBOSOMA L13
AT5G50240	PIMT2, PROTEINA-L-ISOASPARTATO METILTRANSFERASA 2
AT2G09990	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES S5
AT4G24830	ARGINOSUCCINATO SINTASA
AT2G43090	IPMI SSU1,SUBUNIDAD PEQUEÑA DE LA ISOPROPILMALATO ISOMERASA 1
AT3G09680	RPS12/23, PROTEÍNA RIBOSOMAL S12/23
AT2G36620	RPL24A, PROTEÍNA RIBOSOMAL L24 A
AT3G02560	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES S7e
AT3G59760	OASC, ISOFORMA DE LA O-ACETILSERINA (THIOL) LIASA
AT1G48830	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES S7e
AT3G57490	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES S5
AT2G37270	RPS5B, PROTEÍNA RIBOSOMAL S5 B
Catabolismo de proteínas	
AT1G56450	PBG1, SUBUNIDAD G1 DEL PROTEOSOMA BETA
AT3G26340	PROTEÍNA DE LA SUPERFAMILIA DE HIDROLASA N-trm
AT5G54160	COMT1, CAFEATO O-METILTRANSFERASA 1
AT5G45390	NCLPP4, CLP SERÍN-PROTEASA P4 CODIFICADA EN NÚCLEO
AT4G17040	CLPR4, SUBUNIDAD 4 DE LA CLP PROTEASA R
AT1G02560	CLPP 5, CLP PROTEASA 5 CODIFICADA EN NÚCLEO

Unión a ácidos nucleicos	
AT4G10450	RPL6, PROTEÍNA RIBOSOMAL L6
AT1G79050	RECA1, PROTEÍNA HOMÓLOGA A LA PROTEÍNA BACTERIANA RECA
AT4G09320	NDPK1, PROTEÍNA NUCLEOSÍDICA DIFOSFATO QUINASA 1
AT2G25870	ATYBEY, YBEY ENDORIBONUCLEASA
AT2G28720	H2B, HISTONA 2B
AT5G10770	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE ASPARTIL PROTEASA EUCARIÓTICA
Unión a ATP	
ATMG00480	ATP8, SUBUNIDAD 8 DE LA ATP-SINTASA MITOCONDRIAL
AT5G47030	SUBUNIDAD DELTA DE LA ATP-SINTASA MITOCONDRIAL
Respuesta a estrés	
AT1G32220	PROTEÍNA DE LA SUPERFAMILIA DE UNIÓN A NAD(P) "ROSSMANN-FOLD"
AT2G47710	PROTEÍNA DE LA SUPER FAMILIA ADENINA NUCLEÓTICO HIDROLASA ALFA
Citoesqueleto	
AT3G53750	ACT3, ACTINA 3
AT4G00680	ADF8, FACTOR DE DESPOLIMERIZACIÓN DE ACTINA 8
AT3G46000	ADF2, FACTOR DE DESPOLIMERIZACIÓN DE ACTINA 2
AT2G31200	ADF6, FACTOR DE DESPOLIMERIZACIÓN DE ACTINA 6
Función desconocida	
AT5G42960	PROTEÍNA DESCONOCIDA
AT2G20920	PROTEÍNA DESCONOCIDA (DUF3353)
AT5G64260	EXL2, "EXORDIUM-LIKE" 2
AT2G40600	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE PROCESAMIENTO ENZIMÁTICO appr-1-p

Tabla 3: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar sólo con la proteína p25 del aislado T36, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT5G01530	LHCB4.1, PROTEÍNA DEL COMPLEJO "LIGHT HARVESTING" DEL FOTOSISTEMA II
AT1G55670	PSAG, SUBUNIDAD DEL FOTOSISTEMA I
AT1G08380	PSAO, SUBUNIDAD O DEL FOTOSISTEMA I
Defensa	
AT3G04720	PR4, PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PATOGÉNESIS

AT3G08710	TRX-H9, TIOREDOXINA H9
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT3G45300	IVD, ISOVALERIL-COA DEHIDROGENASA,
Respuesta a estrés	
AT1G68090	HSP70, PROTEÍNA 70 DE CHOQUE TÉRMICO
AT1G16030	HSP70B, PROTEÍNA 70B DE CHOQUE TÉRMICO
Unión a ácidos nucleicos	
AT4G11060	MTSSB, PROTEÍNA DE UNIÓN A DNA MITOCONDRIAL
Homeóstasis	
AT4G24160	LISOFOSFATIDIC ACIDO ACILTRANSFERASA
Unión a proteínas	
AT2G21130	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA PEPTIDIL-PROFIL ISOMERASA
Biosíntesis proteínas	
ATCG00380	RPS4, PROTEÍNA RIBOSOMAL CLOROPLÁSTICA S4
AT2G31610	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS S3 RIBOSOMALES
AT4G08900	ARGAH1, ARGININA AMIDOHIDROLASA 1
Función desconocida	
AT4G35220	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA CICLASA

Tabla 4: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar sólo con la proteína p25 del aislado T318A, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
ATCG00350	PSAA, SUBUNIDAD DEL CENTRO REACTIVO DEL FOTOSISTEM II
ATCG00340	PSAB, SUBUNIDAD DEL CENTRO REACTIVO DEL FOTOSISTEM II
ATCG00680	PSBB, PROTEÍNA B DEL CENTRO REACTIVO DEL FOTOSISTEM II
Defensa	
AT1G31280	AGO2, ARGONAUTA 2
AT5G47010	UFP1, BETA-AMILASA 1
AT1G15520	PDR12, PROTEÍNA PLEIOTRÓPICA "DRUG RESISTANCE" 12
AT3G53230	CDC48B, CHAPERONA DE LA PROTEÍNA DE DIVISIÓN CELULAR 48
AT2G27040	AGO4, ARGONAUTA 4
AT1G48410	AGO1, ARGONAUTA 1
Unión a proteínas	
AT2G28000	CH-CPN60A, CHAPERONA 60 ALPHA

AT3G13470	CPN60BETA2, CHAPERONA 60 BETA 2
AT1G50250	FTSH1, FTSH PROTEASA 1
AT3G52750	FTSZ2-2, PROTEÍNA DE DIVISIÓN PLASTIDIAL
AT5G55280	CPFTSZ, "CLOROPLASTO FTSZ"
Transporte	
AT4G04910	NSF, FACTOR N-ETILMALEIMIDA
AT5G64290	DCT2.1, TRANSPORTADOR 2,1 DICARBOXILATO
AT4G23460	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA FAMILIA DE ADAPTINAS
AT1G62020	SUNUNIDAD ALFA "COATOMER"
AT5G28540	BIP 1, PROTEÍNA 1 DE UNIÓN LUMINAL
AT3G57330	ACA11, TRASPORTADOR DE Ca ²⁺ ATPasa 11
AT4G30190	HA2, ATPasa 2 H(+) DEPENDIENTE
AT1G59610	DRP2B, PROTEÍNA 2B DINAMINA
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT3G17240	MTLPD2, LIPOAMIDA DESHIDROGENASA 2,
AT5G60600	4-HIDROXI-3-METILBUTIL-2-ENIL DIFOSFATO SYNTASA
AT3G47930	ATGLDH, L-GALACTONO-1,4-LACTONA DEHYDROGENASA
Metabolismo ácidos grasos	
AT3G06860	MFP2, PROTEÍNA 2 MULTIFUNCIONAL
AT4G23850	LACS4, ACIL-COA SINTETASA 4
AT3G19820	DWF1, DELTA ESTEROL REDUCTASA 1
Biosíntesis proteínas	
AT4G35090	CAT2, CATALASA 2
Catabolismo proteínas	
AT1G03090	SUBUNIDAD CAC2 BIOTIN CARBOXILASA
AT2G20580	RPN1A, SUBUNIDAD S2 1A REGULADORA DEL PROTEOSOMA 26S
AT4G33010	GLDP1, PROTEÍNA 1 GLICINA DESCARBOXILASA
AT3G02090	MPPBETA, PEPTIDASA BETA MITOCONDRIAL
Unión a ácidos nucleicos	
AT4G31180	IBI1, tRNA ASPARTIL SINTETASA
AT2G42520	PROTEÍNA MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE TRIFOSFATO HIDROLASAS
Catabolismo de carbohidratos	
AT3G46970	PHS2, ALFA-GLUCANO FOSFORILASA 2
AT1G18270	PGM1, FOSFOGLUCOMUTASA
AT5G42740	GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA
AT1G78570	RHM1, BIOSÍNTESIS RAMNOSA 1

AT5G13110	G6PD2, GLUCOSA-6-FOSFATA DESHIDROGENASA 2
AT5G19220	ADG2, ADP GLUCOSA PIROFOSFORILASA 2
homeóstasis	
AT1G56070	LOS1, GEN 1 DE RESPUESTA OSMÓTICA
AT2G39800	P5CS1, DELTA 1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO SINTASA 1
AT4G38510	VAB2, SUBUNIDAD 2 V DE LA ATPasa B
Unión a ATP	
AT5G42270	ATP-DEPENDIENTE DE ZINC
AT4G37640	ACA2, ATPasa 2 DE UNIÓN A Ca ²⁺
AT1G50480	THFS, FORMILTETRAHIDROFOLATE SINTETASA
AT4G25450	ATNAP8, PROTEÍNA DE UNIÓN DE ATP B28
AT2G34660	ATABCC2, PROTEÍNA DE UNIÓN DE ATP C2
Respuesta a estrés	
AT3G20340	Gi 15231113 PROTEÍNA DE EXTRÉS OXIDATIVO
AT1G15690	ATAVP1, PROTEÍNA TRASLOCADORA H(+) PPasa 3
AT5G56000	HSP90.4, PROTEÍNA 90.4 DE CHOQUE TÉRMICO
AT3G23990	HSP60, PROTEÍNA 60 DE CHOQUE TÉRMICO
AT4G24280	CphsC 70, PROTEÍNA 70-1 DE CHOQUE TÉRMICO CLOROPLÁSTICA
Biosíntesis de carbohidratos	
AT5G51820	STF1, FOSFOGLUTAMASA
AT1G53310	PEPC1, FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA 1
AT3G52990	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PIRUVATO QUINASAS
AT5G08570	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PIRUVATO QUINASAS
Exocitosis	
AT5G58430	EXO70B1, SUBUNIDAD EXO70 DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS B1
Citoesqueleto	
AT5G23860	TUB8, TUBULINA 8
AT5G12250	TUB6, BETA TUBULINA 6

Tabla 5: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p20 de los aislados T36 y T318A, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT1G71500	PSB33, PROTEÍNA 33 TIPO OEC DEL FOTOSISTEMA II
AT2G05100	LHCB2, FOTOSISTEMA II PROTEÍNA CLOROFILA "LIGHT HARVESTING"

Catabolismo de Carbohidratos	
AT5G14740	BETA CA2, BETA CARBÓNICO ANHIDRASA 2
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT3G51680	SDR2, DESHIDROGENASA/REDUCTASA 2 DE CADENA CORTA
AT1G72610	GLP1, PROTEÍNA 1 "GERMIN-LIKE"
AT5G20630	GLP3, PROTEÍNA 3 "GERMIN-LIKE"
AT2G47140	SDR5, DESHIDROGENASA/REDUCTASA 5 DE CADENA CORTA
AT5G13430	SUBUNIDAD HIERRO-SULFITO DE LA UBIQUINOL CITOCROMO C REDUCTASA
Catabolismo proteínas	
ATCG00670	CLPP1, SERIN-PROTEASA P1 CASEINOLÍTICA
Biosíntesis de ácidos grasos	
AT5G16390	BCCP1, PROTEÍNA TRANSPORTADORA BIOTINA CARBOXIL
Biosíntesis proteínas	
AT1G33140	RPL9, PROTEÍNA RIBOSOMAL L9
AT5G09500	RPS19, PROTEÍNA RIBOSOMAL S19
ATCG00770	RPS8, PROTEÍNA RIBOSOMAL
Respuesta a estrés/Defensa	
AT1G78380	GSTU19, GLUTATIÓN-TRANSFERASA TAU 19
AT4G37910	MTHSC70-1, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO MITOCONDRIAL 70-1
AT3G01500	ATSABP3, PROTEÍNA DE UNIÓN 3 DEL ÁCIDO SALICÍLICO
AT5G02500	HSP70-1, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70-1
Función desconocida	
AT3G11780	MD-2, PROTEÍNA RELACIONADA CON EL RECONOCIMIENTO DE DOMINIOS RICOS LÍPIDICOS

Tabla 6: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p25 de los aislados T36 y T318A según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
ATCG00470	ATPE, ATP SINTASA SUBUNIDAD EPSILON
Defensa	
AT4G11650	OSM34, OSMOTINA 34
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT4G15093	LIGB, SUBUNIDAD LigB DE LA DIOXIGENASA AROMÁTICA
Unión a ATP	

AT3G08580	AAC1, TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL ADP/ATP
ATCG00130	SUBUNIDAD F DE LA ATP-SINTASA DE CLOROSPLASTO
Biosíntesis proteínas	
AT3G52580	RPS11, PROTEÍNA RIBOSOMAL S11
AT2G33800	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES SR
catabolismo de Carbohidratos	
AT1G59900	E1 ALPHA, SUBUNIDAD ALFA DEL COMPLEJO E1 DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA

Tabla 7: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con las proteínas p20 y p25 del aislado T36 según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT5G49910	CPHSC70-2, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO CLOROPLÁSTICA 70-2
Biosíntesis proteínas	
AT5G35530	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES S3

Tabla 8: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con las proteínas p20 y p25 del aislado T318A según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT3G50820	PSBO-2, SUBUNIDAD O-2 DEL FOTOSISTEMA II
AT5G38430	RBCS1B, SUBUNIDAD PEQUEÑA 1B DE LA RUBISCO
Transporte	
AT5G19760	TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL DEL TRANSPORTE COMBINADO DE DICARBOXILATO Y TRICARBOXILATO
Unión a ATP	
AT1G73110	PROTEÍNA DE LA SUPERFAMILIA DE LAS HIDROLASAS NUCLEOSÍDICA

Tabla 9: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p20 del aislado T36 y la proteína p25 del aislado T318A, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT3G61470	LHCA2, COMPLEJO GÉNICO 2 DEL FOTOSISTEMA I "LIGHT HARVESTING "
AT3G60750	TKL1, TRANSQUETOLASA 1
AT4G04640	ATPC1, ATP SINTASA SUBUNIDAD GAMMA
ATCG00520	YCF4, PROTEÍNA DE ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA I
ATCG00270	PSBD, PROTEÍNA DEL FOTOSISTEMA II
Unión a ATP	
ATCG00150	CF0, SUBUNIDAD CF0 DEL COMPLEJO ATP-SINTASA DE CLOROPLASTO
Biosíntesis proteínas	
AT4G34670	RPS3Ae, PROTEÍNA RIBOSOMAL S3 Ae
ATCG00800	RPS3, PROTEÍNA RIBOSOMAL CLOROPLÁSTICA
catabolismo de Carbohidratos	
AT1G12900	GAPC2, SUBUNIDAD 2 DE LA GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A
Catabolismo de proteínas	
AT2G13360	AGT1, ALANINA-GLIOXILATO AMINOTRANSFERASA

Tabla 10: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p20 del aislado T318A y la proteína p25 del aislado T36, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
AT2G45290	TKL2, TRANSQUETOLASA 2
AT2G30950	VAR2, "VARIEGATED" 2
AT3G08940	LHCB4.2, PROTEÍNA CLOROFÍLACA CP29 DEL FOTOSISTEMA II
Defensa	
AT2G39730	RCA, RUBISCO ACTIVASA
Transporte	
AT5G14040	MPT3, TRANSPORTADOR FOSFATO 3 MITOCONDRIAL
AT4G00430	PIP1E, PROTEÍNA INTRÍNSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 1
AT2G37170	PIP2B, PROTEÍNA INTRÍNSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 2
AT4G35100	PIP3, PROTEÍNA INTRÍNSECA DE MEMBRANA PLASMÁTICA 3
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT3G14420	ACC1, CARBOXILASA 1 ACETIL-COA

AT1G36160	GOX1, GLICOLATO OXIDASA 1
AT5G08680	ATP SINTASA -SUBUNIDAD BETA MITOCONDRIAL
AT4G29010	AIM1, PROTEÍNA BETA OXIDACIÓN DE ACIDOS GRASOS
AT1G78900	VHA-A, ATP SINTASA SUBUNIDAD A VACUOLAR
Citoesqueleto	
AT1G75780	TUB1, SUBUNIDAD DE LA TUBULINA BETA-1
AT5G17920	ATMETS, METIONINA SINTASA
AT4G20360	RABE1B, PROTEÍNA HOMÓLOGA A LA RAB GTP-ASA E1B
Unión a ATP	
AT5G49460	ACLB-2, SUBUNIDAD B-2 DE LA ATP-CITRATO LIASA
AT5G62670	HA11, H(+)-ATPASA 11
Respuesta a estrés	
AT5G50920	HSP93-V, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 93-V
Catabolismo de carbohidratos	
AT1G23190	PGM, FOSFOGLUTAMASA
AT1G79550	PGK, FOSFOGLICERATO QUINASA
AT1G56190	PROTEÍNA DE LA FAMILIA FOSFOGLICERATO QUINASA
AT4G37930	SHMT1, SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA 1
Biosíntesis de carbohidratos	
AT1G48030	MTLPD1, LIPOAMIDA DEHIDROGENASA 1 MITOCONDRIAL
Función desconocida	
AT1G74470	PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

Tabla 11: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p20 de los aislados T36 y T318A coincidentes con la proteína p25 del aislado T36, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
ATCG00280	PSB, PROTEÍNA DEL CENTRO PROTEICO C DEL FOTOSISTEMA II
Unión a proteínas	
AT5G42020	BIP2, PROTEÍNA DE UNIÓN DEL LUMEN DEL CLOROPLASTO
Citoesqueleto	
AT3G12110	ACT11, ACTINA 11

Tabla 12: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p20 de los aislados T36 y T318A coincidentes con la proteína p25 del aislado T318A según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Transporte	
AT5G46800	BOU, "BOUT DE SOUFFLE" (PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ACIL-CARNITINA)
ATMG00640	ORF25, CODIFICA LA SUBUNIDAD B DE LA ATP-SINTASA MITOCONDRIAL
Catabolismo de proteínas	
AT1G11860	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE CORTE DE LA GLICINA

Tabla 13: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p25 de los aislados T36 y T318A coincidentes con la proteína p20 del aislado T36 según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas <i>Nicotiana benthamiana</i>
Fotosíntesis	
AT1G44575	PSBS, SUBUNIDAD S DEL FOTOSISTEMA II
AT4G10340	LHCB5, COMPLEJO 5 DEL FOTOSISTEMA II "LIGHT HARVESTING"
Biosíntesis de ácidos grasos	
AT5G35360	SUBUNIDAD DE LA ACETIL CO-ENZIMA A CARBOXILASA
Biosíntesis proteínas	
AT5G60390	EF1 ALPHA, COFACTOR DE UNIÓN DEL GTP AL FACTOR DE ELONGACIÓN Tu
Transporte	
AT5G13490	AAC2, TRANSPORTADOR 3 DE ADP/ATP
Cesión iones metálicos	
AT5G17170	ENH1, POTENCIADOR DEL SISTEMA SOS3-1

Tabla 14: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con la proteína p25 de los aislados T36 y T318A coincidentes con la proteína p20 del aislado T318A, según el diagrama de Venn.

Función metabólica/molecular	Proteínas del huésped
Fotosíntesis	
ATCG00490	RUBISCO
AT1G29930	CAB140, PROTEÍNA CLOROFÍLICA DEL FOTOSISTEMA II
AT1G15820	LHCB6, "LIGHT HARVESTING" COMPLEJO 6 DEL FOTOSISTEMA II
AT3G47470	LHCA4, PROTEÍNA CLOROFÍLICA DE LA SUBUNIDAD A4 DEL FOTOSISTEMA I

AT1G30380	PSAK, SUBUNIDAD K DEL FOTOSISTEMA I
AT3G54890	LHCA1, COMPLEJO GÉNICO 1 DEL FOTOSISTEMA I "LIGHT HARVESTING"
ATCG00020	PSBA, PROTEÍNA DEL CENTRO CATALÍTICO DEL FOTOSISTEMA II
AT5G38410	RBCS3B, RUBISCO SUBUNIDAD PEQUEÑA 3B
Defensa	
AT5G02500	HSPc70-1, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70-1
AT5G09590	MTHSC70-2, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70-2 MITOCONDRIAL
AT1G61520	LHCA3, PROTEÍNA DEL COMPLEJO GEN 3 DEL FOTOSISTEMA I " LIGHT HARVESTING"
Unión a proteínas	
AT1G09340	CRB, PROTEÍNA CHAPERONA DE UNIÓN A CLOROPLASTO
Transporte	
AT4G39460	SAMC1, S-ADENOSILMETIONINA TRANSPORTADOR 1
AT4G28390	AAC3, TRANSPORTADOR 3 DE ADP/ATP
Reacciones de Oxido-Reducción	
AT3G26650	GAPA-1, GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A SUBUNIDAD 1
AT1G42970	GAPA-2, GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DEHIDROGENASA A SUBUNIDAD 2
AT1G13440	GAPA-C2, GLICERALDEHIDO 3-FOSFATA DEHIDROGENASA C2
Metabolismo carbohidratos	
AT1G67090	RBCS1A, RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA 1A DE CADENA CORTA
Unión a ATP	
ATMG01190	ATP1, SUBUNIDAD 1 DE LA ATP-SINTASA MITOCONDRIAL
ATCG00120	ATPA, SUBUNIDAD ALFA DE LA ATP-SINTASA DEL CLOROPLASTO
Respuesta a estrés	
AT3G04120	GAPA-C, SUBUNIDAD C DE LA GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHIDROGENASA
ATCG00480	HSP70, PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70
AT3G12580	PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 70
citoesqueleto	
AT5G09810	ACT7, ACTINA 7
AT4G14960	TUA6, TUBULINA ALFA-6

Tabla 15: Clasificación funcional de proteínas de la planta susceptibles de interactuar con las proteínas p25 de los aislados T36 y T318A coincidentes con las proteínas p20 de los aislados T36 y T318A, según el diagrama de Venn.

BIBLIOGRAFÍA

- Abuqamar S, Chai MF, Luo H, Song F, Mengiste T** (2008). Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell*, **20**: 1964-83.
- Agüero J, Ruiz-Ruiz S, Vives MC, Velázquez K, Navarro L, Peña L, Moreno P, Guerri J** (2012). Development of viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* to express foreign proteins or analyze gene function in citrus plants. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **25**: 1326-37.
- Agüero J, Vives MC, Velázquez K, Pina JA, Navarro L, Moreno P, Guerri J** (2014). Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. *Virology*, **460-461**: 154-64.
- Agüero J, Vives MC, Velázquez K, Ruiz-Ruiz S, Juárez J, Navarro L, Moreno P, Guerri J** (2013). *Citrus leaf blotch virus* invades meristematic regions in *Nicotiana benthamiana* and citrus. *Mol. Plant Pathol*, **14**: 610-16.
- Agranovsky AA** (1996). Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers. *Adv. Virus Res*, **17**: 119-58.
- Alazem M, Lin NS** (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol. Plant Pathol*, **16**: 529-40.
- Alazem M, Lin KY, Lin NS** (2014). The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of bamboo mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact*, **27**: 177-89.
- Alamillo JM, Saenz P, Garcia JA** (2006). Salicylic acid-mediated and RNA silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of *Plum pox virus* in tobacco. *Plant J*, **48**: 217-27.

- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J** (2004). ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J*, **39**: 697-14.
- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hébrard E, Ndjioudjop M-N, Jones M, Ghesquière A** (2006). Mutations in the eIF(iso) 4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant J*, **47**: 417-26.
- Albertini D, Vogel R, Bove C, Bove JM** (1988). Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 17-21.
- Albiach-Martí MR, Grosser JW, Gowda S, Mawassi M, Satyanarayana T, Garnsey SM, Dawson WO** (2004). *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplast of resistant citrus relatives. *Mol. Breeding*, **14**: 117-28.
- Albiach-Marti MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, Lopez C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO** (2000a). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J. Virol*, **74**: 6856-65.
- Albiach-Marti MR, Guerri J, Hermoso de Mendoza A, Laigret F, Ballester-Olmos JF, Moreno P** (2000b). Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*, **90**: 134-38.
- Albiach-Martí MR, Robertson C, Gowda S, Tatineni S, Belliure B, Garnsey SM, Folimonova SY, Moreno P, Dawson WO** (2010). The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome is

located in the 3'-terminal region of the viral genome. *Mol. Plant Pathol*, **11**: 55-67.

Aloni R, Langhans M, Aloni E, Dreieicher E, Ullrich CI (2005). Rootsynthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream. *J. Exp. Bot*, **56**: 1535-44.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*, **215**: 403-10.

Alvarado VY, Scholthof HB (2011). AGO2: a new Argonaute compromising plant virus accumulation. *Front. Plant Sci*, **2**: 112.

Alzhanova DV, Hagiwara Y, Peremyslov VV, Dolja VV (2000). Genetic analysis of the cell-to-cell movement of *beet yellows closterovirus*. *Virology*, **268**: 192-00.

Alzhanova DV, Napuli AJ, Creamer R, Dolja VV (2001). Cell-to-cell movement and assembly of a plant *closterovirus*: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J*, **20**: 6997-07.

Ambrós S, Ruiz-Ruiz S, Guerri J, Moreno P (2006). Obtención de clones de cDNA del genoma del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) infecciosos mediante agroinoculación. *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, Murcia, España.

Ambrós S, Ruiz-Ruiz S, Pena L, Guerri J, Moreno P (2008). Infección sistémica del virus de la tristeza de los cítricos en una especie no-huésped mediante agroinoculación. *XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, Lugo, España.

Ambrós S, El-Mohtar C, Ruiz-Ruiz S, Peña L, Guerri J, Dawson WO, Moreno P (2011). Agroinoculation of *Citrus tristeza virus* causes systemic infection and

- symptoms in the presumed nonhost *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant–Microbe Interact*, **24**: 1119-31.
- Ambrós S, Ruiz-Ruiz S, Peña L, Moreno P** (2013). A genetic system for *Citrus Tristeza Virus* using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: an update. *Virology*, **4**: 1-14.
- Ancillo G, Gadea J, Forment J, Guerri J, Navarro L** (2007). Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J. Exp. Bot*, **58**: 1927-33.
- Andika IB, Kondo H, Tamada T** (2005). Evidence that RNA silencing-mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* is less effective in roots than in leaves. *Mol. Plant–Microbe Interact*, **18**: 194-04.
- Andika IB, Sun L, Xiang R, Li J, Chen J** (2013). Root-specific role for *Nicotiana benthamiana RDR6* in the inhibition of Chinese wheat mosaic virus accumulation at higher temperatures. *Mol. Plant–Microbe Interact*, **26**: 1165-175.
- Andrade O, Latorre BA, Escaffi O** (1981). *Tomato mosaic-virus* associated with shoestring symptom in Chilean tomatoes. *Plant Dis*, **65**: 761-62.
- Angel CA, Schoelz JE** (2013). A survey of resistance to *Tomato bushy stunt virus* in the genus *Nicotiana* reveals that the hypersensitive response is triggered by one of three different viral proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **26**: 240-48.
- Arregui JM, Ballester JF, Pina JA, Navarro L** (1982). Influencia del sustrato y de la fertilización en el crecimiento de plantas de lima Mejicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) *An. INIA, Ser. Tecnol. Agric*, **19**: 61-82.

- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, **415**: 977-80.
- Asins MJ, Bernet GP, Ruiz C, Cambra M, Guerri J, Carbonell E** (2004). QTL analysis of *Citrus tristeza virus*-citradia interaction. *Theor. Appl. Genetics*, **108**: 603-11.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M**, (2008) Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **21**, 709–19.
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot*, **63**: 3523-43.
- Aubert B, Bove C** (1984). Mild and severe strains of *Citrus tristeza virus* in Reunion Island. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Doods JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 57-61.
- Ayllon MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Mawassi M, Dawson WO** (1999a). New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation. *J. Gen. Virol*, **80**: 871-21.
- Ayllon MA, Rubio L, Moya A, Guerri J, Moreno P** (1999b). The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, **255**: 32-39.
- Ayllon MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R, Moreno P** (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. *Arch. Virol*, **146**: 27-40.

- Ayllon MA, Gowda S, Satyanayanana T, Karasev AV, Adkins S, Mawassi M, Guerri J, Moreno P, Dawson WO** (2003). Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *J. Virol*, **77**: 9232-43.
- Ayllon MA, Gowda S, Satyanarayana T, Dawson WO** (2004). Cis-acting elements at opposite ends of the *Citrus tristeza virus* genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology*, **322**: 41-50.
- Ayllon MA, Rubio L, Sentandreu V, Moya A, Guerri, J, Moreno P** (2006). Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes*, **32**: 119-28.
- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O** (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev*, **24**: 904-15.
- Baebler S, Witek K, Petek M, Stare K, Tusek-Znidaric M, Pompe-Novak M, Rosahl S, Ravnikar M, Gruden K** (2014). Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance gene mediated response against *Potato virus Y* infection in potato. *J. Exp. Bot*, **65**: 1095-09.
- Bak A, Folimonova SY** (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.
- Balbi V, Devoto A** (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol*, **177**: 301-18.

- Ball LA** (1992). Cellular expression of a functional nodavirus RNA replicon from vaccinia virus vectors. *J. Virol*, **66**: 2335-45.
- Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell E, Moreno P, Hermoso de Mendoza A, Cambra M, Navarro L** (1993). Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathol*, **42**: 219-29.
- Barbarossa L, Savino V** (2006). Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dot-blot hybridization. *J. Phytopathol*, **154**: 329-35.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G, Cohen J** (1970). Partial purification of virus-like particules associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology*, **60**: 75-78.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G, Cohen J** (1972). Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. *Virology*, **50**: 821-28.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G** (1973). Effects of strain, source plant, and temperature on transmissibility of *Citrus tristeza virus* by melon aphid. *Phytopathology*, **63**: 716-20.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G, Oren Y** (1974). Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. In: *Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). Berkeley, CA, USA: Univ Calif, Div Agr Sci, pp. 83-85.
- Bar-Joseph M** (1978). Cross protection incompleteness: a possible cause for natural spread of citrus tristeza after a prolonged lag period in Israel. *Phytopathology*, **68**: 1110-11.

- Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D** (1979). The *Closteroviruses*: A distinct group of elongated plant viruses. *Ad. in Virus Res*, **25**: 93-98.
- Bar-Joseph M, Lee RF** (1989a). *Citrus tristeza virus*. *AAB Descriptions of plant viruses* No. 353: 7 pp.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF** (1989b). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annu. Rev. Phytopathology*, **27**: 291-16.
- Bar-Joseph M, Mawassi M** (2013). The defective RNAs of *Closteroviridae*. *Front. Microbiol*, **4**: 132.
- Bartel DP** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**: 281-97.
- Baulcombe DC** (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, **431**: 356-63.
- Becker A, Lange M** (2010). VIGS - genomics goes functional. *Trends Plant Sci*, **15**: 1-4.
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC** (1999). The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**: 781-92.
- Benjamins R, Scheres B** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 443-65.
- Bent AF** (1996). Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*, **8**: 1757-71.
- Ben-Ze'ev IS, Bar-Joseph M, Nitzan Y, Marcus R** (1989). A severe *Citrus tristeza virus* isolate causing the collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Ann. Appl. Biol*, **114**: 293-00.

- Bertini L, Proietti S, Aleandri MP, Mondello F, Sandini S, Caporale C, Caruso C** (2012). Modular structure of HEL protein from *Arabidopsis* reveals new potential functions for PR-4 proteins. *Biol. Chem*, **393**: 1533-46.
- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, De Luis A, Vidal E, Perez-Panades J, Cambra M** (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant. Pathol*, **120**: 177-88.
- Bitters WT** (1972). Reaction of some new citrus hybrids and citrus introductions as rootstocks to inoculations with tristeza virus in California. *Proc. 5th Conf. Int. Organ. Citrus Virol*, 14-16.
- Bleys A, Vermeersch L, Van Houdt H, Depicker A** (2006). The frequency and efficiency of endogene suppression by transitive silencing signals is influenced by the length of sequence homology. *Plant Physiol*, **142**: 788-96.
- Boevink P, Oparka KJ** (2005). Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol*, **138**: 1815-21.
- Boller T, Felix G** (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol*, **60**: 379-06.
- Borbon JC, Garnsey SM, Gottwald TR** (1995). Incremento del grado de infeccion del virus de la tristeza de los citricos (CTV) en presencia de su agente vector (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) en la Republica Dominicana. *Proceedings 3rd International Workshop on CTV and BrCA in the Caribbean Basin: Management Strategies*. pp. 50-55.

- Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V** (2007). The Polerovirus F box protein PO targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol*, **17**: 1615-21.
- Bouché N, Fait A, Zik M, Fromm H** (2004). The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol*, **55**: 315-25.
- Bové C, Vogel R, Albertini D, Bové JM** (1988). Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. *Proc. 10th Conf. Int. Organ. Citrus Virol*: 14-21.
- Boyer JC, Haenni AL** (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, **198**: 415-26.
- Boyko VP, Karasev AV, Agranovsky AA, koonin EV, Dolja VV** (1992). Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **89**: 9156-60.
- Broadbent P, Bevington KB, Coote BG** (1991). Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 64-70.
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol*, **44**: 393-16.
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martín GB, Dinesh-Kumar SP** (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*, **39**: 734-46.

- Burgyàn J, Dalmay T, Rubino L, Russo M** (1992). The replication of cymbidium ringspot tomosvirus defective interfering-satellite RNA hybrid molecules. *Virology*, **190**: 579-86.
- Busch W, Lohmann JU** (2007). Profiling a plant: expression analysis in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 136-41.
- Brlansky RH, Damsteegt VD, Howd DS, Roy A** (2003). Molecular analyses of *Citrus tristeza virus* subisolates separated by aphid transmission. *Plant Dis*, **87**: 397-01.
- Cambra M, Garnsey S, Permar T, Henderson C, Gumpf D, Vela C** (1990). Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*. **80**: 1034.
- Cambra M, Moreno P** (2000). Tristeza. Enfermedades de los cítricos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa: 44-81.
- Cambra M, Gorris MT, Olmos A, Martinez MC, Roman, MP, Bertolini E, Lopez A, Carbonell EA** (2002). European diagnostic protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila N, Milne RG, da Graca JV, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 69-77.
- Campos L, Granell P, Tarraga S, López-Gresa P, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P** (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem*, **77**: 35-43.
- Carmo LS, Resende RO, Silva LP, Ribeiro SG, Mehta A** (2013). Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of *Tomato chlorotic mottle virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics*, **13**: 1947-60.

- Carmona P, Rodríguez-Casado A, Molina M** (1999). Conformational structure and binding mode of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to tRNA studied by Raman and CD spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**: 222–33.
- Carthew RW** (2006) Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 203-08.
- Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis P** (2010). Signaling in induced resistance. *Adv. Virus Res*, **76**: 57–21.
- Carrington JC, Ambrós V** (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, **301**: 336-38.
- Carrington JC, Kasschau KD, Johansen LK** (2001). Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology*, **281**: 1-5.
- Casado-Vela J, Sellés S, Martínez RB** (2006). Proteomic analysis of *Tobacco mosaic virus*-infected tomato (*Lycopersicon esculentum M*) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics*, **6**: 196-06.
- Carveau D, Kraut A, Stotz HU, Mueller MJ, Couté Y, Rey P** (2016) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* 2-Cys peroxiredoxin interactome. *Plant Sci*, **252**: 30-41.
- Cervera M, Navarro A, Navarro L, Peña L** (2008). Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiol*, **28**: 55-66.
- Chan SW, Zilberman Z, Xie L, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE** (2004). RNA silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* **303**: 1336.
- Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine KT, Gao Q-M, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P** (2011). Glycerol-3-phosphate

is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat. Genet*, **43**: 421-27.

Chapman ER (2008). How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release?. *Annu. Rev. Biochem*, **77**: 615-41.

Chapman E, Carrington JC (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet*, **8**: 884-96.

Chatr-Aryamontri A, Breitkreutz BJ, Oughtred R, Boucher L, Heinicke S, Chen D, Stark C, Breitkreutz A, Kolas N, O'Donnell L, Reguly T, Nixon J, Ramage L, Winter A, Sellam A, Chang C, Hirschman J, Theesfeld C, Rust J, Livstone MS, Dolinski K, Tyers M (2015). The BioGRID interaction update database: 2015 updated. *Nucleic Acids Res*. **43**: 470-78.

Chaturvedi R, Krothapalli K, Makandar R, Nandi A, Sparks AA, Roth MR, Welti R, Shah J (2008). Plastid v3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J*, **54**: 106-17.

Che X, Piestum D, Mawassi M, Yang G, Satyanarayana T, Gowda S, Dawson WO, Bar-Joseph M (2001). 5'-coterminial subgenomic RNAs in *Citrus tristeza virus* infected cells. *Virology*, **283**: 374-81.

Chen X (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett*, **579**: 5923-31.

Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, Cirou A, Shelp BJ, Ron E, Faure D (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 7460-64.

- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ** (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, **124**: 803-14.
- Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH** (2010). The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol*, **11**: 641-49.
- Choi H, Jo Y, Lian S, Jo KM, Chu H, Yoon JY, Choi SK, Kim KH, Cho WK** (2015). Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: Cucumber mosaic virus, *Tomato spotted wilt virus* and *Potato virus X*. *Plant Mol. Biol*, **88**: 233-48.
- Choi J, Choi D, Lee S, Ryu CM, Hwang I** (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci*. **16**: 388-94.
- Chu M, Desvoyes B, Turina M, Noad R, Scholthof HB** (2000). Genetic dissection of *Tomato bushy stunt virus* p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology*, **266**: 79-87.
- Clément M, Ketelaar T, Rodiuc N, Banora MY, Smertenko A, Engler G, Abad P, Hussey PJ, de Almeida Engler J.** (2009). Actin-depolymerizing factor 2-mediated actin dynamics are essential for root-knot nematode infection of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**: 2963-79.
- Clouse SD, Sasse JM** (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, **49**: 427-51.
- Cock PJ, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski B, de Hoon MJ** (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, **25**: 1422-423.

- Cole AB, Király L, Ross K, Schoelz JE** (2001). Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to *Cauliflower mosaic virus* infection. *Mol. Plant Microbe Interact*, **14**: 31-41.
- Collier SM, Moffett P** (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci*, **14**: 521-29.
- Comellas M** (2009). Estudio de la interacción entre naranjo amargo y el virus de la tristeza de los cítricos. PhD Thesis, Univ. Politéc. Valencia. Valencia, Spain.
- Costa AS, Müller GW** (1980). Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis*, **64**: 538-41.
- Costa AS, Müller GW, Costa CL** (1968). Rearing the tristeza cetor *Toxoptera citricidus* on squash. In: *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Childs JFL, Ed). Gainesville, Florida, USA: University of Florida Press, pp. 32-35.
- Csorba T, Kontra L, Burgyán J** (2015). Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479-480**: 85-03.
- Csorba T, Lózsa R, Hutvágner G, Burgyán J** (2010). Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE 1. *Plant J*, **62**: 463-72.
- Culver JN, Padmanabhan MS** (2007). Virus-induced diseases altering host physiology one interaction at a time. *Annu. Rev. Phytopathol*, **45**: 221-43.
- Cutter AD, Payseur BA, Salcedo T, Estes AM, Good JM, Wood E, Hartl T, Maughan H, Strempel J, Wang B, Bryan AC, Dellos M** (2003). Molecular correlates of genes exhibiting RNAi phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*, **13**: 2651-57.

- Da Graca JV, Marais LJ, Von Broembsen LA** (1984). Severe tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-65.
- Dangl JL, Jones JDG** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**: 826-33.
- Dawson WO, Bar-Josph M, Garnsey SM, Moreno P** (2015). *Citrus tristeza virus*: Making an ally from an enemy. *Annu. Rev. Phytopathol*, **53**: 137-55.
- Dawson WO, Bubrick P, Grantham GL** (1988). Modification of the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene affects replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology*, **78**: 783-89.
- de Wit P** (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci*, **64**: 2726-32.
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T** (2005). Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J. Exp. Bot*, **56**: 1525–33.
- Delaat AMM, Vanloon LC** (1983). Regulation of ethylene biosynthesis in virus-infected tobacco-leaves: III The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco-leaves. *Physiol. Plant Pathol*, **22**: 26-73.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O** (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defence. *Science*, **313**: 68-71.

- Demarse NA, Ponnusamy S, Spicer EK, Apohan E, Baatz JE, Ogretmen B, Davies C** (2009). Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. *J. Mol. Biol.*, **394**: 789-03.
- Dessens JT, Lomonossoff GP** (1993). *Cauliflower mosaic virus* 35S promotercontrolled DNA copies of *Cowpea mosaic virus* RNAs are infectious on plants. *J. Gen. Virol.*, **74**: 889-92.
- Deng Z, Huang S, Ling P, Yu C, Tao Q, Chen C, Wendell MK, Zhang H-B, Gmitter FG** (2001). Fine genetic mapping and BAC contig development for the *Citrus tristeza virus* resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Mol. Genet. Genomics*, **265**: 739-47.
- Di Carli M, Villani ME, Bianco L, Lombardi R, Perrotta G, Benvenuto E, Donini M** (2010). Proteomic analysis of the plant-virus interaction in *Cucumber mosaic virus* (CMV) resistant transgenic tomato. *J. Proteome Res.*, **9**: 5684-97.
- Díaz-Pendón JA, Ding SW** (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**: 303-26.
- Dinesh-Kumar SP, Baker BJ** (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in *Tobacco mosaic virus* resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**: 1908-13.
- Ding SW, Li H, Lu R, Li F, Li WX** (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* **102**: 109-15.
- Ding SW, Voinnet O** (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130**: 413–26.

- Dodds JA, Jarupat T, Lee JG, Roistacher CN** (1987). Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, **77**: 442-47.
- Dodds JA, Lee JG** (1991). An evaluation of types of *Citrus tristeza virus* in selected sweet orange groves in Southern California. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Navarro L, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 103-12.
- Dolja VV, Kreuze JF, Valkonen JPT** (2006). Comparative and functional genomics of *Closteroviruses*. *Virus Research*, **117**: 38-51.
- Domingo E, Holland JJ** (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol*, **51**: 151-78.
- Dong X** (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol*, **7**: 547-52.
- Dória MS, Sousa AO, Barbosa CdeJ, Costa MG, Gesteira Ada S, Souza RM, Freitas AC, Pirovani CP** (2015). *Citrus tristeza virus* (CTV) Causing proteomic and enzymatic changes in sweet orange variety “Westin”. *Plos One*, **10**: e0130950.
- Durgeon G, Jupin I** (2002). Stability in vitro of the 69K movement protein of *Turnip yellow mosaic virus* is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J. Gen. Virol.* **83**: 3187-97.
- D’ Urso F, Ayllon MA, Rubio L, Sambade A, Hermoso-de-Mendoza A, Guerri J, Moreno P** (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**: 288-94.
- D’ Urso F, Sambade A, Moya A, Guerri J, Moreno P** (2003). Variation of haplotype distributions of two genomic regions of *Citrus tristeza virus* populations from eastern Spain. *Mol. Ecol*, **12**: 517-26.

- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z** (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res*, **38**: W64–70.
- Dunn JJ, Studier FW** (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol*, **166**: 477-35.
- Dunoyer P, Voinnet O** (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNAsilencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol*, **8**: 415-23.
- Dugas DV, Bartel B** (2004). MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, **7**: 512-20.
- Dzianott AM, Bujarski JJ** (1989). Derivation of an infectious viral RNA by autolytic cleavage of in vitro transcribed viral cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 4823-27.
- Dzianott A, Sztuba-Solinska J, Bujarski JJ** (2012). Mutations in the antiviral RNAi defense pathway modify *Brome mosaic virus* RNA recombinant profiles. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **25**: 97-06.
- Ellis J, Dodds P, Pryor T** (2000). The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci*, **5**: 373-79.
- Elvira MI, Galdeano MM, Gilardi P, García-Luque I, Serra MT** (2008). Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *J. Exp. Bot*, **59**: 1253-65.
- Ekwall K** (2004). The RISC complex a direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol. Cell*, **13**: 304-05.
- Fagoaga C, Lopez C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L** (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. *Mol. Plant Microb. Interac*, **18**: 435-45.
- Fagoaga C, Pensabene-Bellavia G, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L** (2011). Ectopic expression of the p23 protein of *Citrus tristeza virus* differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 898-10.
- Fang DQ, Federici CT, Roose ML** (1998). A high-resolution linkage map of the *Citrus tristeza virus* resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics*, **150**: 883-90.
- Fang DQ, Roose ML** (1999). A novel gene conferring *Citrus tristeza virus* resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *Hort Science*, **34**: 334-35.
- Farnham G, Baulcombe DC** (2006). Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene in potato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 18828-33.
- Fawcett HS, Wallace JM** (1946). Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif. Citogr*, **32**: 88-9.
- Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee R F, Niblett CL** (1996). The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology*, **86**: 1331-35.
- Folimonova SY, Folimonov AS, Tatineni S, Dawson WO** (2008) *Citrus tristeza virus*: survival at the edge of the movement continuum. *J. Virol*, **82**: 6546-56.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Shilts T, Folimonov AS, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO** (2010). Infection with strains of *Citrus tristeza virus* does not exclude superinfection by other strains of the virus. *J. Virol*, **84**: 1314-25.

- Forterre P** (2006). The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res*, **5**: 5-16.
- Flor HH** (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, **32**: 653-69.
- Flor HH** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol*, **9**: 275-96.
- Flores R, Garro R, Conejero V, Cunat P** (1975). Purificación en gradiente de densidad de sulfato de cesio de las partículas nucleoproteicas asociadas a la tristeza de los cítricos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment*, **15**: 93-97.
- Flores R, Moreno P, Falk B, Martelli GP, Dawson WO** (2013). e-Book on *Closteroviridae*. *Front Microbiol*, **4**: 411.
- Fraser L** (1952). Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricult. Gazette New South Wales*, **63**: 125-31.
- Fujita Y, van Bodegom PM, Witte JP** (2013). Relationships between nutrient-related plant traits and combinations of soil N and P fertility measures. *PLoS One*, **8**: e83735.
- Fu S, Shao J, Zhou C, Hartung JS** (2016). Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' and two strains of *Citrus Tristeza Virus*. *BMC Genomics*, **17**: 349.
- Fu S, Shao J, Zhou C, Hartung JS** (2017). Co-infection of sweet orange with severe and mild strains of *Citrus tristeza virus* is overwhelmingly dominated by the severe strain on both the transcriptional and biological levels. *Front Plant Sci*, **8**:1419.

- Fu ZQ, Dong X** (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defence. *Annu. Rev. Plant Biol*, **64**: 839-63.
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zeng N, Dong X** (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, **486**: 228-32.
- Fulton RW** (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol*, **24**: 67-81.
- Gabriel D, Rolfe B** (1990). Working models of specific recognition in plant microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol*, **28**: 365-91.
- Galipienso L, Navarro L, Ballester-Olmos JF, Pina JA, Moreno P, Guerri J** (2000). Host range and symptomatology of a graft-transmissible pathogen causing bud union crease of citrus on trifoliolate rootstocks. *Plant Pathol*, **49**: 308-14.
- Gallie DR, Kobayashi M** (1994). The role of the 3'-untranslated regions of nonpolyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency. *Gene*, **142**: 159-65.
- Gandía M, Conesa A, Ancillo G, Gadea J, Forment J, Pallás V, Flores R, Duran-Vila N, Moreno P, Guerri J** (2007). Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, **367**: 298-06.
- Gani Z, Boradia VM, Raghu Ram J, Suryavanshi PM, Patil P, Kumar S, Singh R, Raje M, Raje CI** (2016). Purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from pea seeds. *Protein Expr. Purif*, **127**: 22-27.
- Gao G, Luo H** (2006). The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, **84**: 5-14.

- Garavaglia BS, Thomas L, Gottig N, Zimaro T, Garofalo CG, Gehring C, Ottado J** (2010). Shedding light on the role of photosynthesis in pathogen colonization and host defense. *Commun. Integr. Biol*, **3**: 382-84.
- García-Marcos A, Pacheco R, Manzano A, Aguilar E, Tenllado F** (2013). Oxylinpin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair *Potato virus X-Potato virus Y* and *Tomato spotted wilt virus*. *J. Virol*, **87**: 5769-83.
- Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, Garcia Ruiz MT, McGinn MG, Lowery N, Martinez Baladejo MT, Carrington JC** (2015). Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during *Turnip Mosaic Virus* infection. *PLoS Pathog*, **11**: e1004755.
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Bremel KJ, Carrington JC** (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell*, **22**: 481-96.
- Garnsey SM, Gonsalves D, Purcifull DE** (1977). Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, **67**: 965-68.
- Garnsey SM, Barrett HC, Hutchinson DJ** (1987). Identification of *Citrus tristeza virus* resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylact*, **19**: 187-91.
- Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Yokomi RK, Lee RF** (1991). Development of a worldwide collection of *Citrus tristeza virus* isolates. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 113-20.

- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M, Henderson CT (1993).** Direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 39-50.
- Garnsey SM, Civerolo EL, Lee RF, Yokomi RK, Behe CC (1995).** Using the Beltsville international CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of the 3rd International Workshop on Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies* (Lee RF, Rocha-Pena M, Niblett CL, Ochoa F, Eds). Lake Alfred, FL, USA: FAO, University of Florida, USDA-OICD, pp. 253-59.
- Garnsey SM, Gottwald TR, Yokomi RK (1998).** Control strategies for *Citrus tristeza virus*. In: *Plant virus disease control* (Hadidi A, Khetarpal R, Koganezawa H, Eds). St. Paul, MN, U.S.A.: APS Press, pp. 639-58.
- Gasparini D, Chételat A, Acosta IF, Goossens J, Pauwels L, Goossens A, Dreos R, Alfonso E, Farmer EE (2015).** Multilayered organization of jasmonate signalling in the regulation of root growth. *PLoS Genet*, **11**: e1005300.
- Geri C, Love AJ, Cecchini E, Barrett SJ, Laird J, Covey, SN, Milner JJ (2004).** Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Mol. Biol.* **56**: 111-24.
- Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Pena L (2001).** Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Mol. Plant Pathol*, **2**: 27-36.

- Ghoshal B, Sanfaçon H** (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, **479-480**: 167-79.
- Gilbertson RL, Lucas WJ** (1996). How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends Plant Sci*, **1**: 260-68.
- Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee R** (1993). Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza closterovirus* using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **44**: 305-17.
- Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, Petutschnig E, Lipka V, Rathjen JP** (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr. Biol*, **19**: 423-29.
- Glaser PE, Gross RW** (1995). Rapid plasmenylethanolamine selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms. *Biochemistry*, **34**: 12193-03.
- Glazebrook J** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, **43**: 205-27.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Metraux JP, Zhu T, Katagiri F** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*, **34**: 217-28.
- Gmitter FG, Xiao SY, Huang S, Hu XL, Garnsey SM, Deng Z** (1996). A localized linkage map of *Citrus tristeza virus* resistance gene region. *Theor. Appl. Genet*, **92**: 688-95.

- Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **5**: 1155-63.
- Gonsalves D, Purcifull DE, Garnsey SM** (1978). Purification and serology of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, **68**: 553-59.
- Gonzalez JM, Penzes Z, Almazan F, Calvo E, Enjuanes L** (2002). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J. Virol*, **76**: 4655-61.
- Goto K, Kobori T, Kosaka Y, Natsuaki T and Masuta C** (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol*, **7**: 1050–60.
- Gowda S, Ayllon MA, Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Dawson WO** (2003a). 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. *J. Virol*, **77**: 340-52.
- Gowda S, Satyanarayana T, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Rabindran S, Garnsey SM, Dawson WO** (2001). Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: production of positive- and negative- stranded 3′-terminal and positive-stranded 5′ terminal RNAs. *Virology*, **286**: 134-51.
- Gowda S, Satyanayanana T, Ayllon MA, Moreno P, Flores R, Dawson WO** (2003b). The conserved structures of the 5′ nontranslated region of *Citrus tristeza virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology*, **317**: 50-64.

- Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson WO** (2000). The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*, **274**: 246-54.
- Gowda S, Satyanarayana T, Robertson CJ, Garnsey SM, Dawson WO** (2005). Infection of *Citrus* plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana* plants agroinfiltrated with a binary vector based *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Pena MA, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 23-33.
- Gowda S, Tatineni S, Folimonova SY, Hilf ME, Dawson WO** (2009). Accumulation of a 5' proximal subgenomic RNA of *Citrus tristeza virus* is correlated with encapsidation by the minor coat protein. *Virology*, **389**: 122-31.
- Grant TJ** (1959). Tristeza virus strains in relation to different *Citrus* species used as test plants. *Phytopathology*, **49**: 23-27.
- Graves MV, Roosinck MJ** (1995). Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of *Cucumber mosaic cucumovirus*. *J. Virol*, **69**: 4746-51.
- Grimsley N, Hohn B, Hohn T, Walden R** (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 3282-86.
- Grisoni M, Rivieri C** (1993). Analysis of epidermis of *Citrus tristeza virus* (CTV) in young citrus groves exposed to aphid infestation under different climatic conditions in Reunion Island. In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 62-68.

- Green MR, Sambrook J.** (2012) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Guerri J, Moreno P, Muñoz N, Martínez ME** (1991). Variability among spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded-RNA analysis. *Plant Pathol*, **40**: 38-44.
- Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW** (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, **78**: 51–65.
- King A, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ** (2012). Virus taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Kitajima EW, Costa AS** (1968). Electron microscopy of the tristeza virus in citrus leaves. *Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol*, 25-30.
- Hamera S, Song X, Su L, Chen X, Fang R** (2012). *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4 related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J*, **69**: 104-15.
- Hamera S, Yan Y, Song X, Chaudhary SU, Murtaza I, Su L, Tariq M, Chen X, Fang R** (2016). Expression of *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b alters FWA methylation and its siRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Open*, **5**: 1727-34.
- Hamilton A, Baulcombe DC** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**: 950–52.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, **21**: 4671-79.

- Hamilton CM** (1997) A binary-BAC system for plant transformation with high molecular-weight DNA. *Gene*, **200**: 107-16.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (2000). Responses to Plant Pathogens. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. BB Buchanan, W Gruissem and RL Jones (eds.), pp. 1102- 1156, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, U.S.A.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon CJ** (2001). Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**: 1146-50.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A** (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol*, **7**: 665–74.
- Harper SJ (2013)**. *Citrus tristeza virus*: Evolution of Complex and Varied Genotypic Groups. *Front Microbiol*, **4**: 93.
- Harper SJ, Cowell SJ, Robertson CJ, Dawson WO** (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, **460-461**: 91-99.
- Harper SJ, Dawson TE, Pearson MN** (2008). Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Aust. Plant Pathol*, **37**: 379-86.
- Harper SJ, Dawson TE, Pearson MN** (2009). Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. *Arch. Virol*, **154**: 1505-10.

- Harper SJ, Dawson TE, Pearson MN** (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Arch. Virol*, **155**: 471-80.
- Harvey JJ, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstadt S, Carr JP Baulcombe DC** (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One*, **6**:e14639.
- Haas G, Azevedo J, Moissiard G, Geldreich A, Himber C, Bureau M, Fukuhara T, Keller M and Voinnet O** (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **15**: 2012–02.
- Haupt S, Cowan GH, Ziegler A, Roberts AG, Oparka KJ, Torrance L** (2005). Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell*, **17**: 164-81.
- Hayat S, Irfan M, Ahmad A** (2011). Brassinosteroids: under biotic stress. In: *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* (Hayat, S. and Ahmad, A., eds), pp. 345–360. Netherlands: Springer Netherlands.
- Hayes RJ, Buck KW** (1990). Infectious *Cucumber mosaic virus* RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol*, **71**: 2503-08.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA** (1984). Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, *Aphididae*) in Spain. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 23-27.

- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA** (1988a). Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 68-70.
- Herranz MC, Pallas V** (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* **85**: 761-68.
- Herranz MC, Sanchez-Navarro JA, Sauri A, Mingarro I, Pallas V** (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**: 31-41.
- He P, Shan L, Sheen** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cell. Microbiol.* **9**: 1385-96.
- Heath MC** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**: 321-34.
- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JA, Peacock WJ, Dennis ES** (1998). Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 9019-24.
- Hershko A, Ciechanover A** (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-79.
- Hilf ME, Karasev AV, Albiach-Marti MR, Dawson WO, Garnsey SM** (1999). Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology*, **89**: 336-42.

- Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL, Garnsey SM** (1995). Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, **208**: 576-82.
- Hillman BI, Carrington JC, Morris TJ** (1987). A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell*, **51**: 427-33.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O** (2003). Transitivity dependent and - independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**: 4523–33.
- Hua Z, Vierstra RD** (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**: 299–34.
- Huang C, Qian Y, Li Z, Zhou X** (2012). Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *Sci. China Life Sci.*, **55**: 99-08.
- Huang TS, Nagy PD** (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. *J. Virol.*, **85**: 9090–02.
- Hui L, Ding SW** (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**: 715-24.
- Hull R** (1991). The movement of viruses within plants. *Semin. Virol.*, **2**: 89-95.
- Humphreys JM, Chapple C** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**: 224-29.

- Hunt AG, Xu R, Addepalli B, Rao S, Forbes KP, Meeks LR, Xing D, Mo M, Zhao H, Bandyopadhyay A, Dampanaboina L, Marion A, Von Lanken C, Li QQ** (2008). Arabidopsis mRNA polyadenylation machinery: comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling. *BMC Genomic*, **9**: 220.
- Hunter LJ, Westwood JH, Heath G, Macaulay K, Smith AG, Macfarlane SA, Palukaitis P, Carr JP** (2013). Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in Arabidopsis. *PLoS One*, **8**: e66530.
- Ilharco FA, Sousa-Silva CR, Alvarez-Alvarez A** (2005). First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agron. Lusit*, **51**: 19–21.
- Iriti M, Faoro F** (2008). Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to *Tobacco necrosis virus* (TNV). *Plant Physiol. Biochem*, **46**: 1106-11.
- Ishibashi K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M** (2009). An inhibitory interaction between viral and cellular proteins underlies the resistance of tomato to nonadapted *tobamoviruses*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**: 8778-83.
- Ishibashi K, Masuda K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M** (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 13833-38.
- Ishihara T, Sekine KT, Hase S, Kanayama Y, Seo S, Ohashi Y, Kusano T, Shibata D, Shah J, Takahashi H** (2008). Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biol*, **10**: 451-61.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S.** (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**: 1693–96.

- Jaubert MJ, Bhattacharjee S, Mello AF, Perry KL, Moffett P** (2011). AGO2 mediates RNA silencing anti-viral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **156**: 1556-64.
- Jiang C, Fu X** (2007). GA action: turning on de-DELLA repressing signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*, **10**: 461-65.
- Johansen IE** (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 12400-05.
- Jones JD, Dangl JL** (2006). The plant immune system. *Nature*, **44**: 323-29.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 19-53.
- Jovel J, Walker M, Sanfacon H** (2011). Salicylic acid-dependent restriction of *Tomato ringspot virus* spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **24**: 706-18.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, **324**: 89-1.
- Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM** (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell*, **100**: 13-26.
- Karasev AV** (2000). Genetic diversity and evolution of *Closteroviruses*. *Annu Rev Phytopathol*, **38**: 293-24.
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowsky DJ, Dawson WO**

- (1995). Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, **208**: 511-20.
- Karasev AV, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO** (1997). Transcriptional Strategy of *Closteroviruses*: Mapping the 5' termini of the *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs. *J. Virol*, **71**: 6233-36.
- Karasev AV, Kashina AS, Gelfand VI, Dolja VV** (1992). HSP70-related 65K protein of *Beet yellows virus* is a microtubulebinding protein. *FEBS Lett.* **304**: 12-14.
- Karran RA, Sanfaçon H** (2014). *Tomato ringspot virus* coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol. Plant Microbe Interact*, **27**: 933-43.
- Kazan K, Manners JM** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, **14**: 373–82.
- Keen NT** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant–pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet*, **24**: 447-63.
- Kim S, Yang JY, Xu J, Jang IC, Prigge MJ, Chua NH** (2008). Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiol*, **49**: 1634-644.
- Kiri A, Goldspink G** (2002). RNA-protein interactions of the 30-untranslated regions of myosin heavy chain transcripts. *J. Muscle Res. Cell Motil*, **23**: 119–29.
- Knoester M, van Loon LC, van den Heuvel J, Hennig J, Bol JF, Linthorst HJ** (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 1933-937.
- Koizumi M** (1991). *Citrus tristeza virus* field isolates from declined or dwarfed citrus trees in Japan. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International*

Organization of Citrus Virologists (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds).
Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp 25-30.

Koltai H, Volpin H (2003). Agricultural genomics: An approach to plant protection.
Eur. J. Plant Pathol, **109**: 101-08.

Kong P, Rubio L, Polek M, Falk BW (2000). Population structure and genetic diversity within California *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. *Virus Genes*, **21**: 139-45.

Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, van Loon LC, Pieterse LCM (2008). Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiol*, **147**: 1358-68.

Kuhn JM, Hugouvieux V, Schroeder JI (2008) mRNA cap binding proteins: effects on abscisic acid signal transduction, mRNA processing, and microarray analyses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, **326**: 139-50.

Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 1679-83.

Kyriakou A, Ioannou N, Gavriel J, Bar-Joseph M, Papayiannis C, Kapar-Isaia T, Savva G (1996). Management of *Citrus tristeza virus* in Cyprus. In: *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graca JV, Moreno P, Yokomi RK, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 172-78.

Laino P, Russo MP, Guardo M, Reforgiato-Recupero G, Valè G, Cattivelli L, Moliterni VMC (2016) Rootstock-scion interaction affecting citrus response to CTV infection: a proteomic view. *Physiol. Plant*, **156**: 444-67.

- Laird J, McInally C, Carr C, Doddiah S, Yates G, Chrysanthou E, Khattab A, Love AJ, Geri C, Sadanandom A, Smith BO, Kobayashi K, Milner JJ** (2013). Identification of the domains of *Cauliflower mosaic virus* protein P6 responsible for suppression of RNA silencing and salicylic acid signalling. *J. Gen. Virol*, **94**: 2777–89.
- Lange M, Yellina AL, Orashakova S, Becker A** (2013). Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: An overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods Mol. Biol*, **975**: 1-14.
- Lastra R, Meneses R, Still PE, Niblett C** (1991). The citrus tristeza situation in Central America. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 146-49.
- Lazarowitz SG, Beachy RN** (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, **11**: 535-48.
- Lecellier C H, Voinnet O** (2004). RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev.* **198**: 285-03.
- Lee BJ, Kwon SJ, Kim SK, Kim KJ, Park CJ, Kim YJ, Park OK, Paek KH** (2006). Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by *Tobacco mosaic virus* from nuclear proteome analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **351**: 405–11.
- Lee FL, Keremane L** (2013). Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front. Microbiol*, **4**: 259.
- Lee LY, Gelvin SB** (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol*, **146**: 325-35.

- Lee WS, Fu SF, Verchot-Lubicz J, Carr JP**(2011). Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid induced resistance to *Potato virus X*. *BMC Plant Biol*, **11**: 41.
- Lee WS, Rudd JJ, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K** (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **3**: 236-43.
- Lehmann P** (2002). Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J. Appl. Genet*, **43**: 403-14.
- Leiser RM, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, Herrbach E, Lemaire O, Guilley H, Richards K, Jonard G** (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with *Beet western yellows luteovirus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 9136-140.
- Levy A, Zheng JY, Lazarowitz SG** (2013). The Tobamovirus *Turnip vein clearing virus* 30-kilodalton movement protein. *J. Virol*, **87**: 6428-40.
- Levy A, Zheng JY, Lazarowitz SG** (2015). Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement. *Curr. Biol*, **25**: 2018-25.
- Lewandowski DJ, Dawson WO** (1998). Deletion of internal sequences results in *Tobacco mosaic virus* defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology*, **251**: 427-37.
- Lewis JD, Lazarowitz SG** (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**: 2491–96.

- Lewsey MG, Carr JP** (2009). Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on *Cucumber mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* infections in salicylic acid-treated plants. *J. Gen. Virol*, **90**: 3010-14.
- Li B, Fields S** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J*. **7**: 957–63.
- Li F, Ding SW** (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**: 503-31.
- Li HW, Ding SW** (2005). Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett*. **579**: 5965-73.
- Li XH, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE** (1989). *Turnip crinkle virus* defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 9173-77.
- Li W, Cui X, Meng Z, Huang X, Xie Q, Wu H, Jin H, Zhang D, Liang W** (2012). Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and argonaute 1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiol*, **158**: 1279-92.
- Li Z, Barajas D, Panavas T, Herbst DA, Nagy PD.** (2008). Cdc34p ubiquitin-conjugating enzyme is a component of the *Tombusvirus* replicase complex and ubiquitinates p33 replication protein. *J. Virol*, **82**: 6911-26.
- Liu C, Nelson RS** (2013). The cell biology of *Tobacco mosaic virus* replication and movement. *Front. Plant Sci*, **4**: 12.
- Liu JZ, Blancaflor EB, Nelson RS** (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 Physiol*, **138**: 1853-65.

- Liu P-P, von Dahl CC, Klessig DF** (2011). The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. *Plant Physiol*, **157**: 2216-26.
- Liu P-P, Yang Y, Pichersky E, Klessig DF** (2009). Altering expression of benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 compromises systemic acquired resistance and PAMP-Triggered immunity in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact*, **23**: 82-90.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-08.
- Loake G, Grant M** (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol*, **10**: 466-62.
- López C, Ayllón MA, Navas-Castillo J, Guerri J, Moreno P, Flores R** (1998) Molecular variability of the 5' and 3' terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology* **88**: 685-91.
- López C, Navas-Castillo J, Gowda S, Moreno P, Flores R** (2000) The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* **269**: 462-70.
- López MA, Bannenberg G, Castresana C** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr. Opin. Plant Biol*, **11**: 420-27.
- López-Moya JJ, García JA** (2000). Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of *Plum pox potyvirus* and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res*, **68**: 99-107.

- Lorenzo O, Solano R** (2005b). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol*, **8**: 532-40.
- Love AJ, Geri C, Laird J, Carr C, Yun BW, Loake GJ, Tada Y, Sadanandom A, Milner JJ** (2012). *Cauliflower mosaic virus* protein p6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One*, **7**: e47535.
- Lozano-Duran R, Bejarano ER** (2011). *Geminivirus* C2 protein might be the key player for geminiviral co- option of SCF-mediated ubiquitination. *Plant Signal Behav*, **6**: 999-01
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW** (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 15742-747.
- Lucas WJ** (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, **344**: 169-84.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol*, **158**: 844–53.
- Luna-Rivero MS, Hernández-Zepeda C, Villanueva-Alonzo H, Minero-García Y, Castell-González SE, Moreno-Valenzuela OA** (2016). Expression of genes involved in the salicylic acid pathway in type h1 thioredoxin transiently silenced pepper plants during a *Begomovirus* compatible interaction. *Mol. Genet. Genomics*, **291**: 819-30.
- Mandadi KK, Scholthof KBG** (2012). Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. *Plant Physiol*, **160**: 1432–52.

- Mandadi KK, Scholthof KBG** (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*, **25**: 1489-05.
- Marco S, Levy, D** (1979). Involvement of ethylene in the development of *Cucumber mosaic virus*-induced chlorotic lesions in cucumber cotyledons. *Physiol. Plant Pathol.* **14**: 235–44.
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y** (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol*, **23**: 718-23.
- Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja VV, Duffus JE, Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev AV, Minafra A, Murrant A, Namba S, Niblett CL, Vetten HJ, Yoshikawa N** (2000). Family *Closteroviridae*. In: *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Eds). San Diego, CA, U.S.A.: Academic Press, pp. 943-52.
- Martín S, Sambade A, Rubio L, Vives MC, Moya P, Guerri J, Elena SF, Moreno P** (2009). Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol*, **90**: 1527-38.
- Masuta C, Tanaka H, Uehara K, Kuwata S, Koiwai A, Noma I** (1995). Broad resistance to plant-viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 6117–21.
- Mauch-Mani B, Mauch F** (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol*, **8**: 409-14.

- Maule A, Caranta C, Boulton MI** (2007). Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol. Plant. Pathol*, **8**: 223-31.
- Mayers CN, Lee KC, Moore CA, Wong SM, Carr JP** (2005). Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Mol. Plant Microbe Interact*, **18**: 428-34.
- Mawassi M, Gafny R, Gagliardi D, Bar-Joseph M** (1995a). Populations of *Citrus tristeza virus* contain smaller-than-full-length particles which encapsidate subgenomic RNA molecules. *J. Gen. Virol*, **76**: 651-59.
- Mawassi M, Karasev AV, Mietkiewska E, Gafny R, Lee RF, Dawson WO, Bar-Joseph M** (1995b). Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, **208**: 383-87.
- Mawassi M, Mietkiewska E, Gofman R, Yang G, Bar-Joseph JM** (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol*, **77**: 2359-64.
- McClellan APD** (1974) Abnormal bud union between some sweet oranges and rough lemon rootstock: Evidence of cause by a transmissible pathogen. In: *Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). University of California press, *Div. Agric. Sci.* pp. 203-10.
- Medina V, Peremyslov VV, Hagiwara Y, Dolja VV** (1999). Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by *Beet yellows closterovirus*. *Virology*, **260**: 173-81.
- Meister G** (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet*, **14**: 447-59.

- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB** (2010). A membrane associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**: 3900-05.
- Métraux JP, Raskin I** (1993). Role of phenolics in plant disease resistance. In *Biotechnology in Plant Disease Control*, ed. I Chet, New York: John Wiley & Sons, **11**: 191–09.
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L** (1997a). Molecular markers flanking *Citrus tristeza virus* resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor. Appl. Genetics*, **94**: 691-95.
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Navarro L** (1997b). Efficient search for new resistant genotypes to the *Citrus tristeza closterovirus* in the orange subfamily *Aurantioideae*. *Theor. Appl. Genetics*, **95**: 1282-88.
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Navarro L** (1997c). New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L) Raf. to *Citrus tristeza virus*. *Theor. Appl. Genetics*, **95**: 691-95.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**: 19613-18.
- Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret VB** (2002). RNA Silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, **5**: 289-01.
- Moffett P** (2009). Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv. Virus Res*, **75**: 1-33.

- Molnár A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyán J** (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virology*, **79**: 7812–818.
- Monavarfeshani A, Mirzaei M, Sarhadi E, Amirkhani A, Nekouei MK, Haynes PA, Mardi M, Salekdeh GH** (2012). Shotgun proteomic analysis of the Mexican lime tree infected with “*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*”. *J. Proteomic Res*, **12**: 785–95.
- Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H** (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, **14**: 629–39.
- Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L** (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant. Pathol*, **9**: 251-68.
- Moreno P, Garnsey SM** (2010). *Citrus tristeza* diseases - a worldwide perspective. In: *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases* (Karasev, A.V. and Hilf, M.E., eds.), pp. 27-49. St Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Albiach R, Martínez ME** (1993a). Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathol*, **42**: 33-41.
- Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Fuertes-Polo C, Albiach-Martí R, Martínez ME** (1993b) Variations in pathogenicity and double-stranded RNA (dsRNA) patterns of *Citrus tristeza virus* isolates induced by host passage. In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus*

Virologists (Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 8-15.

Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Martínez ME (1991). Segregation of *Citrus tristeza virus* strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky, R.H., Lee, R.F. and Timmer, L.W., eds.), pp. 20-24. Riverside, CA: IOCV.

Moreno P, Guerri J (1997). Variability of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV): methods for differentiating isolates. In: *Filamentous viruses of woody plants* (Monette P, Ed). Trivandrum, India: Research Signpost, pp. 97-07.

Moreno P, Guerri J, Muñoz N (1990). Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology*, **80**: 477-82.

Moreno P, Navarro L, Fuertes C, Pina JA, Ballester JF, Hermoso de Mendoza A, Juarez J, Cambra M (1983). La tristeza de los agríos. Problemática en España. En: *Hoja Técnica* (INIA Ed)., Madrid, pp 28.

Mou Z, Fan W Dong X (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**: 935-34.

Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Ré moué K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000). *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**: 533-42.

Mull L, Ebbs ML, Bender J (2006). A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics*. 174: 1161-71.

- Müller GW, Costa AS, Kitajima EW, Camargo IJB** (1974). Additional evidence that tristeza multiplies in *Passiflora* ssp. *Proc. 6th Conf. Int. Organ. Virol.*: 75-8.
- Müller GW, Costa AS** (1987). Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach control the disease by preimmunization. *Phytophyl*, **19**: 197-98.
- Müller GW, Costa AS** (1968). Further evidence on protective interference in *Citrus tristeza*. In: *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Childs JFL, Ed). Gainesville, FL, USA: University of Florida Press, pp. 71-82.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E** (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot*, **59**: 501-20.
- Muronetz VI, Wang ZX, Keith TJ, Knull HR, Srivastava DK** (1994). Binding constants and stoichiometries of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-tubulin complexes. *Arch. Biochem. Biophys*, **313**: 253–60.
- Nagels-Durand A, Pauwels L, Goossens A** (2016). The Ubiquitin System and Jasmonate Signaling. *Plants (Basel)*, **5**.
- Nagy PD, Simon AE** (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology*, **235**: 1-9.
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S** (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J*. **33**: 887-98.

- Narvaez G, Skander BS, Ayllon MA, Rubio L, Guerri J, Moreno P** (2000). A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridisation with digoxigenin labelled cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **85**: 83-92.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG** (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Curr. Biol*, **18**: 650-55.
- Navarro L, Pina JA, Juarez J, Ballester-Olmos JF, Duran-Vila N, Guerri J, Moreno P, Cambra M, Zaragoza S and Medina A** (2002). The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2001. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila N, Milne RG, da Graca JV, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 306-16.
- Navarro-López J** (2017). Estudio preliminar de las interacciones del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y su huésped. PhD Thesis, Univ. Politéc. Valencia, Valencia, Spain.
- Navarro-López J, Ruiz-Ruiz S, Flores R, Moreno P, Ambrós P** (2011). La localización subcelular de la proteína de la cápsida p25 difiere entre aislados del virus de la tristeza de los cítricos. *XI Congreso nacional de Virología*, Granada, España.
- Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Gowda S, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO** (1997). Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology*, **228**: 92-7.
- Nezames CD, Deng X-W** (2012). The COP9 signalosome: Its regulation of cullin-based E3 ubiquitin ligases and role in photomorphogenesis. *Plant Physiol*, **160**: 38-46.

- Nicholls C, Pinto AR, Li H, Li L, Wang L, Simpson R, Liu JP** (2012). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**: 13308–13.
- Niehl A, Amari K, Gereige D, Brandner K, Mély Y** (2012). Heinlein M. Control of *Tobacco mosaic virus* movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol*, **160**: 2093-08.
- Nikolaeva OV, Karasev AV, Garnsey SM, Lee RF** (1998). Serological differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis*, **82**: 1276-80.
- Nolasco G, de Blas C, Torres V, Ponz F** (1993). A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods*, **45**: 201-18.
- Norman PA, Sutton RA, Burditt AK** (1968). Factors affecting transmission of tristeza by melon aphids. *J. Econ. Entomol*, **61**: 238-42.
- Nwugo CC, Huerta AJ** (2011). The effect of silicon on the leaf proteome of rice (*Oryza sativa* L.) plants under cadmium-stress. *J. Proteome Res*, **10**: 518–28.
- Nwugo CC, Lin H, Duan Y, Civerolo EL** (2013) The effect of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. *BMC Plant Biol*. **13**: 59.
- Oka K, Kobayashi M, Mitsuhashi I, Seo S** (2013). Jasmonic acid negatively regulates resistance to *Tobacco mosaic virus* in tobacco. *Plant Cell Physiol*. **54**: 1999-10.

- Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT, Terrada E** (1999). New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Res* **27**: 1564-65.
- Olspert A, Kamsol K, Sarmiento C, Gerassimenko J, Truve E** (2014). *Cocksfoot mottle virus* coat protein is dispensable for the systemic infection. *Virology*, **11**: 19.
- Olspert A, Paves H, Toomela R, Tamm T, Truve E** (2010). *Cocksfoot mottle sobemovirus* coat protein contains two nuclear localization signals. *Virus Genes*, **40**: 423-31.
- Ohtsubo N, Mitsuhashi I, Koga M, Seo S, Ohashi Y** (1999). Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic *PR* gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* **40**: 808-17.
- Pacheco R, García-Marcos A, Manzano A, de Lacoba MG, Camañes G, García-Agustín P, Díaz-Ruiz JR, Tenllado F** (2012). Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. *Mol. Plant Microbe Interact*, **25**: 709-23.
- Padmanabhan MS, Goregaoker SP, Golem S, Shiferaw H, Culver JN.** (2005). Interaction of the *Tobacco mosaic virus* replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J. Virol*, **79**: 2549-58.
- Padmanabhan MS, Kramer SR, Wang X, Culver JN** (2008). *Tobacco mosaic virus* replicase–auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J. Virol.* **82**, 2477-85.

- Pallas V, García JA** (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol*, **92**: 2691–05.
- Papp I, Mur LA, Dalmadi A, Dulai S, Koncz C** (2004). A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to Arabidopsis. *Plant Mol. Biol*, **55**: 679-86.
- Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff MRG, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Gumpf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson WO, Lee RF, Niblett CL** (1994). Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the *Citrus tristeza closterovirus* genome. *Virology*, **199**: 35-46.
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, **318**: 113-16.
- Peng CW, Napuli AJ, Dolja VV** (2003). Leader proteinase of *Beet yellows virus* functions in long-distance transport. *J. Virol*, **77**: 2843-49.
- Peña L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L** (1995a). *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, **14**: 616-19.
- Peña L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L** (1995b). High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci*, **104**: 183-91.
- Peña L, Seguin A** (2001). Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotech*, **19**: 500-06.

- Peremyslov VV, Hagiwara Y, Dolja VV** (1999). HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 14771-76.
- Peremyslov VV, Pan YW, Dolja VV** (2004). Movement protein of a *closterovirus* is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virol*, **78**: 3704-09.
- Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ, Lee RF** (1990). A monoclonal antibody which discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, **80**: 224-28.
- Pieczynski M, Marczewski W, Hennig J, Dolata J, Bielewicz D, Piontek P, Wyrzykowska A, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Konopka-Postupolska D, Krzeslowska M, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z** (2013). Down-regulation of *CBP80* gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant Biotechnol. J.*, **11**: 459-69.
- Pina JA, Moreno P, Juárez J, Guerri J, Cambra M, Gorris MT, Navarro L** (2005). A new procedure to index for *Citrus tristeza virus*-induced decline on sour orange rootstock. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Hilf, M.E., Duran-Vila, N. and Rocha-Peña, M., eds.), pp. 491. Riverside, CA: IOCV. (Abstract).
- Pineda M, Sajjani C, Baro NM** (2010). Changes induced by the *Pepper mild mottle tobamovirus* on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. *Photosynth. Res.*, **103**: 31–45.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev Biol.*, **28**: 489–21
- Polo S, Ketner G, Levis R, Falgout B** (1997). Infectious RNA transcripts from full-length *Dengue virus type 2* cDNA clones made in yeast. *J. Virol*, **71**: 5366-374.

- Powell CA, Pelosi RR, Cohen M** (1992). Superinfection of orange trees containing mild isolates of *Citrus tristeza virus* with severe Florida isolates of *Citrus tristeza virus*. *Plant Dis*, **72**: 141-44.
- Prasanth KR, Huang YW, Liou MR, Wang RY, Hu CC, Tsai CH, Meng M, Lin NS, Hsu YH** (2011). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase negatively regulates the replication of *Bamboo mosaic virus* and its associated satellite RNA. *J. Virol*, **85**: 8829–40.
- Pratap D, Kumar S, Snehi SK, Raj SK** (2012). Biological and molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* isolate causing shoestring disease of tomato in India which has closer affinity to European or East Asian isolates of CMV. *Indian J. Virol*, **23**: 57–63.
- Prokhnovsky AI, Peremyslov VV, Napuli AJ, Dolja VV** (2002). Interaction between longdistance transport factor and Hsp70-related movement protein of *Beet yellows virus*. *J. Virol*, **76**: 11003-11.
- Prufer D, Wipf-Scheibel C, Richards K, Guilley H, Lecoq H, Jonard G** (1995). Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of *Cucurbit aphid-Borne yellows virus* and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other *luteoviruses*. *Virology*, **214**: 150-58.
- Pumplin N, Voinnet O** (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter- defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol*, **11**: 745–60.
- Purkayastha A, Dasgupta I** (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol. Biochem*, **47**: 967-76.

- Qu F , Ye X, Morris TJ** (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**: 14732-37.
- Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente TE, Morris TJ** (2005). *RDR6* has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol*, **79**: 15209-17.
- Raja P, Wolf JN, Bisaro DM** (2010). RNA silencing directed against *geminiviruses*: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochim. Biophys. Acta*, **1799**: 337–51.
- Raje CI, Kumar S, Harle A, Nanda JS, Raje M** (2007). The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem*, **282**: 3252–61.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D** (2012) Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 507–33.
- 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 Mol. Biol*, **61**: 399-14.
- Rai VP, Rai A, Kumar R, Kumar S, Kumar S, Singh M, Singh SP** (2016). Microarray analyses for identifying genes conferring resistance to *Pepper leaf curl virus* in chilli pepper (*Capsicum* spp.) *Genomics Data*, **9**: 140-42.
- Ramonell KM, Somerville S** (2002). The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol*, **5**: 291-94.

- Raskin I** (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*, **43**: 439-63.
- Rate DN, Greenberg JT** (2001). The Arabidopsis aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J*, **27**: 203-11.
- Reichel C, Beachy RN.** (2000). Degradation of *Tobacco mosaic virus* movement protein by the 26S proteasome. *J. Virol*, **74**: 3330–37.
- Renovell Á, Vives MC, Ruiz-Ruiz S, Navarro L, Moreno P, Guerri J** (2012). The *Citrus leaf blotch virus* movement protein acts as silencing suppressor. *Virus genes*, **44**: 131-40.
- Restrepo S, Myers KL, del Pozo O, Martin G B, Hart AL, Buell C R, Fry W E, Smart CD** (2005). Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **18**: 913-22
- Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ** (1989). Transcription of infectious *Yellow fever* RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol*, **1**: 285-96.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG** (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol*, **49**: 317-43.
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JDG** (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol*, **10**: 372-79.
- Rochon DM** (1991). Rapid de novo generation of defective interfering RNA by cucumber non-structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **88**: 11153-57.

- Roistacher CN** (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. F.A.O., Rome. 286.
- Roistacher CN, Dodds JA, Bash JA** (1988). Cross protection against *Citrus tristeza seedling yellows* and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 91-100.
- Roistacher CN, Moreno P** (1991). The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV pp. 7-19.
- Romero J, Huang Q, Pogany J, Bujarski JJ** (1993). Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of *Broad bean mottle virus* infections. *Virology*, **194**: 576-84.
- Rosner A, Bar-Joseph M** (1984). Diversity of *Citrus tristeza virus* strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Viol*, **139**: 189-93.
- Ross AF** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Viol*, **14**: 329-39.
- Roth BM, Gail JP, Vance VB** (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**: 97-08.
- Roy A, Ramachandran P, Brlansky RH** (2003). Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch. Virol*, **148**: 707-22.

- Rubio L, Ayllon MA, Guerri J, Pappu H, Niblett C, Moreno P (1996).** Differentiation of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) isolates by single strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol*, **129**: 479-89.
- Rubio L, Ayllon MA, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P, Falk BW (2001).** Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol*, **75**: 8054-62.
- Ruggli N, Tratschin JD, Mittelholzer C, Hofmann MA (1996).** Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol*, **70**: 3478-87.
- Ruiz-Medrano R, Xonocostle-Cazares B, Kragler F (2004).** The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr. Opin. Plant Biol*, **7**: 641-50
- Ruiz-Ruiz S (2009).** El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. PhD Thesis, Univ. Politéc. Valencia, Valencia, Spain.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, Ambrós S (2006).** The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch. Virol*, **151**, 387-98.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, Ambrós S (2007).** A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Methods*, **145**: 96-05.
- Ruiz-Ruiz S, Navarro B, Gisel A, Peña L, Navarro L, Moreno P, Di Serio F, Flores R (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 Mol. Biol*, **75**: 607–19.

Ruiz-Ruiz S, Soler N, Sánchez-Navarro J, Fagoaga C, López C, Navarro L, Moreno P, Peña L, Flores R (2013). *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **26**: 306-18.

Russel M, Model P (1985). Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 29-33.

Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol*, **57**: 431-49.

Sambade A, Rubio L, Garnsey SM, Costa N, Muller GW, Peyrou M, Guerri J, Moreno P (2002). Comparison of the RNA population of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*. Application to monitoring cross protection. *Plant. Pathol*, **51**: 257-65.

Sambade A, Lopez C, Rubio L, Flores R, Guerri J, Moreno P (2003). Polymorphism of a specific region in gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch. Virol*, **148**: 2325-40.

Sambade A, Ambrós S, López C, Ruiz-Ruiz S, Hermoso de Mendoza A, Flores R, Guerri J, Moreno P (2007). Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch. Virol*, **152**: 1115-26.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory*.

- Santner A, Estelle M** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, **459**: 1071–78.
- Saponari M, Manjunath K, Yokomi RK** (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan (R)). *J. Virol. Methods*, **147**: 43-53.
- Sarnow P** (1989). Role of 3'-end sequences in infectivity of *poliovirus* transcripts made in vitro. *J. Virol.* **63**: 467-70.
- Sasaki A** (1981). The effect of *stem pitting* on yield of Washington navel orange. In: *Proceedings of the International Society of Citriculture* **1**: 439-41.
- Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Mawassi M, Albiach-Marti MR, Ayllon MA, Gowda S, Hilf ME, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO** (2001). Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology*, **280**: 87-96.
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Dawson WO** (2002a). Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology*, **300**: 140-52.
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Rabindram R, Dawson WO** (2002b). The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virol*, **76**: 473-83.
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Dawson WO** (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**: 481-91.

- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Dawson WO** (2004). *Closterovirus* bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 799-04.
- Satyanarayana T, Gowda S, Boyko VP, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Navas-Castillo J, Karasev AV, Dolja V, Hilf ME, Lewandowski DJ, Moreno P, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Dawson WO** (1999). An engineered *closterovirus* RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 7433-38.
- Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Marti MR, Ayllon MA, Robertson C, Garnsey SM, Dawson WO** (2000). *Closterovirus* encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*, **278**: 253-65.
- Scharte J, Schoen H, Weis E** (2005). Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environment*, **28**: 1421.
- Schneider H** (1959). The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), pp.73–84. Berkeley, CA: University of California Division of Agricultural Sciences.
- Schoelz JE, Harries PA, Nelson RS** (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol. Plant*, **4**: 813–31.
- Scholthof HB** (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci*, **10**: 376-82.

- Scholthof K-BG, Scholthof HB, Jackson AO** (1995). The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of *Tomato bushy stunt virus* proteins and implications for disease attenuation. *Virology*, **211**: 324-28.
- Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC** (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 Physiol*, **138**: 1842-52.
- Schwessinger B, Zipfel C** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, **11**: 389-95.
- Segonzac, C. and C. Zipfel** (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol*, **14**: 54-61.
- Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A** (2008). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol*, **10**: 866-73.
- Sentandreu V, Castro JA, Ayllon MA, Rubio L, Guerri J, Gonzalez-Candelas F, Moreno P, Moya A** (2006). Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* (CTV) after host passage. *Arch. Virol*, **151**: 875-94.
- Senthil-Kumar M, Mysore KS** (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci*, **16**: 656-65.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T** (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, **13**: 2498-04.

- Shengniao Niu, Gil-Salas FM, Tewary SK, Samales AK, Johnson J, Swaminathan K, Wong SM** (2014). *Hibiscus chlorotic ringspot virus* coat protein is essential for cell-to-cell and long-distance movement but not for viral RNA replication. *PLoS One*, **9**: e113347.
- Shi BJ, Palukaitis P, Symons RH** (2002). Differential virulence by strains of *Cucumber mosaic virus* is mediated by the *2b* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **15**: 947-55.
- Shirasu K, Schulze-Lefert P** (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease- resistance pathways. *Trends Plant Sci* **8**: 1360-85.
- Sirover MA** (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**: 159–84.
- Sirover MA** (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J. Cell Biochem*, **95**: 45–52.
- Sirover MA** (2011). On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**: 741–51.
- Sirover MA** (2014) Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functional diversity. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **57**: 20–26.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**: 11640-45.

- Soosaar JLM, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP** (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 789-98.
- Soler N, Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L** (2015). Symptoms induced by transgenic expression of p23 from *Citrus tristeza virus* in phloem-associated cells of Mexican lime mimic virus infection without the aberrations accompanying constitutive expression. *Mol. Plant Pathol* **16**: 388-99.
- Soler N, Plomer M, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L** (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 Biotechnol J*, **10**: 597-08.
- Spoel SH, Dong X** (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol*, **12**: 89-00.
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X** (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays roles in regulating plant immunity. *Cell*, **137**: 860-72.
- Stanley WM, Loring HS** (1936). The isolation of crystalline *Tobacco mosaic virus* protein from diseased tomato plants. *Science*, **83**: 85.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**: 661-66.
- Sung CL, Luan S** (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, **35**: 53–60.

- Sun L, Ren H, Liu R, Li B, Wu T, Sun F, Liu H, Wang X, Dong H** (2010). An h-type thioredoxin functions in tobacco defense responses to two species of viruses and an abiotic oxidative stress. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **23**: 1470-85.
- Sun TP, Gubler F** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 197-23.
- Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW** (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol*, **66**: 5425-31.
- Sundararaj KP, Wood RE, Ponnusamy S, Salas AM, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA, Ogretmen B** (2004). Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem*, **279**: 6152–62.
- Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T** (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, **6**: e21800.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, **321**(5891): 952-56.
- Tatineni S, Dawson WO** (2012). Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *J. Virol*, **86**: 7850-57.
- Tatineni S, McMechan AJ, Bartels M, Hein GL, Graybosch RA** (2015). In Vitro Transcripts of Wild-Type and Fluorescent Protein-Tagged *Triticum mosaic virus*

(Family *Potyviridae*) are biologically active in wheat. *Phytopathology*, **105**: 1496-05.

Tatineni S, Qu F, Li R, Morris TJ, French R (2012). *Triticum mosaic poacevirus* enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology*, **433**: 104-15.

Tatineni S, Robertson CJ, Garnsey SM, Bar-Joseph M, Gowda S, Dawson WO (2008). Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology*, **376**: 297-07.

Tatineni S, Robertson CJ, Garnsey SM, Dawson WO (2011). A plant virus evolved by acquiring multiple non conserved genes to extend its host range. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**: 17366-71.

Thole V, Worland B, Snape JW, Vain P (2007). The pCLEAN Dual Binary Vector System for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Physiol.*, **145**: 1211–19.

Thornton IR, Stubbs LL (1976). Control of tristeza decline of grapefruit on sour orange rootstock by preinduced immunity. In: *Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Calavan EC, Ed). Riverside, CA, U.S.A.: IOCV, pp. 55-57.

Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci*, **14**: 310–17.

Turpen TH, Turpen AM, Weinzettl N, Kumagai MH, Dawson WO (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of *Tobacco mosaic virus*. *J. Virol. Methods*, **42**: 227-39.

- Truman WM, Bennett MH, Turnbull CGN, Grant MR** (2010). Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol*, **152**: 1562-73.
- Uchiyama A, Shimada-Beltran H, Levy A, Zheng JY, Javia PA, Lazarowitz SG** (2014). The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Front. Plant Sci*, **5**: 584.
- Vain P, Harvey A, Worland B, Ross S, Snape JW, Lonsdale D** (2004). The effect of additional virulence genes on transformation efficiency, transgene integration and expression in rice plants using the pGreen/pSoup dual binary vector system. *Transgenic Res*, **13**: 593-03.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, **44**: 135-62.
- Vantard M, Blanchoin L** (2002). Actin polymerization processes in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol*, **5**: 502-06.
- Van Vuuren SP, Collins RP, da Graca JV** (1993). Evaluation of *Citrus tristeza virus* isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Dis*, **77**: 24-28.
- Vaucheret H** (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev*, **20**: 759-71.
- Vela C, Cambra M, Cortes E, Moreno P, Miguet JG, Perez de San Roman C, Sanz A** (1986). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol*, **67**: 91-96.
- Velázquez K, Agüero J, Vives MC, Aleza P, Pina JA, Moreno P, Navarro L, Guerri J** (2016) Precocious flowering of juvenile citrus induced by a viral vector based

on *Citrus leaf blotch virus*: a new tool for genetics and breeding. *Plant Biotechnol. J*, **14**: 1976-85

Vives MC, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2001). The nucleotide sequence and genomic organization of *Citrus leaf blotch virus*: candidate type species for a new virus genus. *Virology*, **287**: 225-33.

Vives MC, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2002). Characterization of two kinds of subgenomic RNAs produced by citrus leaf blotch virus. *Virology*, **295**: 328-36.

Vives MC, Martín S, Ambrós S, Renovell A, Navarro L, Pina JA, Moreno P, Guerri J (2008a). Development of a full-genome cDNA clone of *Citrus leaf blotch virus* and infection of citrus plants. *Mol. Plant Pathol*, **9**: 787-97.

Vives MC, Rubio L, López C, Navas-Castillo J, Albiach MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R, Moreno P (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *J. Gen. Virol*, **80**: 811-16.

Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol*, **47**: 177-06.

Vlot AC, Klessig DF, Park SW (2008a). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol*, **11**: 436-32.

Vlot AC, Liu P-P, Cameron RK, Park S-W, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E, Klessig DF (2008b). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **56**: 445-56.

Voinnet O (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet*, **6**: 206-20.

- Voinnet O** (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-59.
- Voinnet O** (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci*, **13**: 317-28.
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC** (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 14147-52.
- Waigmann E, Ueki S, Trutnyeva K, Citovsky V** (2004). The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci*, **23**: 195–50.
- Wallace JM** (1978). Virus and viruslike diseases. In: Reuther W, Calavan EC, Carman GE, eds. *The Citrus Industry*. Berkeley, CA, USA: Univ Calif, Div Agr Sci pp. 67-184.
- Wallace JM, Drake RJ** (1976). Progress report of studies in California on preimmunization against tristeza in budded citrus trees. In: *Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Calavan EC, Ed). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 127-36.
- Walters DR, McRoberts N** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins?. *Trends Plant Sci*, **11**: 581-86.
- Wan J, Tanaka K, Zhang XC, Son GH, Brechenmacher L, Nguyen TH, Stacey G** (2012). LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **160**: 396-06.
- Wan J, Zhang XC, Stacey G** (2008). Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signal Behav*, **3**: 831-33.

- Wang RY, Nagy PD** (2008). *Tomato bushy stunt virus* coopts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe*, **3**: 178–87.
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC, Loake GJ** (2009). S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J. Biol. Chem.* **284**: 2131-37.
- Wassenegger M** (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell*, **122**: 13-16.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T** (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**: 834-42.
- Whenham RJ, Fraser RSS, Brown LP, Payne JA** (1986). *Tobacco mosaic virus* induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta*, **168**: 592–98.
- White RF** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to *Tobacco mosaic virus* in tobacco. *Virology*, **99**: 410–12.
- White KA, Bancroft JB, Mackie GA** (1991). Defective RNAs of *Clover yellow mosaic virus* encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology* **183**: 479-86.
- White MR, Garcin ED** (2016). The sweet side of RNA regulation: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a noncanonical RNA-binding protein. *Wiley Interdiscip Rev. RNA*, **7**: 53–70.
- Whitham SA, Quam S, Chang HS, Coorer B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM** (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common set of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **33**: 271-83.

- Wright KM, Wood NT, Roberts AG, Chapman S, Boevink P, MacKenzie KM, Oparka KJ** (2007). Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: Evidence from FRAP. *Traffic*, **8**: 21-31.
- Wu F, Li Q, Yan H, Zhang D, Jiang G, Jiang Y, Duan X** (2016). Characteristics of three thioredoxin genes and their role in chilling tolerance of harvested banana fruit. *Int. J. Mol. Sci*, **17**
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep*, **1**: 639–47.
- Xia XJ, Chen Z, Yu JQ** (2010). ROS mediate brassinosteroids-induced plant stress responses. *Plant Signal. Behav.* **5**: 532–34.
- Xie ZX, Fan BF, Chen CH, Chen ZX** (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 6516–21.
- Yang SJ, Carter SA, Cole AB, Cheng NH, Nelson RS** (2004). A natural variant of a host RNA dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 6297–02.
- Yang ZN, Mathews DM, Dodds JA, Mirkov TE** (1999). Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes*, **19**: 111–42.
- Yang G, Mawassi M, Gofman R, Gafny R, Bar-Joseph M** (1997). Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *Citrus tristeza virus* molecules. *J. Virol*, **71**: 9800-02.

- Yang SJ, Revers F, Souche S, Lot H, Le Gall O, Candresse T, Dunez J** (1998). Construction of full-length cDNA clones of *Lettuce mosaic virus* (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Arch. Virol*, **143**: 2443-51.
- Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML, Mirkov TE** (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**: 382-93.
- Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML, Mirkov TE** (2003). Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L.Raf. *Plant Physiol*, **131**: 482-92.
- Ye C, Verchot J** (2011). Role of unfolded protein response in plant virus infection. *Plant Signal Behav*, **6**: 1212-15.
- Yokomi RK, Garnsey SM** (1987). Transmission of *Citrus tristeza virus* by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica*, **19**: 169-72.
- Yokomi RK, Lastra R, Stoetzel MB, Damsteegt VD, Lee RF, Garnsey SM, Gottwald TR, Rocha-Pena MA, Niblett CL** (1994). Establishment of the brown citrus aphid (*Homoptera, Aphididae*) in Central-America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *J. Econ. Entomol*, **87**: 1078-85.
- Yoshida T** (1985). Inheritance of susceptibility to *Citrus tristeza virus* in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Bull. Fruit Tree Res. Sta*, **12**: 17-25.
- Yoshida T** (1996). Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantoidea* and their susceptibility to *Citrus tristeza virus*. *Plant Dis*, **80**: 414-17.

- Yount B, Curtis KM, Baric RS** (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol*, **74**: 10600-11.
- Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS** (2002). Systematic assembly of a fulllength infectious cDNA of *Mouse hepatitis virus* strain A59. *J. Virol*, **76**: 11065-78.
- Yu DQ, Fan BF, MacFarlane SA, Chen ZX** (2003). Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **16**: 206–16.
- Zasloff M** (1983). tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 6436–40.
- Zeng L, Velásquez AC, Munkvold KR, Zhang J, Martin GB** (2012). A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *Plant J*, **69**: 92–03.
- Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X** (2006). Negative regulation of defence responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *Plant J*, **48**: 647–56.
- Zhang X, Singh J, Li D, Qu F** (2012). Temperature dependent survival of *Turnip crinkle virus* infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. *J. Virol*, **86**: 6847–54.
- Zhang, X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH** (2006). *Cucumber mosaic virus* encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, **20**: 3255–68.

Zik M, Arazi T, Snedden WA, Fromm H (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase in Arabidopsis are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. *Plant Mol. Biol*, **37**: 967-75.

Zhu SF, Gao F, Cao XS, Chen M, Ye GY, Wei C, Li Y (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 Physiol*, **139**: 1935-45.