

Trabajo Final de Máster

Caracterización del determinante viral que confiere la capacidad de infectar *Arabidopsis thaliana* al virus del arrugamiento del nabo

María Sáiz Bonilla

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Curso 2018/2019



Directores científicos

José Antonio Navarro Bohigues

Vicente Pallás Benet

Tutor Académico

María Purificación Lisón Párraga

RESUMEN

Actualmente, los carmovirus se clasifican en tres géneros diferentes, en base a las relaciones filogenéticas de sus RNA polimerasas (RdRp): los Alfacarmovirus, cuyo miembro tipo es el virus del moteado del clavel, CarMV; los Betacarmovirus; cuyo miembro tipo es el virus del arrugamiento del nabo, TCV; y los Gammacarmovirus, cuyo miembro tipo es el virus de las manchas necróticas del melón, MNSV. En general, estos virus presentan una gama de huéspedes naturales muy estrecha. Alfa y Betacarmovirus causan enfermedades principalmente en plantas ornamentales con flor mientras que los Gammacarmovirus infectan leguminosas, con la excepción del MNSV que se encuentra restringido a cucurbitáceas. Sin embargo, a nivel de huésped experimental, únicamente TCV, pero no CarMV ni MNSV, es capaz de infectar *Arabidopsis thaliana* sistémicamente, a pesar de que los tres miembros tipo presentan una organización genómica muy parecida. Todos los carmovirus se caracterizan por presentar un genoma simple, que consta de una molécula de RNA lineal monocatenario y de polaridad positiva, y de pequeño tamaño, aproximadamente 4 kb. Este se organiza, al menos, en cinco pautas de lectura abierta (ORFs), generalmente, solapadas entre ellas. *A. thaliana* se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de diferentes aspectos científicos en plantas, entre ellos la interacción planta-patógeno. Un aspecto muy relevante de la Virología vegetal es dilucidar cuales son los factores virales que determinan la especificidad de huésped. En el Trabajo Final de Máster que se describe en esta memoria se pretendió identificar el determinante viral que confiere al TCV la particularidad de infectar *A. thaliana*. Para ello, partiendo de clones infecciosos de los tres virus, ya disponibles en el laboratorio, se procedió a la obtención de construcciones recombinantes de MNSV y CarMV con diferentes factores o elementos funcionales de secuencia del TCV para, posteriormente, evaluar su capacidad infecciosa en *A. thaliana*. La obtención de variantes de MNSV y/o CarMV capaces de infectar *A. thaliana* facilitaría los estudios sobre la relación de estos virus con su huésped.

Palabras clave: Carmovirus, *Arabidopsis thaliana*, infección, virus recombinantes, interacción planta-patógeno.

ABSTRACT

Currently, carmoviruses have been classified into three different genera, based on the phylogenetic relationships of their RNA polymerases (RdRp): the Alfacarmoviruses, whose type member is the *Carnation mottle virus*, CarMV; Betacarmoviruses; whose type member is *Turnip crinkle virus*, TCV; and the Gammacarmoviruses, whose type member is *Melon necrotic spot virus*, MNSV. In general, these viruses have a very narrow range of natural hosts. Alpha and Betacarmovirus cause diseases mainly in ornamental plants while Gammacarmoviruses infect legumes, with the exception of MNSV that is restricted to cucurbits. However, at the experimental host level, only TCV, but not CarMV or MNSV, is able to infect *A. thaliana* systemically, even though the three type members have a very similar genomic organization. All carmoviruses are characterized by presenting a simple genome, which consisting of a linear single-stranded RNA molecule of positive polarity, and of small size, approximately 4 kb. This is organized, at least, in five open reading guidelines (ORFs), generally, overlapping among them. *Arabidopsis thaliana* has become a model organism for the study of different scientific aspects in plants, including the plant-pathogen interaction. A very important aspect of plant Virology is to elucidate which are the viral factors that determine the host specificity. In the Final Master's Project described in this report, we aimed to identify the viral determinant that confers TCV the particularity of infecting *A. thaliana*. For this purpose, starting from infectious clones of the three viruses, already available in the laboratory, we obtained recombinant constructions of MNSV and CarMV with different factors or functional sequence elements of the TCV and evaluated their infectious capacity in *A. thaliana*. Obtaining variants of MNSV and/or CarMV capable of infecting *A. thaliana* would facilitate studies on the relationship of these viruses with their host.

Keywords: Carmovirus, *Arabidopsis thaliana*, infection, recombinant viruses, plant-pathogen interaction.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los virus de plantas: relevancia del sistema modelo de estudio y de los factores del huésped implicados en la infección viral	1
1.2. Los carmovirus	2
1.2.1. Taxonomía y clasificación	2
1.2.2. Organización genómica	3
1.2.3. Expresión génica y replicación	4
1.2.4. Organización genómica y expresión génica de MNSV, TCV y CarMV	5
1.2.5. Función de las proteínas virales	6
1.2.6. Distribución, hospedadores y transmisión	11
1.2.7. Antecedentes a este proyecto	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Materiales	17
3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	17
3.1.2. Construcciones de los genomas virales completos	17
3.1.3. Cepas bacterianas	17
3.1.4. Plásmidos	17
3.2. Métodos	19
3.2.1. Clones recombinantes de CarMV y MNSV	19
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR inversa	19
3.2.3. Análisis y purificación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR	20
3.2.4. Reacciones de ensamblaje de fragmentos de PCR y reacciones de ligación	21
3.2.5. Transformación de células bacterianas	22
3.2.6. PCR de colonia y extracción de DNA plasmídico	22
3.2.7. Reacciones de transcripción <i>in vitro</i> y bioensayos en <i>A. thaliana</i>	23
3.2.8. Análisis de las plantas inoculadas mediante hibridación Dot blot	24
3.2.9. Análisis de las plantas inoculadas mediante hibridación Northern blot	25
4. RESULTADOS	28
4.1. Clones que intercambian la proteína de cubierta: pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV})	28
4.1.1. Construcción de los clones pCarMV(CP _{TCV}) y pMNSV(CP _{TCV})	28

4.1.2.	Bioensayos de infectividad de los clones pCarMV(CP _{TCV}) y pMNSV(CP _{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP _{TCV}) y MNSV(CP _{TCV}), mediante transcripción <i>in vitro</i>	30
4.1.3.	Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP _{TCV}) y MNSV(CP _{TCV}) en <i>A. thaliana</i>	31
4.2.	Clones que intercambian la proteína de cubierta y el extremo 3'UTR: pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV})	33
4.2.1.	Construcción de los clones pCarMV(CP-3'UTR _{TCV}) y pMNSV(CP-3'UTR _{TCV})	34
4.2.2.	Bioensayos de infectividad de los clones pMNSV(CP-3'UTR _{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR _{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP-3'UTR _{TCV}) y MNSV(CP-3'UTR _{TCV}), mediante transcripción <i>in vitro</i>	37
4.2.3.	Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP-3'UTR _{TCV}) y MNSV(CP-3'UTR _{TCV}) en <i>A. thaliana</i>	37
4.3.	Clones que intercambian la proteína de cubierta y los extremos UTR: pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV})	39
4.3.1.	Construcción de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR _{TCV})	40
4.3.2.	Bioensayos de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) y MNSV(CP-3'-5'UTR _{TCV}), mediante transcripción <i>in vitro</i>	43
4.3.3.	Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) y MNSV(CP-3'-5'UTR _{TCV}) en <i>A. thaliana</i>	43
5.	DISCUSIÓN	45
6.	CONCLUSIONES.....	49
7.	BIBLIOGRAFÍA	50
8.	ANEXO.....	56

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los virus de plantas: relevancia del sistema modelo de estudio y de los factores del huésped implicados en la infección viral

Como todo ser vivo, las plantas también pueden ser infectadas por patógenos virales. De hecho, el primer virus descrito en la historia de la biología fue un virus de plantas, el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Su descubrimiento, hace más de un siglo, dio lugar a la definición del concepto mismo de virus y al nacimiento de la virología como área científica. Desde entonces, se han descrito más de 1000 virus que afectan a plantas (Harrison y Wilson, 1999). Indudablemente, la primera razón para el estudio de los virus de plantas son las enfermedades que provocan, responsables anualmente de grandes pérdidas económicas en las cosechas agrícolas y solo superadas, en cuanto a número e importancia, por aquellas provocadas por hongos.

La inmensa mayoría de los virus de plantas están compuestos básicamente por una nucleocápside, una estructura proteica que encierra un genoma de RNA. Sin embargo, al igual que en animales, se han encontrado una gran diversidad de tipos virales infectando plantas: virus con genomas de RNA o de DNA, tanto de simple como de doble cadena, con una única molécula de ácido nucleico (genoma monopartito) o varias (genoma multipartito), con y sin envuelta lipídica rodeando la nucleocápside (Marsh y Helenius, 2006). Su pequeño tamaño, su simplicidad estructural y su falta de actividad metabólica limita en gran medida el tipo de procesos que los virus son capaces de emprender por sí mismos. De hecho, los virus son parásitos intracelulares estrictos que han evolucionado para manipular la maquinaria celular y evadir los mecanismos de defensa de la planta. Esta situación hace que los virus dependan, dentro de la planta, de determinados factores del huésped para completar su ciclo de vida, y de vectores externos para transmitirse de una planta a otra (Wang, 2015).

Con el fin de aumentar nuestra comprensión sobre el ciclo de vida viral y desarrollar nuevas estrategias antivirales, uno de los objetivos de la virología actual trata de identificar funcionalmente aquellos factores tanto virales como del huésped que participan en la infección (Pallás y García, 2011; García y Pallás, 2015; Wang, 2015). Los métodos antivirales dirigidos contra factores virales tienen ciertas desventajas: a menudo afectan solo a una especie o subtipo viral específico; la baja fidelidad de las polimerasas de muchos virus los hace propensos a mutaciones, lo que puede llevar rápidamente al desarrollo de resistencias; y finalmente, los virus codifican pocas proteínas lo que limita el número de posibles dianas. Sin embargo, dirigir estas estrategias antivirales sobre las proteínas del huésped que usa el virus en las múltiples etapas de su ciclo de vida parece ser una alternativa más eficaz. La caracterización de los factores del huésped subvertidos por los virus nos proporcionará un catálogo de nuevas dianas que es poco probable que muten. Además, pueden dar lugar a estrategias antivirales con efecto sobre una gama más amplia de especies virales (Hsu y Spindler, 2012).

El inconveniente que surge cuando se pretende acometer esta tarea radica en que, a pesar del aumento rápido en el número de genomas de plantas completamente secuenciados, muy pocos se encuentran convenientemente anotados. De hecho, uno de los grandes retos de la genómica actual sigue siendo la anotación de genes. Esta tarea consiste en identificar y asignar funciones biológicas a los distintos elementos presentes en la secuencia genética de un organismo de la forma más exacta y fiable posible puesto que, una anotación errónea en una

base de datos puede ser propagada a futuras anotaciones (Stein, 2001). Idealmente, la asignación más fiable y exacta, aunque la más lenta y laboriosa, debe basarse en los conocimientos biológicos y bioquímicos de los expertos. En este sentido y debido al gran esfuerzo realizado por "*The Arabidopsis Information Resource (TAIR)*", que integra anotaciones basadas en evidencias bibliográficas junto con correcciones de la propia comunidad científica, el genoma del organismo modelo *Arabidopsis thaliana* sigue siendo, con diferencia, el mejor anotado de todos. Como ejemplo mencionar que en los dos últimos años se han realizado más de 2800 anotaciones validadas experimentalmente (Bolger *et al.*, 2018). Además, *A. thaliana* posee un tiempo de germinación corto, elevada progenie, tamaño reducido y facilidad de transformación genética, lo que la convierten en un sistema modelo fundamental en investigación.

Sin embargo, tan solo unas 40 especies de virus son capaces de infectar *A. thaliana* en condiciones experimentales (Ouibrahim y Caranta, 2013) y, de ellas, solo cinco se han encontrado en condiciones silvestres (Pagán *et al.*, 2010). Entre estas últimas se encuentra el virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV), el miembro tipo del género Betacarmovirus. Sin embargo, *A. thaliana* no es huésped de otros virus de interés agronómico, estrechamente relacionados con el TCV, como son el virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), el miembro tipo del género Gammacarmovirus o el virus del moteado del clavel (*Carnation mottle virus*, CarMV), el miembro tipo de los Alfacarmovirus.

Dada la elevada similitud estructural y funcional que estos tres virus, TCV, MNSV y CarMV, presentan en su organización genómica, en el Trabajo Final de Máster (TFM) que se describe en esta memoria se pretendió identificar el determinante viral que confiere al TCV la particularidad de infectar *A. thaliana*. Para ello, partiendo de clones infecciosos de los tres virus, ya disponibles en el laboratorio, se procedió a la obtención de construcciones recombinantes de MNSV y CarMV con diferentes factores o elementos funcionales de secuencia del TCV para, posteriormente, evaluar su capacidad infecciosa en *A. thaliana*. La obtención de virus recombinantes de MNSV o CarMV viables en *A. thaliana* permitiría un avance mucho más rápido en la identificación funcional de los factores del huésped implicados en el ciclo biológico de estos dos virus y el desarrollo de estrategias de control de los mismos. Para una mejor comprensión de las construcciones realizadas en este TFM se detalla a continuación la organización genómica de estos virus, así como la función asignada a cada factor viral.

1.2. Los carmovirus

1.2.1. Taxonomía y clasificación

Como ya se ha adelantado en la primera sección de esta introducción y basándose en el análisis filogenético de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), el anteriormente conocido como género Carmovirus ha sido dividido, recientemente, en tres nuevos géneros dando lugar a: Alfacarmovirus, cuyo miembro tipo es CarMV; Betacarmovirus, con TCV como miembro tipo; y Gammacarmovirus, cuyo miembro tipo es MNSV (Adams *et al.*, 2016; Navarro y Pallás, 2017).

Los tres géneros de carmovirus se encuentran clasificados dentro de la familia *Tombusviridae*, compuesta por pequeños virus de RNA (alrededor de 30 nm de diámetro) y formados por partículas poliédricas de contorno redondeado. Otros géneros pertenecientes a esta familia son Alphanecrovirus, Aureusvirus, Avenavirus, Betanecrovirus, Dianthovirus,

Gallantivirus, Macanavirus, Machlomovirus, Panicovirus, Tombusvirus, Umbravirus y Zeavirus. Los carmovirus presentan una alta similitud con los tombusvirus en estructura, morfología, tipo de genoma, propiedades fisicoquímicas y comportamiento epidemiológico y ecológico; difiriendo principalmente en el tamaño del genoma que es menor para los carmovirus (4 kb frente a 4.7 kb) (Russo *et al.*, 1994). El nombre carmovirus proviene de CarMV, el primer miembro de estos tres géneros que fue secuenciado: *Carnation mottle virus*. Sin embargo, la mayor parte del conocimiento en cuanto a estructura y genoma procedió inicialmente del TCV, ya que fue el primero en conocerse su estructura cristalina, además de ser el primer carmovirus cuyos transcritos infectivos fueron producidos a partir de un clon de cDNA (Qu y Morris, 1999).

1.2.2. Organización genómica

Dentro de los carmovirus encontramos virus compuestos por una hebra de RNA con polaridad viral, de alrededor de 4 kb de longitud y con 5 pautas de lectura abierta (*open reading frame*, ORF) (Russo *et al.*, 1994). La presencia de una estructura de tipo “CAP” en el extremo 5’ sólo ha sido demostrada para el CarMV (Guilley *et al.*, 1985) pero no es requerida para la infección. Además, estos virus tampoco presentan una cola poliadenilada en el extremo 3’, lo que hace que el inicio de la traducción sea dependiente de mecanismos no canónicos (Kneller *et al.*, 2006; Firth y Brierley, 2012). Mediante estudios comparativos de las distintas ORF se ha determinado que todos los carmovirus codifican un conjunto similar de proteínas que se muestran en el esquema general del genoma (Fig. 1.1) (Qu y Morris, 1999). En el caso del TCV, de forma adjunta al genoma, se pueden encontrar pequeños RNA de alrededor de 700 nt (RNA satélites) que requieren del virus (virus “*helper*”) para su replicación. Estos RNA satélite no presentan similitud de secuencia con el virus “*helper*” y no modifican la infección. Sin embargo, una excepción la constituye el RNA C, una mezcla entre un RNA satélite y un RNA defectivo (DI) del TCV que aumenta la sintomatología cuando está presente (Gallitelli y Hull, 1985; Simon, 2015).

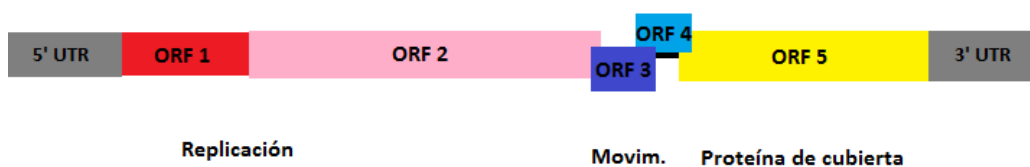


Figura 1.1: Representación esquemática de la organización genómica en los carmovirus. Tanto genes o ORF como las regiones 5’ y 3’ no traducibles (UTR) están representados por cajas de colores. La función de cada región del genoma se indica en la parte inferior de la figura.

Como se observa en la Figura 1.1, la organización genómica de estos virus es compacta ya que la mayor parte de las ORF identificadas se encuentran solapadas. En primer lugar, se sitúa el extremo 5’ no traducible (“*untranslate region*”, UTR) que varía su longitud de 34 a 88 nucleótidos y a continuación la ORF 1 que finaliza con un codón de terminación débil dando lugar a una proteína de entre 25-29 kDa. Esta ORF ha sido caracterizada como una replicasa auxiliar. Por otro lado, la lectura a través de este codón da lugar a una proteína de 81-89 kDa que constituye la ORF 2, la verdadera RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). De forma diferencial, la ORF 2 de CarMV contiene otro codón débil seguido por un codón de terminación fuerte, pudiéndose sintetizar un polipéptido de 98 kDa. Esta proteína sólo se ha podido observar en condiciones forzadas bajo traducción *in vitro*, lo que cuestiona su existencia y función *in vivo*.

En el resto de carmovirus, la lectura a través del codón de parada de la ORF 2 no se produce dando lugar a una expresión independiente de las ORF 3 y 4, dos pequeñas proteínas situadas en mitad del genoma, que son necesarias para el movimiento entre células (*movement protein*, MP) y que constituyen el denominado bloque de dos genes (*double gene block*; DGB) (Hull, 2002). Aguas arriba del codón de parada de la ORF 2 se encuentra el codón de inicio de la ORF 3, formando un solapamiento parcial que sintetiza una proteína de alrededor de 6-8 kDa. Menos en el caso de MNSV, el final de la ORF 3 también se encuentra solapado con el inicio de la ORF 4 cuyo codón de iniciación está aguas abajo de la RdRp y da lugar a una proteína de 6-13 kDa. En MNSV, la ORF 3 posee un codón de terminación débil que permite codificar una proteína teórica de 14 kDa, formada conjuntamente por las ORF 3 y 4 (Russo *et al.*, 1994). Sin embargo, la eliminación de este codón de parada da lugar a virus incapaces de moverse entre células contiguas (Genovés *et al.*, 2006). La última pauta de lectura es la ORF 5. Esta ORF codifica una proteína de cubierta (*coat protein*, CP) multifuncional que puede actuar como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional (Thomas *et al.*, 2003; Genovés *et al.*, 2006; Martínez-Turiño y Hernández, 2009). La CP presenta un tamaño que oscila entre 37 y 39 kDa salvo en el caso del MNSV donde presenta un tamaño de 42 kDa. Finalmente, esta última ORF está seguida de una secuencia no traducible de 224 a 406 nt, el extremo 3' UTR (Navarro y Pallás, 2017).

1.2.3. Expresión génica y replicación

La arquitectura del genoma de los carmovirus es fundamental a la hora de regular la expresión secuencial de los genes virales durante la infección. Para los virus de RNA y de polaridad viral como los carmovirus, el propio genoma puede funcionar directamente como un RNA mensajero (mRNA) que, debido a la disposición estratégica de las ORF 1 y 2 en el extremo 3', codifica las dos proteínas necesarias para la replicación del genoma, la replicasa auxiliar y la RdRp específica del virus. Este descubrimiento se realizó mediante ensayos de traducción *in vitro* del genoma viral (Russo *et al.*, 1994) y es totalmente coherente con lo esperado. Los virus no disponen de un sistema de traducción de proteínas propio y, salvo en el caso de los viroides, las RNA polimerasas celulares implicadas en la síntesis de mensajeros no pueden catalizar la formación de RNA a partir de un molde de RNA, sino que necesitan un molde de DNA. Por tanto, la unión de los ribosomas de la célula huésped directamente al extremo 5' del genoma viral, para realizar rápidamente la traducción de las replicasas virales, es totalmente necesaria para iniciar la infección antes de que los mecanismos de defensa de la planta se activen.

Una vez sintetizadas las proteínas implicadas en la replicación, estas producirán las cadenas de polaridad antiviral complementarias del RNA molde que, a su vez, serán utilizadas de nuevo como moldes para dar lugar a más cadenas de polaridad viral de longitud genómica (RNA genómico, gRNA). En carmovirus puede ocurrir una terminación prematura de la replicación que da lugar a RNA de longitud subgenómica (RNA subgenómico, sgRNA). Por lo tanto, estos sgRNA se caracterizan por tener el extremo 3' igual que en el gRNA, pero presentan deleciones en el extremo 5'. Con esto se consigue acercar este extremo al codón de inicio de las ORF que se encuentran aguas abajo y que estos sgRNA pueden funcionar como mRNA y ser traducidos. Tanto los gRNA como los sgRNA pueden ser empaquetados en los nuevos viriones que se sintetizan, aunque, los sgRNA de MNSV y TCV no se encapsulan *in vivo* en comparación con los sgRNA de CarMV (Russo *et al.*, 1994). Además, todos ellos pueden actuar como molde de la replicación puesto que, de forma característica, se puede encontrar RNA de doble cadena

(dsRNA) específico acumulándose en el tejido infectado y con el mismo tamaño que el gRNA y los sgRNA.

En carmovirus, las MP y la CP se expresan a partir de dos sgRNA coterminales en su extremo 3' (Russo *et al.*, 1994). Recientemente se ha demostrado que al menos una cierta proporción de la CP del TCV puede sintetizarse *in vivo* a partir de un sitio de iniciación interna desestructurado en el RNA genómico (May *et al.*, 2017). Aunque muchos carmovirus son capaces de replicarse en concentraciones muy altas produciendo una acumulación de gRNA semejante a la de los RNA ribosómicos de la propia planta (Qu y Morris, 1999), se piensa que, en parte, la síntesis de los sgRNA responde a la necesidad de obtener un alto número de copias de la CP, una proteína de gran relevancia multifuncional que no solo participa en la formación de los viriones. Así pues, existe un propósito estratégico en la disposición espacial de los genes en el genoma de los carmovirus: la RdRp se traduce en primer lugar a partir del RNA viral, y posteriormente los sgRNA son sintetizados y utilizados como guía para expresar el resto de productos virales necesarios para la infección (Miller y Koev, 2000).

1.2.4. Organización genómica y expresión génica de MNSV, TCV y CarMV

La organización genómica y expresión génica específica para los tres carmovirus utilizados en este TFM se detalla a continuación:

- El MNSV presenta un genoma de aproximadamente 4.3 kb de longitud y dos RNA subgenómicos de 1.9 y 1.6 kb (Fig. 1.2). El gRNA sirve de mensajero para la síntesis de los productos de las ORF 1 y 2, que en este caso tienen un tamaño de 29 kDa la replicasa auxiliar (p29) y de 89 kDa la RdRp (p89). Las dos MP tienen un tamaño similar de 7 kDa (p7A y p7B) y son expresadas por el sgRNA 1 de 1.9 kb que actuaría como un RNA bicistrónico. Por último, la CP (p42) se expresa a partir del sgRNA 2 de 1.4 kb (Riviere and Ronchon, 1990).

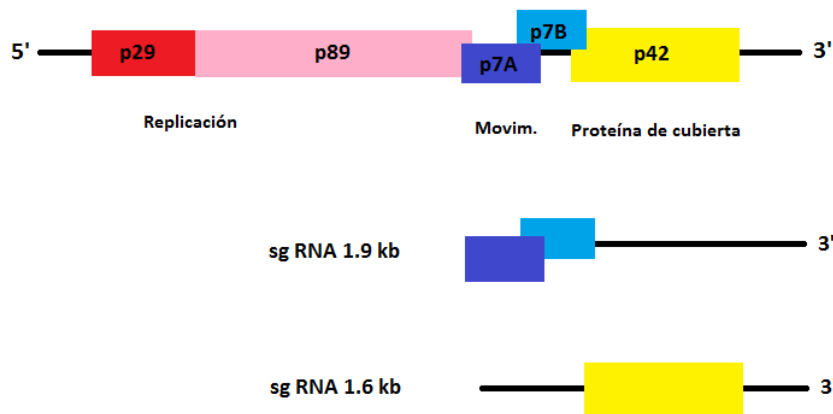


Figura 1.2: Representación esquemática de la organización genómica de MNSV. Los genes o ORF están representados por cajas de colores mientras que las regiones 5' y 3' no traducibles (UTR) están representadas por líneas. La función de cada región del genoma se indica en la parte inferior de la figura y los tamaños de los sgRNA en la parte izquierda de la figura.

- En el caso del TCV, aparte del gRNA de aproximadamente 4 kb, también se observan dos sgRNAs de 1.7 y 1.45 kb (Fig. 1.3). El gRNA sirve como mRNA para la síntesis de los productos de las ORF 1 y 2 (p28 y p88). El primer sgRNA actúa como un RNA bicistrónico

para la síntesis de las MP de 8 kDa y 9 kDa (p8 y p9) mientras que el sgRNA 2, más pequeño, actúa como molde para la síntesis de la CP de 38 kDa (Carrington *et al.*, 1989).

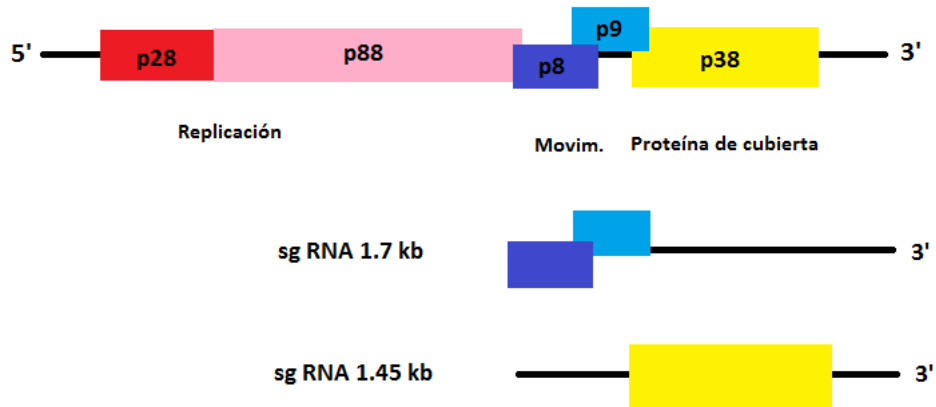


Figura 1.3: Representación esquemática de la organización genómica de TCV. Los genes o ORF están representados por cajas de colores mientras que las regiones 5' y 3' no traducibles (UTR) están representadas por líneas. La función de cada región del genoma se indica en la parte inferior de la figura y los tamaños de los sgRNA en la parte izquierda de la figura.

- Por último, el gRNA de CarMV presenta un tamaño similar al TCV (4 kb) y también es capaz de sintetizar dos sgRNA, uno de 1.75 kb que codificaría las dos MPs (p7 y p9) y otro de 1.6 kb que codifica la CP de 38 kDa (Fig 1.4). El gRNA es el que serviría para sintetizar los productos de las ORF 1 y 2 (p27 y p86) (Carrington y Morris, 1986).

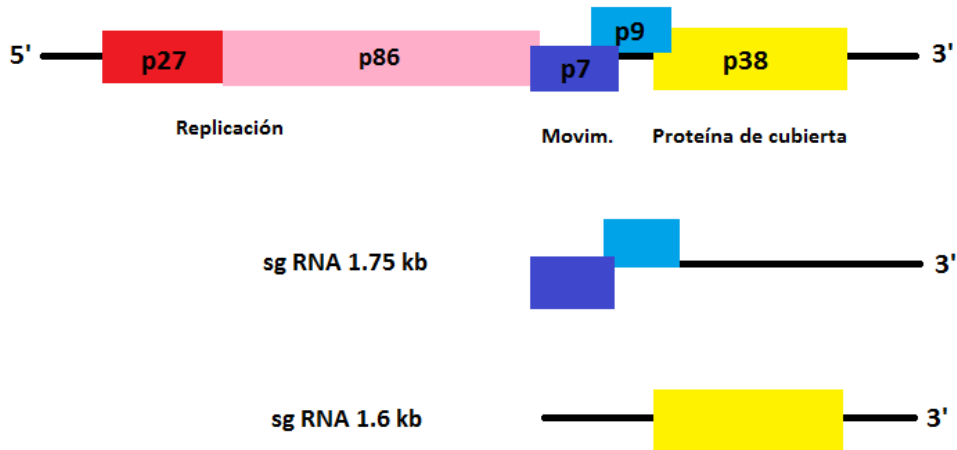


Figura 1.4: Representación esquemática de la organización genómica de CarMV. Los genes o ORF están representados por cajas de colores mientras que las regiones 5' y 3' no traducibles (UTR) están representadas por líneas. La función de cada región del genoma se indica en la parte inferior de la figura y los tamaños de los sgRNA en la parte izquierda de la figura.

1.2.5. Función de las proteínas virales

La función de las proteínas de los carmovirus en la replicación, encapsidación y movimiento de los carmovirus ha sido estudiada principalmente en TCV, MNSV y el virus de la rotura del color de la flor del Pelargonium (*Pelargonium flower break virus*, PFBV).

- **Replicasa auxiliar y RNA polimerasa dependiente de RNA**

El producto de la ORF más próxima al extremo 5' (ORF 1) y el producto de su lectura a través (ORF 2) son los únicos dos componentes de los carmovirus implicados en la formación del complejo con actividad polimerasa. La ORF 2 es la RdRp que funciona como la subunidad catalítica en concierto con la replicasa auxiliar (ORF 1) y con proteínas huésped en el complejo de replicación y/o transcripción. La mayoría de las RdRp han sido identificadas en base a la conservación de secuencia y, en el caso del TCV, MNSV y PFBV, varios estudios de análisis mutacionales demuestran que ambos productos son necesarios para la replicación del RNA viral en protoplastos y/o en la propia planta (Hacker *et al.*, 1992; Genovés *et al.*, 2006; Martínez-Turiño y Hernández, 2010). La actividad replicasa de la RdRp reside en un motivo GDD, altamente conservado tanto en virus de animales como de plantas y bacterias (Kamer y Argos, 1984), e implicado en la coordinación de iones metálicos (Jablonsky y Morrow, 1995). Entre las RdRp de TCV, MNSV y CarMV existe un alto porcentaje de residuos conservados característicos de las RdRp, incluidos dos motivos helicasa de ácidos nucleicos (Riviere y Ronchon, 1990).

Sin embargo, la actividad catalítica ha sido demostrada bioquímicamente solo para la RdRp del TCV mediante preparaciones procedentes de plantas infectadas con TCV o mediante expresión de la proteína en bacteria (Song y Simon, 1994; Rajendran *et al.*, 2002). Ambas preparaciones presentaron actividad RdRp capaz de sintetizar moléculas complementarias desde cadenas de RNA asociadas al TCV (RNAs subvirales y RNAs satélite) tanto de sentido viral como antiviral. Además, este tipo de experimentos han proporcionado una valiosa información acerca de los elementos *cis* en el RNA que son importantes para la replicación y la expresión de genes. Entre ellos se encuentran los promotores (Song y Simon, 1995; Sun y Simon, 2006), los activadores (RNA replication enhancers, REN) y silenciadores de la replicación y los elementos de reclutamiento de molde (RE) (Cheng *et al.*, 2005).

Los promotores de las RdRp son estructuras estables formadas por una o más horquillas situadas en el extremo 3' UTR del genoma e identificadas por promover la síntesis de cadenas de RNA de sentido antiviral a partir del genoma monocatenario de sentido viral. Este tipo de estructuras se han encontrado en todos los carmovirus (Simon, 2015). Además, el bucle terminal de la horquilla denominada Pr está implicada en una interacción a larga distancia, filogenéticamente conservada. Esta interacción es necesaria para la lectura a través del codón de parada de la ORF1 y, por tanto, para la síntesis de la RdRp (Cimino *et al.*, 2011).

Por otro lado, y teniendo en cuenta los datos obtenidos en tombusvirus, se propuso que la replicasa auxiliar facilitaría la formación de los complejos multimoleculares al interactuar con la RdRp, el genoma viral y factores del huésped no identificados. También se asume que la replicasa auxiliar determina la localización subcelular de la replicación viral. En este sentido, varios trabajos sugieren que las mitocondrias son los orgánulos donde se replican los carmovirus: un análisis inmunológico de las proteínas mitocondriales de raíces indicó que la p28 de TCV está asociada a la membrana externa de las mitocondrias (Blake *et al.*, 2007); las fusiones de GFP de p27 y RdRp (p86) de PFBV se localizaron en mitocondrias tanto en plantas como en levadura (Martínez-Turiño y Hernández, 2012); el fraccionamiento de tejidos vegetales expresando la p29 de MNSV y las fusiones a GFP también mostraron que esta proteína está asociada con la membrana mitocondrial (Mochizuki *et al.*, 2008). Por último, en un estudio citopatológico, realizado en cotiledones de melón infectados con MNSV, se observó que los

posibles complejos de replicación estaban constituidos por mitocondrias modificadas (Gómez-Aix *et al.*, 2015).

- **Proteínas de movimiento**

La propagación de una infección requiere la presencia de unos factores virales no estructurales denominados proteínas de movimiento o MP. Estas proteínas cumplen diversas funciones: 1) unión del genoma viral; 2) asociación a factores del huésped; 3) interacción con factores virales tales como la CP; 4) transporte intracelular e intercelular a través del plasmodesmo, y, en ocasiones, 5) supresión del silenciamiento del RNA (Taliensky *et al.*, 2008). Los genes correspondientes a las MP en los carmovirus se presentan como un bloque en la parte central del genoma constituyendo el denominado bloque de dos genes (Double gene block, DGB) (Hull, 2002). La participación de estas MP en el movimiento célula a célula ha sido mostrado mediante análisis mutacionales para miembros de los tres géneros, TCV (Betacarmovirus), MNSV (Gammacarmovirus) y PFBV (Alphacarmovirus) (Li *et al.*, 1998; Genovés *et al.*, 2006; Martínez-Turiño y Hernández, 2011). Todos los mutantes de TCV, MNSV y PFBV obtenidos para estas dos proteínas fueron incapaces de infectar plantas tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, estos virus defectivos sí que infectaron células aisladas o protoplastos, lo que sugiere que estas MP desempeñan un papel esencial en el movimiento célula a célula. Además, la expresión transgénica o transitoria de las DGBp de TCV (p8) en *A. thaliana* o MNSV (p7A) en melón ha mostrado que ambas proteínas pueden complementar *in trans* el movimiento del correspondiente virus defectivo. Por último, también se mostró que el movimiento célula a célula de TCV en *A. thaliana* o de MNSV en melón no necesita la CP, aunque no ocurre lo mismo en otros huéspedes como *N. benthamiana* (Qu y Morris, 1999; Genovés *et al.*, 2009).

Las principales propiedades estructurales así como el transporte intracelular de cada MP (DGBp1 o DGBp2) ha sido principalmente estudiado en MNSV (p7A) y CarMV (p7) (Navarro y Pallás, 2017). Las DGBp1 (Fig. 1.5) solo tienen un alto grado de similitud a nivel de estructura secundaria. Todas ellas presentan tres dominios característicos: el extremo N-terminal desestructurado, rico en residuos ácidos que redistribuyen la carga negativa; la parte central estructurada en α -hélice y con un alto contenido en aminoácidos básicos implicados en la unión al RNA (RNA binding domain, RBD) y, finalmente, el extremo C-terminal estructurado en hoja β con dos tripéptidos altamente conservados, (V/I)A(D/E) y FNF; esta región le permite interactuar entre sí y, probablemente, con otras proteínas (Marcos *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2001; Vilar *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006; Genovés *et al.*, 2009).

En el caso del MNSV y del TCV, se ha observado que existe una relación directa entre la capacidad de unión a RNA de las DGBp1 y el movimiento célula a célula (Genovés *et al.*, 2009). Este dato junto con la localización subcelular de las DGBp1 de MNSV y CarMV en la periferia celular y/o pared celular cerca de los plasmodesmos (PD) las convierte en el principal candidato para iniciar el transporte del genoma viral hacia el PD y llegar a las células contiguas (García-Castillo *et al.*, 2003; Genovés *et al.*, 2009). Curiosamente la DGBp1 de TCV (p8) presenta dos señales de localización nuclear (NLS) que permiten a la proteína ser transportada al núcleo cuando se expresa transitoriamente. La funcionalidad de esta localización durante la infección sigue sin ser esclarecida (Cohen *et al.*, 2000b).

Las DGBp2 (Fig. 1.5) están divididas en dos subgrupos en función de si poseen uno (MNSV-like) o dos (CarMV-like) dominios transmembrana como en MNSV o como en CarMV, TCV y PFBV, respectivamente (Navarro *et al.*, 2006). Estos dominios les permiten anclarse a la membrana del retículo endoplasmático (RE) aunque con orientaciones diferentes. Así, la p7B de MNSV presenta una topología de tipo II (N-citosol y C-lumen) pero, los dominios N y C-terminal de la p8 de CarMV se encuentran orientados hacia el citoplasma mientras que los de la p8 de TCV están expuestos al lumen del RE (Vilar *et al.*, 2002). En el caso de PFBV, la correspondiente DGBp2 (p12) presenta una extensión N-terminal con capacidad de unión a RNA y con una cremallera de leucina probablemente implicada en interacciones proteína-proteína (Martínez-Turiño y Hernández, 2011). La asociación con el RE en planta solo se ha mostrado para las DGBp2 de MNSV y PFBV, aunque solo en el caso de la primera se ha estudiado con detalle su transporte al PD a través del aparato de Golgi (AG), así como los determinantes de estructura primaria y secundaria que controlan este proceso. La función de esta proteína en el PD no ha sido determinada todavía, pero se sabe que se requiere su correcta localización final para permitir el movimiento célula a célula del virus (Genovés *et al.*, 2010; Genovés *et al.*, 2011; Serra-Soriano *et al.*, 2014).

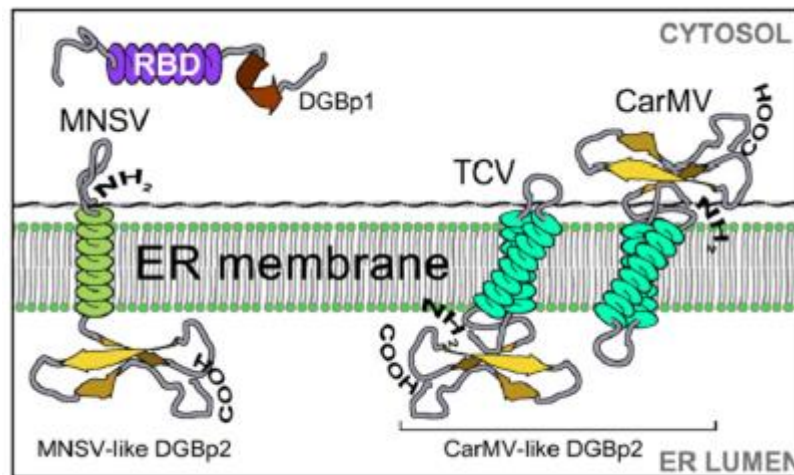


Figura 1.5: Representación de la estructura de las proteínas de movimiento para los virus MNSV, TCV y CarMV. Extraído de: Navarro y Pallás (2017).

○ **Proteína de la cápsida: estructura y ensamblaje del virión**

Los virus son estables y están en alta concentración en el tejido infectado de sus correspondientes hospedadores. Los viriones de los carmovirus son partículas redondeadas o ligeramente angulares con superficie granular. La partícula viral tiene una composición química simple con contenidos de RNA estimados del 17 al 22 %, el resto está compuesto de proteína (Morris y Carrington, 1988). En la actualidad se dispone de estudios detallados sobre la estructura de la CP y las interacciones establecidas entre las subunidades del virión para los tres miembros tipo de los géneros carmovirus, TCV, CarMV y MNSV (Fig. 1.6) El virión de los carmovirus está constituido por una cápsida icosaédrica con número de triangulación T=3 (30 nm de diámetro) formada por 180 subunidades de 37-42 kDa. Cada subunidad o CP está plegada en tres dominios estructurales típicos. El extremo N-terminal constituye el dominio R desestructurado (random) que interacciona con el RNA y se extiende hacia el interior de la partícula vírica. El dominio R es rico en argininas, lisinas, prolinas y glutaminas. A su vez, está

conectado mediante un brazo al primer dominio estructurado, el dominio S (shell, surface). Este da lugar al caparazón del virión ya que constituye el soporte superficial de la cápsida. El dominio S consiste en un núcleo formado por un paquete de 8 láminas β antiparalelas con dos regiones helicoidales. Este dominio es más estrecho en un extremo lo que le da forma de cuña permitiendo el empaquetamiento de subunidades cercanas. El dominio S está unido mediante una región bisagra al dominio P (protuding), que se proyecta hacia el exterior desde la superficie del virión. Los dominios P de las subunidades próximas se agrupan en dímeros dando lugar a 90 proyecciones en la superficie vírica (Russo *et al.*, 1994; Qu y Morris, 1999; Morris y Carrington, 1988). Aunque el MNSV se ha clasificado como un carmovirus, su CP presenta mayor similitud con los tombusvirus en lo que respecta a secuencia primaria, longitud de los dominios R y P y estructura tridimensional (Riviere *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 2008). Este hecho indica que el MNSV puede haber adquirido el gen de la CP durante un proceso de recombinación en una infección conjunta con un tombusvirus. La recombinación parece ser un fenómeno relativamente común entre tombusvirus y carmovirus comparado con otros virus de la familia *Tombusviridae* (Boulilla, 2011).

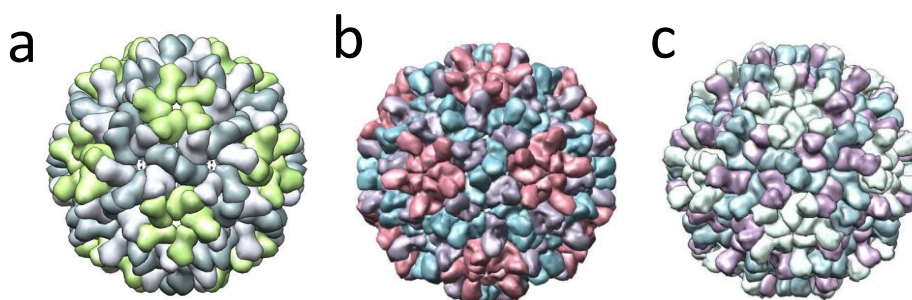


Figura 1.6: Representación tridimensional de las partículas víricas o viriones de MNSV (a), CarMV (b) y TCV (c).

En la familia *Tombusviridae*, las CP de los carmovirus y las proteínas P19, que están totalmente anidadas dentro de las MP de los tombusvirus, son los principales supresores del silenciamiento de RNA (viral suppressor of RNA silencing, VSR) caracterizados (Burgyan y Havelda, 2011). Sin embargo, las CP de tombusvirus carecen de actividad VSR, aunque no es el caso de la CP de MNSV (Genovés *et al.*, 2006). Las CP genuinas de carmovirus y la CP del único miembro del género *Pelarspovirus*, recientemente propuesto (Pérez-Canamás y Hernández, 2015), poseen un motivo GW que imita el motivo repetitivo GW/WG de las proteínas celulares que interactúan con AGO. En el caso del TCV, se ha propuesto que la CP impide la carga de siRNA en AGO1 al interactuar con AGO1 (Azevedo *et al.*, 2010). Además de esta interacción proteína-proteína, se ha postulado que las CP de los carmovirus se unen a los siRNA virales como un mecanismo alternativo de silenciamiento de RNA (Merai *et al.*, 2006). Esta unión se basa en aminoácidos básicos específicos dentro del dominio S (Cao *et al.*, 2010) aunque también se ha demostrado la relevancia del motivo GW en la unión a siRNAs (Azevedo *et al.*, 2010; Pérez-Canamás y Hernández, 2015). La CP de MNSV carece del motivo GW pero, en ausencia de proteínas similares a la P19 o la CP genuina de carmovirus, podría haber adquirido su actividad VSR adaptando su región N-terminal para interactuar con diferentes moléculas de RNA como el genoma viral y los siRNA (Serra-Soriano *et al.*, 2017). Como las funciones de encapsidación y supresión del silenciamiento génico residen en el mismo dominio, deben ser mutuamente

excluyentes por lo que debe existir un mecanismo, todavía no caracterizado, que regule la ratio entre estos dos procesos.

Los mutantes del TCV con una deleción completa de la CP o con una mutación que impida la expresión de la proteína conservan la capacidad de infectar protoplastos y moverse célula a célula en hojas inoculadas de *A. thaliana*, pero no pueden establecer una infección sistémica (Russo *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2000a; Hacker *et al.*, 1992). A pesar de esto, el movimiento célula a célula del TCV en ausencia de la CP no es posible en algunas especies como *N. benthamiana*, pero no sólo como una consecuencia directa de su papel como VSR (Qu *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2003). Por otro lado, la CP de MNSV al funcionar como VRS potencia la propagación local del MNSV y es necesaria para producir la infección sistémica (Genovés *et al.*, 2006). Estos resultados indican que el transporte intra e intercelular de los carmovirus debe llevarse a cabo en forma de complejos ribonucleoproteicos y no como viriones que sí podrían ser necesarios para el movimiento a larga distancia.

Diversos estudios sugieren que la CP de los carmovirus interactúa con las plantas hospedadoras en otras vías aparte del ensamblaje del virión ya que cambios mínimos en los aminoácidos de la CP modifican los síntomas de la infección. En el TCV, la CP también está implicada en interacciones con el RNA satélite C, puesto que la presencia de este RNA conlleva una intensificación de los síntomas (Qu y Morris, 1999). Además, el dominio P de la CP del MNSV está implicado en la unión a la superficie de las zoosporas de *Olpidium bornovanus* para facilitar la transmisión externa (Mochizuki *et al.*, 2008; Ohki *et al.*, 2010).

- **Extremos no codificantes: 5' y 3' UTR**

Tanto los gRNA como los sgRNA de los carmovirus no poseen ni estructura "CAP" en el extremo 5' ni una cola poli(A) en el 3'. Ambas estructuras son necesarias para el proceso normal de traducción; la primera es fundamental para el reconocimiento y el acceso apropiado del ribosoma mientras que la cola poli(A) protege al RNA frente a la degradación, y aumenta su estabilidad facilitando la síntesis de una mayor cantidad de proteína. Así, para acercar los ribosomas al extremo 5' del RNA viral y comenzar la traducción, los carmovirus dependen de mecanismos no canónicos de inicio. Con este fin, los RNAs virales presentan elementos de estructura secundaria y terciaria en el extremo 3' UTR, que pueden extenderse hasta la ORF de la CP, denominados 3' CITE ("3' cap-independent translation enhancers"). Los 3' CITE son sitios de unión de factores de iniciación de la traducción de la familia eIF4E o eIF4G que inducen la unión de ribosomas o subunidades ribosomales al extremo 5'. Para ello, aunque con excepciones como el TCV, se produce una interacción a larga distancia con pequeñas estructuras secundarias situadas en 5'-UTR. Como se ha comentado con anterioridad, en el extremo 3'-UTR también se sitúan otros elementos promotores que aproximan la RdRp para iniciar la replicación y/o transcripción. Teniendo en cuenta que este último proceso es incompatible con la traducción, el extremo 3' UTR también deberá presentar elementos para regular la ratio entre estos dos procesos (revisado en Simon y Miller, 2013; Simon, 2015; Miras *et al.*, 2017; Truniger *et al.*, 2017).

1.2.6. Distribución, hospedadores y transmisión

La familia *Tombusviridae* posee una gama de huéspedes reducida y restringida a dicotiledóneas, la mayor parte de estos virus son adquiridos sin necesidad de ningún vector al encontrarse en la mayor parte de los ambientes naturales (aguas superficiales y tierras de cultivo) (Russo *et al.*, 1994).

Los carmovirus están distribuidos en todo el planeta y generalmente causan infecciones asintomáticas o leves en una gama de huéspedes naturales relativamente restringida. Si bien, la de huéspedes experimentales es amplia. La modificación citológica más importante producida por todos los carmovirus está relacionada con la alteración de las mitocondrias, lo que hace de estos orgánulos el principal candidato dónde se efectúa la replicación (Navarro y Pallás, 2017). Una característica común en su ecología es que su propagación es lenta y parece involucrar la transmisión por el suelo sin vectores, lo que es similar para los tombusvirus. La acumulación en altas temperaturas en tejidos infectados favorece la transmisión mecánica, aunque también se pueden transmitir con vectores biológicos, por suelo, agua de riego e incluso asociado a zoosporas fúngicas. Concretamente, virus como MNSV, el virus de la manchas foliares del pepino (*Cucumber leaf spot virus*, CLSV) y el virus del pepino transmitido por el suelo (*Cucumber soil-borne virus*, CSBV) son transmitidos en asociación con el hongo *Oplidium bornovanus* (Qu y Morris, 1999). El MNSV se ha detectado en aguas de riego de cultivos hidropónicos (Gosalvez *et al.*, 2003).

El CarMV está extendido por todo el mundo en cultivos de claveles (*Dianthus caryophyllus*). Los huéspedes están restringidos a miembros de la familia *Caryophyllaceae* y especialmente a especies de *Dianthus L.* Afecta alrededor de 30 especies en 15 familias de plantas (Morris y Carrington, 1988). El CarMV puede ser transmitido mecánicamente y por propagación vegetativa produciendo un suave moteado en hojas jóvenes y clorosis débil en las hojas más maduras aunque no siempre induce síntomas visibles (Fig. 1.7). Sin embargo, en combinación con otros virus como el virus del anillo grabado del clavel (*Carnation etched ring virus*, CERV) o el virus del moteado de las venas del clavel (*Carnation vein mottle virus*, CVMV) tiene un efecto sinérgico muy severo que puede conducir a la necrosis y la muerte de la planta (Jo *et al.*, 2015).

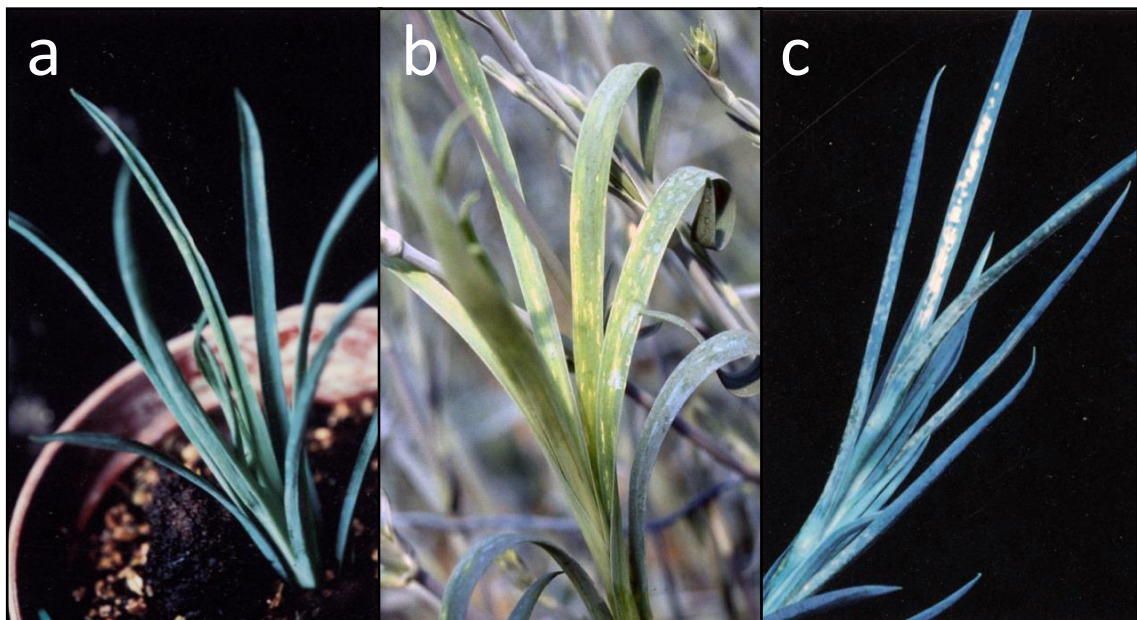


Figura 1.7: (a) Síntomas producidos por el virus del moteado del clavel mediante inoculación mecánica en *Dianthus caryophyllus*. (b) Síntomas de moteado clorótico en *D. caryophyllus* observados en campo.

El MNSV fue identificado en Japón y California en asociación con enfermedades de melón (Morris y Carrington, 1988). Afecta principalmente a cucurbitáceas, produciendo en ellas

síntomas característicos como manchas necróticas en las hojas, estrías marrones con aspecto acorchado en el cuello y en diferentes zonas a lo largo del tallo y manchas necróticas en la superficie del fruto con aspecto de corcho lo que conlleva un deterioro de la calidad de la fruta. El síntoma más relevante, al que se le atribuye el nombre de colapso o muerte súbita del melón, es la marchitez y muerte rápida de la planta, sobre todo en condiciones de estrés hídrico y plena producción (Fig. 1.8).

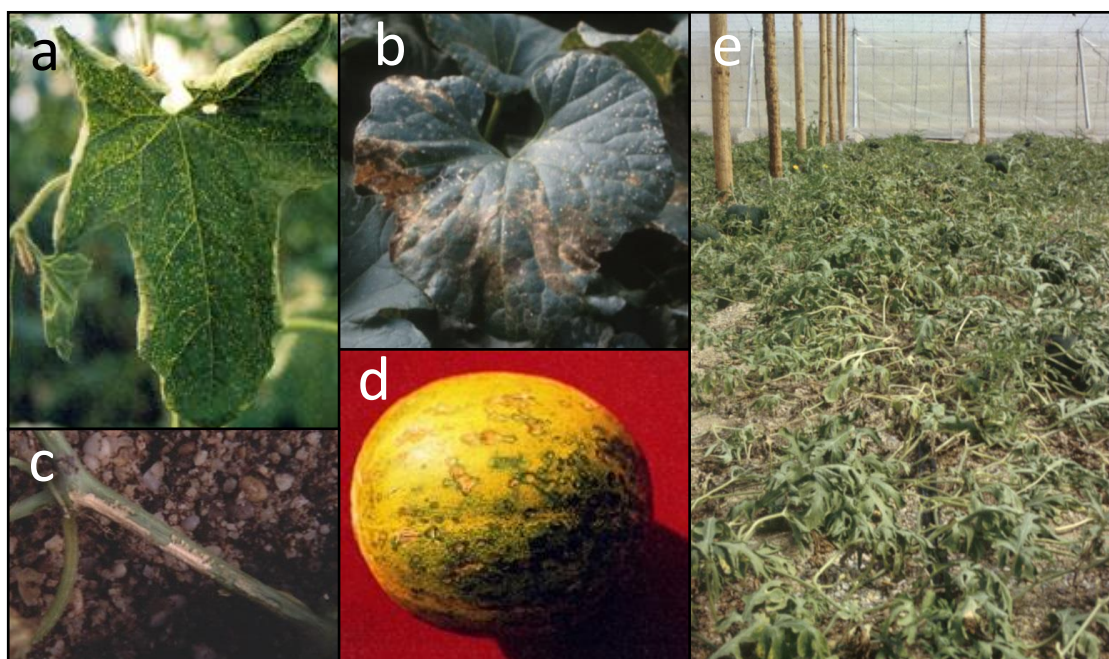


Figura 1.8: Principales síntomas producidos por el virus de las manchas necróticas del melón en hojas de melón (a) y sandía (b), tallo (c) y fruto (d). (e) Daños ocasionados por el colapso o muerte súbita del melón en un cultivo de sandía bajo invernadero.

Finalmente, el TCV posee una amplia gama de huéspedes de alrededor de 20 familias donde podemos encontrar plantas del género *Brassica* (*Brassica napus...*), pimiento (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y plantas modelo experimentales como *N. benthamiana* y *A. thaliana* (Fig. 1.9). Su acumulación en estas plantas es elevada, equivalentemente a un 0.5 % de peso fresco de tejido (Morris y Carrington, 1988; Qu y Morris, 1999). Concretamente, infecta *A. thaliana* Ecotipo Col 0 (Columbia). Esta capacidad infectiva es conferida por un locus dominante HRT en el cromosoma 5, el responsable de que *A. thaliana* exhiba un fenotipo de respuesta hipersensible al ser infectada (Callaway *et al.*, 2001).

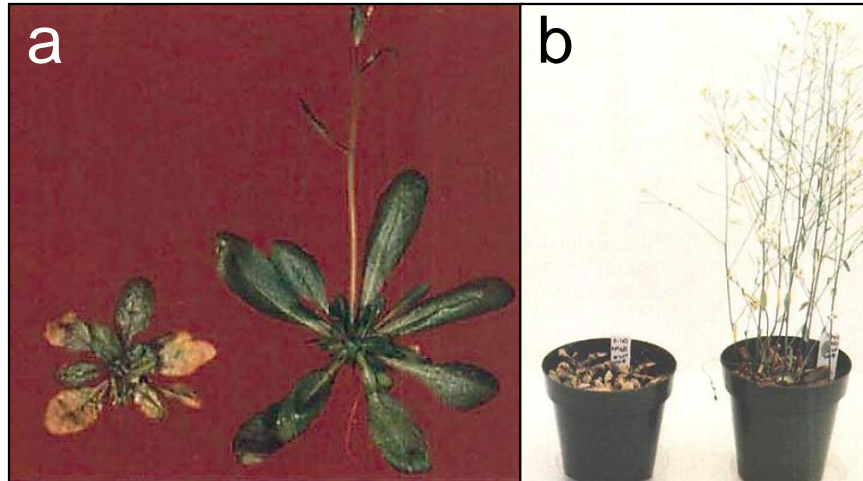


Figura 1.9: Efecto diferencial producido por el virus del arrugamiento del nabo en *A. thaliana* Col-0 (izquierda) y Dijon 17 (Di-17) (derecha) 8 (a) y 24 (b) días después de la inoculación mecánica.

Los distintos ecotipos de *A. thaliana* responden de manera distinta al TCV: Columbia 0 (Col-0) es susceptible mientras que Dijon 17 (Di-17) es resistente. La resistencia a TCV requiere un gen único y dominante denominado HRT que codifica un receptor del grupo CC-NBS-LRR (Coiled Coil Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat). Aunque HRT es suficiente para desencadenar la respuesta hipersensible (HR), la resistencia completa a TCV se obtiene en plantas que además poseen el alelo recesivo *rrt*. El activador de la respuesta HR en este sistema HRT/*rrt* es la CP, que actuaría como gen de avirulencia (Avr). Además, la CP interacciona con el factor de transcripción TIP (TCV interacting protein) provocando la inhibición de la ruta del ácido salicílico, un aumento en niveles de acumulación virales y la disminución de la sintomatología en el ecotipo Col0. Se ha postulado que la interacción con la CP mantendría a TIP fuera del núcleo evitando la expresión de genes relacionados con la respuesta basal de defensa de la planta (Ren *et al.*, 2005; Donze *et al.*, 2014).

1.2.7. Antecedentes a este proyecto

Como ya se ha mencionado anteriormente, los carmovirus poseen dos ORF centrales (Fig. 1.1) que forman el DGB en el que se encuentran las dos MP (DGBp1 y DGBp2). Estudios previos con la DGBp1 de CarMV, MNSV y TCV han determinado que estas MP poseen en su extremo N-terminal una estructura en α -hélice que le otorga capacidad de unión al RNA. Por otro lado, su extremo C-terminal está estructurado en forma de lámina β y podría estar implicado en establecer interacciones proteína-proteína. El sistema del doble híbrido en levadura (Yeast Two Hybrid, Y2H) es un método que permite la caracterización de interacciones proteína-proteína y la identificación de nuevas proteínas que interactúan in vivo. Previamente, en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo, se utilizó esta técnica para determinar la capacidad de las DGBp1 de CarMV (p7) y de MNSV (p7A) para interactuar consigo mismas y entre ellas formando homodímeros y heterodímeros, respectivamente. Estos estudios identificaron tres aminoácidos altamente conservados en la parte C-terminal de las DGBp1, F₆₃, N₆₄ y F₆₅, en los que reside la capacidad de interacción. Probablemente, el anclaje con otra proteína se realizaría mediante un apilamiento de tipo π entre anillos aromáticos cercanos.

Tras establecer esta interacción entre ambas MP, se realizó una búsqueda de factores de *A. thaliana* que pudiesen interactuar con la p7A del MNSV y la p7 del CarMV utilizando una

genoteca de expresión. Dada la similitud estructural y funcional de estas dos MP, la identificación de proteínas celulares comunes en ambos rastreos facilita la caracterización de interacciones funcionales reales, así como su generalización al resto de carmovirus. Posteriormente, se incorporó a este estudio la p8 de TCV, con lo que se tendría información del miembro tipo de cada uno de los tres géneros de carmovirus y se incluiría un virus que es capaz de infectar *A. thaliana*.

Tan solo tres proteínas interaccionaron con las tres MP siendo esencial el motivo FNF: la proteína ácida ribosomal RPP3A (At4g25890) que se encuentra en la protuberancia o tallo de la subunidad grande del ribosoma (60S), el factor de inicio de la traducción eIF3g 1 (At3g11400) que forma parte del complejo 3 de inicio de la traducción en eucariotas y el factor de transcripción WRKY36 (At1g69810), miembro de la familia de factores de transcripción WRKY de *A. thaliana* involucrados en distintos procesos fisiológicos incluida la defensa. Esta proteína se acumula en el núcleo formando cuerpos nucleares o agregados en el nucleoplasma. La relevancia de estos factores celulares se ha podido mostrar recientemente en el laboratorio mediante ensayos con mutantes nulos o con ensayos de silenciamiento génico inducido mediante infección viral (VIGS) en *A. thaliana* (manuscrito en preparación). El estudio de estas interacciones resalta la estrategia funcional establecida por las DGBp1 de carmovirus localizada principalmente en un motivo común multifuncional: los aminoácidos F₆₃, N₆₄ y F₆₅ de su extremo C-terminal. Sin embargo, en el mismo rastreo se identificaron otros factores que no interaccionaron con la DGBp1 de TCV pero si con las DGBp1 de MNSV y/o CarMV. La obtención de virus recombinantes de MNSV o CarMV viables en *A. thaliana* permitiría corroborar la participación de estos factores de la planta en el ciclo biológico de estos dos virus, así como su funcionalidad durante la infección.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A thaliana es un organismo modelo para el estudio de diversos procesos en plantas que no puede ser infectada ni por CarMV ni por MNSV aunque si por TCV, a pesar de que estos tres carmovirus presenten una organización genómica semejante. Esta restricción puede producirse en diferentes etapas del ciclo viral, aunque es lógico pensar, en primer lugar, en las barreras de defensa antiviral de la planta y en los mecanismos que tienen este tipo de virus para contrarrestarlas. En esta etapa, podemos destacar la CP, codificada por el último ORF y que desempeña un papel fundamental al actuar como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional o al regular la expresión de determinados genes de defensa. Además, teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos sobre MNSV, que se detallarán a lo largo de la memoria del trabajo, la importancia del inicio de la traducción en la capacidad de aumentar la gama de huéspedes o evitar resistencias es elevada. Por tanto, podríamos considerar el inicio temprano de la traducción de las RdRp como otra etapa limitante en el proceso infeccioso. En este proceso desempeñan un papel esencial las regiones no codificantes (UTR) situadas en ambos extremos del genoma. Ambas regiones pueden presentar elementos de estructura secundaria relevantes para la traducción, como los 3' CITE.

El objetivo principal de este Trabajo Final de Máster consistirá en identificar y transferir a los virus MNSV y CarMV el determinante viral de TCV que le confiere la capacidad para infectar plantas de *A. thaliana*. El objetivo principal se abordará mediante la consecución de los siguientes objetivos parciales o tareas:

- Obtención mediante diferentes técnicas de biología molecular de una colección de construcciones recombinantes en las que se transferirán secuencialmente diferentes módulos funcionales del TCV a los genomas del MNSV y del CarMV. Considerando las premisas mencionadas anteriormente estos módulos incluirán, inicialmente, el gen de la CP y los extremos 5' y 3' UTR.
- Realización de bioensayos en *A. thaliana* cv. Columbia 0 con las distintas construcciones recombinantes obtenidas en la tarea anterior mediante inoculación mecánica de los correspondientes RNAs virales obtenidos mediante transcripción *in vitro* y posterior análisis del grado de infección de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo los ensayos de infección de los distintos clones se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Col 0 (Columbia) en estadio desarrollo de 15 días post-germinación. Las plantas fueron cultivadas en bandejas de alveolos con un sustrato obtenido mezclando una proporción similar de vermiculita y turba. El cultivo se realizó en cámaras de crecimiento bajo unas condiciones de luminosidad y humedad específicas:

- Intervalo térmico de 25 °C (día) y 18 °C (noche)
- Humedad relativa 60-65 % (día) y 95-100 % (noche)
- Fotoperiodo de 16 horas bajo luz con longitud de onda entre 400-700 nm, una irradiancia de 65-86 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 8 horas de oscuridad

3.1.2. Construcciones de los genomas virales completos

Las construcciones utilizadas en este proyecto fueron las siguientes:

- Construcción pMNSV-AI: contiene el genoma completo del aislado de Almería, AI, del MNSV, *Melon necrotic spot virus* o virus del cribado del melón (Genovés *et al.*, 2006).
- Construcción pTCV-M: contiene el genoma completo del aislado Massachusetts del TCV, *Turnip crinkle virus* o virus del rizado del nabo (Oh *et al.*, 1995).
- Construcción pCarMV-Dix: contiene el genoma completo del aislado Dixie del CarMV, *Carnation mottle virus* o virus del moteado del clavel (Cañizares *et al.*, 2001).

Las tres construcciones pueden utilizarse como molde para la transcripción *in vitro* de los correspondientes genomas virales puesto que todos ellos están clonados detrás del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7.

3.1.3. Cepas bacterianas

Para la amplificación de plásmidos se utilizó la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli*.

3.1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados durante el TFM fueron los siguientes:

- pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific) (Fig. 2.1). Es un vector de clonación adquirido comercialmente en un estado linearizado y que sirve para la clonación de productos de PCR con extremos romos. Presenta una selección positiva al contener un gen letal, cuya pauta de lectura se interrumpe con la inserción de un fragmento de DNA, y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Además, el vector contiene el promotor del bacteriófago T7 lo que permite utilizarlo como molde para las transcripciones.

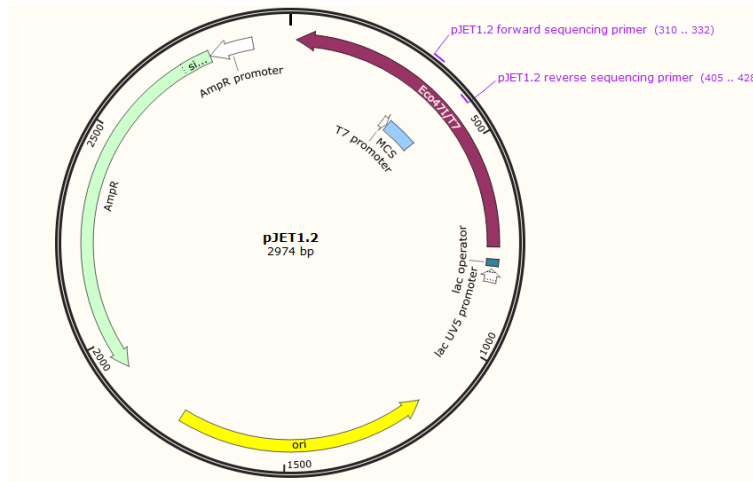


Figura 2.1: Representación esquemática del plásmido pJET. Formato: Snapgene.

- pUC18 (Norrander *et al.*, 1983) (Fig. 2.2). Este vector facilita la clonación gracias a la alta variedad de enzimas de restricción presentes en su sitio de clonaje múltiple, situado dentro del marco de lectura de la β -galactosidasa. Esto permite la selección por color en presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Además, presenta un gen de resistencia a ampicilina y no posee promotores de RNA polimerasas por lo que se han de introducir si se requieren.

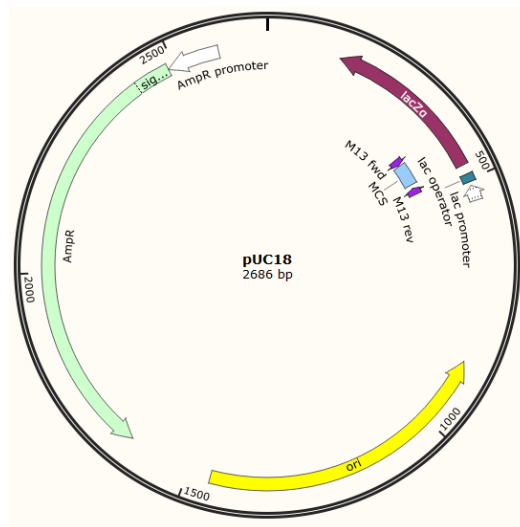


Figura 2.2: Representación esquemática del plásmido pUC18. Formato: Snapgene.

- pUPD2 “Universal GB Part Domesticator” (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013) (Fig. 2.3). Se trata de un vector de domesticación universal del sistema de clonación “Golden Braid”. Se utiliza generalmente para crear módulos GB (GBpart) bien directamente bien mediante un proceso de mutagénesis denominado domesticación. Durante la domesticación se ensamblan varios fragmentos de PCR introduciéndose una serie de mutaciones que eliminan los sitios de restricción BsmBI, BsaI y BtgZI internos. Estas endonucleasas, que pertenecen al tipo IIS, se caracterizan por reconocer secuencias de DNA asimétricas y cortar fuera de su sitio diana. Esta particularidad permite ensamblar fragmentos de DNA sin la introducción de secuencias no deseadas en los puntos de unión. Además, pUPD2 contiene un gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol.

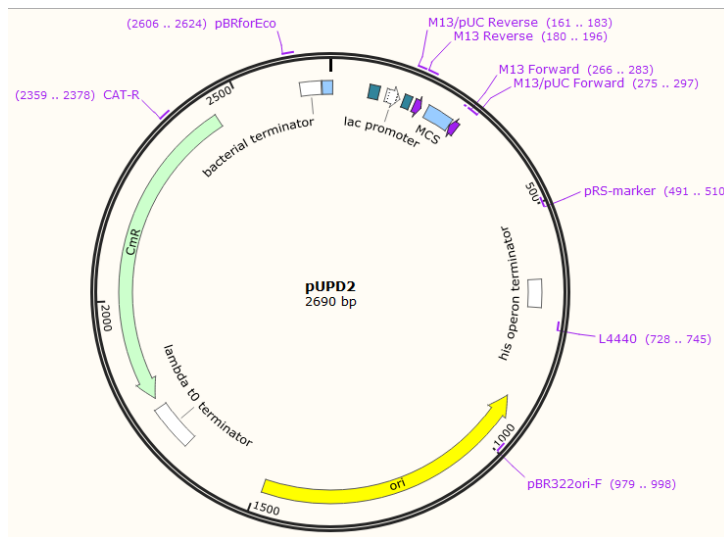


Figura 2.3: Representación esquemática del plásmido pUPD2. Formato: Snapgene.

3.2. Métodos

3.2.1. Clones recombinantes de CarMV y MNSV

La obtención de las construcciones recombinantes en las que se transfirieron secuencialmente diferentes módulos funcionales del TCv, el gen de la CP y los extremos 5' y 3' UTR, a los genomas del MNSV y del CarMV se realizaron mediante técnicas específicas de biología molecular. La estrategia específica utilizada para cada construcción se detallará en la sección de Resultados. Los clones de CarMV y MNSV que incorporan la proteína de cubierta (CP) del TCv se denominaron pCarMV(CP_{TCv}) y pMNSV(CP_{TCv}), respectivamente. Posteriormente, se realizaron los clones que presentan además de la CP, el extremo 3' UTR del TCv dando lugar a las construcciones, pCarMV(CP-3'UTR_{TCv}) y pMNSV(CP-3'UTR_{TCv}), respectivamente. Finalmente, a partir de las construcciones anteriores, se realizaron dos clones que, además, incorporaban el extremo 5' UTR del TCv: pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCv}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCv}). La secuencia nucleotídica de cada uno de los aislados de los virus utilizados, disponible en la base de datos, se utilizó para el diseño de los oligonucleótidos (Anexo Tabla A.1): DQ339157 (MNSV-AI), AJ304989.1 (CarMV-Dix) y M22445 (TCv-M). Las técnicas generales utilizadas durante el proceso de clonación se detallan a continuación.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR inversa

La mayor parte de las construcciones recombinantes se realizó por medio de varias reacciones en cadena de la polimerasa o PCR, utilizando la DNA polimerasa "PrimeSTAR HS" (Takara). Esta polimerasa posee una potente actividad exonucleasa 3' a 5' que le confiere una elevada capacidad de corrección de lectura. Además, carece de actividad terminal transferasa lo que da lugar a copias de cDNA con extremos romos. La mezcla de componentes utilizada para este tipo de PCR se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Mezcla para la reacción de PCR

5X Tampón PCR	1X
dNTPs	2.5 mM
Primers directo y reverso	0.2 µM
PrimeSTAR HS	2.5 U
Agua estéril	Hasta 50 µl

Las condiciones de amplificación fueron: un primer paso de desnaturalización a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 98 °C durante 10 segundos para la desnaturalización, 5 segundos a 55 °C para la hibridación y 1 min/kb de elongación a 72 °C, seguidos de 5 minutos finales de extensión a 72 °C.

Una variante de la técnica de PCR estándar utilizada en este TFM fue la PCR inversa. En concreto, se utilizó para sustituir los extremos 5' UTR del CarMV y del MNSV por el del TCV en un mismo paso. El método se basa en el empleo de cebadores divergentes, es decir, cebadores cuyos extremos 3' se dirijan hacia el exterior. Con cebadores de este tipo es imprescindible el uso de un molde circular para que se desarrolle la reacción. La amplificación se realizó en ciclos de dos etapas siendo las condiciones: un primer paso de desnaturalización a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 98 °C durante 10 segundos para la desnaturalización y 1 min/kb de elongación a 68 °C; finalmente, se realizó un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C.

3.2.3. Análisis y purificación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR

Una vez realizadas las distintas PCR, el resultado de estas fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 %. El gel se preparó fundiendo la agarosa sólida (1 g/100 ml) en tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 8). Para la visualización del DNA, previamente a la solidificación de la agarosa se añadieron 0.4 µl/50 ml del marcador de ácidos nucleicos MIDORI Green Xtra (Nippon Genetics) consiguiendo una concentración final de 0.1 µg/ml. Previamente a la carga de las muestras en gel, se añadió a estas 1/6 del volumen total de tampón de carga 6X (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 60 % glicerol, 60 mM EDTA, pH 8, 0.03 % azul de bromofenol y 0.03 % xileno cianol). El gel se introdujo en una cubeta de electroforesis con tampón TAE 1X, se cargaron las muestras y se corrieron a 100 V durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el gel se visualizó mediante un transiluminador UVIDOC HD6 (Uvitec). El tamaño del producto de PCR se estimó mediante comparación con el patrón de pesos moleculares de DNA "1 kb Plus" (Thermo Fisher Scientific).

La purificación de los fragmentos de DNA del gel de agarosa se realizó con el kit comercial "GeneJet Gel Extraction" (Thermo Fisher Scientific). Mediante este kit obtenemos el DNA de interés concentrado para su posterior utilización en otras reacciones. Para ello, la pieza del gel de agarosa que contiene el DNA amplificado se cortó mediante una cuchilla bajo la luz ultravioleta, y se colocó en un tubo de 2 ml. El fragmento de agarosa se pesó y se añadieron 2 V de tampón de disolución de agarosa (Buffer QG). El tubo se incubó a 65 °C hasta la completa fusión de la agarosa (aproximadamente 10 minutos). La mezcla resultante se transfirió a una columna de gel de sílice sobre un tubo de 2 ml. Se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó un lavado de la columna, añadiendo 0.75 ml de tampón de lavado (Buffer PE), centrifugando durante un minuto a 13000 y descartando de nuevo el sobrenadante. Para asegurar que se ha eliminado todo el tampón de lavado, se vuelve a centrifugar la columna y esta se transfiere a un nuevo tubo de 1.5 ml. Finalmente, se procedió a la elución del DNA mediante 30-50 µl de tampón de elución. Para facilitar la elución, la columna se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm.

3.2.4. Reacciones de ensamblaje de fragmentos de PCR y reacciones de ligación

i) Ensamblaje mediante fragmentos de DNA con extremos solapantes obtenidos por PCR. La reacción de PCR permitió tanto la amplificación de los distintos fragmentos virales de interés como la unión entre ellos por medio de oligonucleótidos solapantes. Esta técnica se llevó a cabo en 2 etapas. En una primera fase se realizaron dos PCR independientes, cada una con un oligonucleótido externo a la región a amplificar, y uno interno, siendo estos últimos complementarios entre sí en una región de aproximadamente 20-25 nt. Los fragmentos amplificados se purificaron según su tamaño en un gel de agarosa como se ha descrito anteriormente. En una segunda fase, los dos fragmentos amplificados se diluyeron 100 veces y se mezclaron, utilizándose como molde en cantidades aproximadamente equimolares para una segunda PCR. En este caso, la amplificación se realizó en dos pasos consistentes en 15 ciclos iniciales con una temperatura de hibridación más baja y sin oligonucleótidos para favorecer la extensión desde la zona solapante, y así enriquecer en molde, y otros 25 ciclos a una temperatura de hibridación más alta con los cebadores externos para favorecer la extensión desde los mismos y obtener cantidades suficientes de producto final ensamblado. Finalmente, este producto de PCR solapante se purificó de un gel de agarosa y se clonó en el vector correspondiente utilizando endonucleasas de tipo II como se detallará posteriormente. Por último, se comprobó que la unión de los fragmentos se había realizado correctamente mediante secuenciación de las regiones de interés.

ii) Ensamblaje mediante digestión con enzimas de restricción de tipo IIS y ligación. Otra estrategia utilizada en este trabajo para el ensamblaje modular se basó en el proceso de domesticación del método “Golden Braid” (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013). Esta estrategia utiliza la tecnología de las enzimas de restricción de tipo IIS que, a diferencia de los enzimas de tipo II, digieren 5-8 nt más allá del sitio de reconocimiento, independientemente de la secuencia y dejando extremos cohesivos. Los oligonucleótidos se diseñan de tal forma que los sitios de corte queden orientados hacia dentro del fragmento de PCR. De esta forma la diana desaparece tras la digestión y ensamblaje, facilitando una unión sin nucleótidos extra o costuras. Esto se debe a que los nucleótidos situados entre la secuencia diana y el punto de corte pueden ser elegidos siguiendo una “gramática” específica u otra. Como en la estrategia anterior, el ensamblaje se realizó en dos etapas. En la primera se amplificaron los fragmentos de DNA y se purificaron de gel de agarosa. En ese caso, los oligonucleótidos externos se diseñaron siguiendo la “gramática” GB para poder clonar el fragmento resultante directamente en pUPD2. En cambio, los oligonucleótidos internos se diseñaron, como en un proceso de domesticación, con la “gramática” específica para la unión sin costuras, pero sin introducir mutaciones en la secuencia. En una segunda etapa se mezclaron 75 ng de cada fragmento y 75 ng del vector pUPD2, descrito anteriormente, y se incubaron en presencia de 10 U de la endonucleasa de tipo IIS (en este caso BsmBI), 3 U de la DNA ligasa del bacteriófago T4 (Promega) y tampón de ligación 1X (Tris-HCl pH 7.8 300 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM y ATP 10 mM), en ciclos de digestión y ligación según el esquema, 1 ciclo de 10 minutos a 37 °C, 25 ciclos de 3 minutos a 37 °C y 4 minutos a 16 °C, 1 ciclo de 10 minutos a 50 °C y 1 ciclo de 10 minutos a 80 °C.

iii) Ligación mediante digestión con enzimas de restricción de tipo II. Los fragmentos de DNA, procedentes de las reacciones de ensamblaje, se introdujeron en plásmidos aceptores mediante digestiones con dos enzimas de restricción únicos, y cuyos sitios de corte fueron introducidos en el fragmento ensamblado en los oligonucleótidos externos. Cada enzima posee un tampón de

actividad óptima suministrado por el fabricante (Thermo Fisher Scientific). Pero, podemos consultar si la digestión se puede realizar de forma simultánea o no en la página web de la casa comercial, donde se nos facilitarán las condiciones óptimas en función de las enzimas utilizadas. Cuando se consideró oportuno eliminar el DNA plasmídico utilizado como molde, los fragmentos de DNA se trataron con el enzima de restricción DpnI. Esta endonucleasa necesita para cortar que sus sitios de reconocimiento estén metilados. Por tanto, no afecta a los productos de PCR. Después de las digestiones, y tras purificar los fragmentos digeridos mediante gel de agarosa y cuantificarlos, se realizaron las correspondientes reacciones de ligación que permitieron la inserción de un fragmento de DNA en un vector de clonación con extremos complementarios o la circularización del producto de PCR. Para la reacción de ligación se utilizó el tampón de ligación 1X, T4 DNA ligasa 0.1 U/ μ l (Promega) y una relación molar de inserto:vector 3:1 hasta un volumen final de reacción de 10 μ l. Para el control de religación y/o contaminación con el molde de PCR, se sustituyó el vector o el inserto, respectivamente, por agua. El tiempo y temperatura de incubación de la reacción de ligación dependió de los extremos del inserto y del vector. Si los fragmentos a ligar tenían extremos cohesivos o adeninas extras, la reacción se incubó entre 1 y 12 horas a temperatura ambiente. Pero si alguno de los extremos era romo, la reacción se incubó al menos 12 horas a 16-17 °C.

3.2.5. Transformación de células bacterianas

Una vez finalizada la incubación de la reacción de ligación, se procedió a la introducción del DNA plasmídico en células bacterianas de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* mediante electroporación. Para ello, introducimos 1 μ l de la reacción de ligación en una alícuota de células competentes previamente descongelada y mantenida en hielo. Esta mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación la cual está formada por dos electrodos con una separación entre ellos de 2 mm. La cubeta junto con las células en su interior se sometió a un pulso de 1700 V generado por un electroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System (BIORAD). Tras la electroporación, las células se resuspendieron en 500 ml de medio LB (Luria-Bertani) estéril (triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 % y NaCl 0.1 %) y se incubaron en una estufa a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se sembró en placas Petri con medio LB-Agar (15 g/l) junto con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas o a 28°C durante 48 horas.

3.2.6. PCR de colonia y extracción de DNA plasmídico

De las unidades formadoras de colonias (ufc) que crecen en placa se realizó una selección mediante PCR de colonia. Este método permite determinar la adquisición del clon de interés por parte de las bacterias que serán utilizadas como fuente de DNA. Para este procedimiento se utilizaron oligonucleótidos específicos de la región plasmídica a detectar, uno específico del inserto de DNA y el otro del plásmido. Como molde se utiliza la propia bacteria y la *Taq* DNA polimerasa GoTaq® (Promega). La mezcla de la reacción fue la siguiente (Tabla 2):

Tabla 2: Mix para reacción de PCR GoTaq

Tampón GoTaq 5X (Promega)	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0.2 mM
Primers directo y reverso	0.2 μM
Polimerasa GoTaq 5U/μL	0.025 U/μl
Agua estéril	Hasta 10 μl
Colonia bacteriana	--

La mezcla se repartió en tubos de 0.25 ml y con la ayuda de una punta de pipeta se picó la colonia y se mezcló con el resto de componentes en el tubo anterior. Las condiciones de amplificación de la reacción fueron: un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos para la desnaturalización, 30 segundos a 55 °C para la hibridación y 1 min/kb de elongación a 72 °C, seguidos de 5 minutos de incubación a 72 °C. El resultado de la PCR fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Para aquellas ufc que resultaron positivas se realizó una purificación del plásmido recombinante o minipreparación (miniprep) mediante el protocolo del kit *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific). Previamente, las colonias seleccionadas se crecieron a 37 °C en medio LB con el antibiótico correspondiente a su resistencia durante 24 horas. El total del cultivo (5 ml) se repartió en tubos de 2 ml y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, el sedimento resultante, formado por las células bacterianas, se resuspendió en 250 μl de la solución de resuspensión que contiene RNasa A (0.1 mg/ml). Con la ayuda de un agitador, el sedimento se resuspendió totalmente y se añadieron 250 μl de la solución de lisis celular. Se mezcló por inversión y se añadió 350 μl de la solución de neutralización. Centrifugamos durante 5 minutos a 13000 rpm y transferimos el sobrenadante a la columna de sílica sobre un tubo que se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm. Descartamos el sobrenadante y se añaden 500 μl de solución de lavado seguido de una centrifugación a 13000 durante 1 minuto, volvemos a repetir el lavado. Para asegurar que se ha eliminado todo el tampón de lavado, se vuelve a centrifugar la columna, tras ello se transfiere a un nuevo tubo. Finalmente se procede a la elución del plásmido añadiendo 20-50 μl de la solución de elución que se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se centrifuga a 13000 rpm durante 2 minutos.

Una vez se realizó la purificación de los plásmidos, se cuantificó el DNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando 1 μl de muestra para obtener la concentración en ng/μl. Para confirmar que la clonación y la formación de las quimeras se ha realizado correctamente, los plásmidos que contienen las construcciones estudiadas, fueron secuenciados por el servicio de secuenciación del IBMCP (CSIC-UPV) utilizando cebadores específicos de la región de interés.

3.2.7. Reacciones de transcripción *in vitro* y bioensayos en *A. thaliana*

Para estudiar la capacidad infecciosa de los clones descritos en el apartado 1.2.1 en *A. thaliana*, se realizaron diversos bioensayos con cada uno de ellos mediante la inoculación de transcritos de RNA. Para obtener los RNA virales se realizaron, en primer lugar, transcripciones

in vitro. Para linealizar las construcciones que se utilizaron como molde en las transcripciones se utilizaron las endonucleasas PstI o SmaI según la construcción considerada. El sitio de corte de estas enzimas se sitúa inmediatamente después del correspondiente 3' UTR y generan extremos 3' protuberantes o romos, respectivamente. En el caso de los extremos 3' protuberantes generados por PstI, estos se convirtieron en romos mediante tratamiento con la DNA polimerasa del fago T4 (5 U) (Promega) en presencia de dNTPs (100 μ M) durante 5 minutos a 37 °C. Seguidamente, los transcritos se sintetizaron mediante la RNA polimerasa del fago T7 (Takara) durante 2-3 horas a 37 °C. Los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 3. Finalmente, los transcritos se analizaron y cuantificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, TAE 1X.

Tabla 3: Componentes utilizados para la producción de transcritos *in vitro* mediante la RNA polimerasa del fago T7.

Plásmido linearizado	1 μ g
Tampón de transcripción (Roche) 10X	2 μ l
inhibidor RNAsas Ribolock (Thermo F. S.)	0.3 μ l
NTPs (Roche)	10 mM
T7 RNA polimerasa	1 μ l
Agua estéril	Hasta 20 μ l

Para los bioensayos se utilizaron plántulas de *A. thaliana* 15 días tras su siembra. Se inocularon mecánicamente las tres primeras hojas de cada planta con los RNAs obtenidos en las transcripciones. Concretamente, se espolvoreó carburo de silicio (carborundum), un abrasivo para facilitar el daño mecánico sobre las plántulas, y se depositaron alrededor de 3 μ l (1 μ g/ μ l) de transcrito disuelto en tampón de inoculación (fosfato potasio 0.03 M pH 8) en cada hoja. Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento o fitotrón con unas condiciones de temperatura, luminosidad y temperatura descritas en el apartado 1.1.1 de esta sección. Como control negativo las plantas se inocularon con tampón de inoculación y como control positivo con transcritos del TCV obtenidos *in vitro*. El RNA total de las hojas, tanto de las inoculadas como de partes distales, se analizó mediante hibridación Dot blot a 7 y 15 dpi. Cuando se consideró necesario estos RNAs también se analizaron mediante hibridación Northern blot.

3.2.8. Análisis de las plantas inoculadas mediante hibridación Dot blot

El análisis de las plantas inoculadas con los transcritos fue realizado, en primer lugar, mediante una extracción de ácidos nucleicos con el método desarrollado por Dellaporta *et al.* (1983): se trituraron alrededor de 400 mg de hojas (inoculadas o de partes distales) en una bolsa junto con el tampón de extracción compuesto por: Tris-HCl pH 8.0 100 mM; EDTA pH 7.0 50 mM; NaCl 500 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. El homogeneizado resultante (1 ml) se transfirió a un tubo de 1.5 ml al que se añadieron 50 μ l de SDS 20 % y, posteriormente, se incubó a 65 °C durante 20 minutos. Después se añadieron 250 μ l de acetato potásico (KAc) 5 M, se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, al sobrenadante (500 μ l) se le añadieron 2V de etanol para precipitar los ácidos nucleicos. Después de centrifugar en las mismas condiciones anteriores, los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 μ l de agua estéril.

En la hibridación Dot-blot se utilizó una membrana de nailon (Roche) cargada positivamente, lo que permite la unión a los ácidos nucleicos, y marcada manualmente con pequeños cuadrados (1 cm de lado). En cada uno de los cuadrados se aplicó 1.3 µl de muestra, se dejó secar y se entrecruzó con luz UV (700 x 100 µxcm⁻²), lo que permitirá la unión de los ácidos nucleicos a la membrana. Posteriormente, la membrana se introdujo en un tubo de hibridación y se bloqueó con 10 ml de solución de prehibridación (formamida 50 %, SSC 5X, N-Lauroyl sarcosine 0.1 %, SDS 0.02 % y agente bloqueante 2X, Roche) durante 1-2 horas a 68 °C en un horno de hibridación y con una rotación suave. Transcurrido ese tiempo se añadió la correspondiente sonda de RNA marcada con digoxigenina y complementaria a la región a detectar, previamente desnaturalizada (10 minutos a 65 °C). La hibridación se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. Las ribosondas se sintetizaron en reacciones de transcripción *in vitro* como se ha descrito anteriormente pero sustituyendo la mezcla de NTPs por una mezcla comercial de marcaje que contiene entre los NTPs, UTPs marcados con digoxigenina (“DIG RNA Labeling Mix solution” de Roche).

Después de la hibridación se llevaron a cabo dos lavados de 5 minutos con SSC 2X (NaCl 0.3 M, citrato sódico 0.03 M) más SDS al 0.1 % y otros dos lavados de 15 minutos a 68 °C con SSC 0.1X (NaCl 15 mM, citrato sódico 1.5 mM) más SDS al 0.1 %. El revelado de la membrana comenzó con un lavado con Tampón 1 (ácido maleico 0.1 M, NaCl pH 7.5 0.15 M) más Tween 20 al 0.3 % (SIGMA) durante 10 minutos, seguido de una etapa de bloqueo con Tampón 1 más agente bloqueante 1X (Roche) durante 30 minutos. Después, se realizó una incubación de 30 minutos con Tampón 1 más agente bloqueante 1X y los fragmentos Fab de un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina (AP); (Roche) diluidos 1:10000. Una vez finalizada la incubación, se realizaron dos nuevos lavados con Tampón 1 más Tween 20 al 0.3% durante 15 minutos y después otro lavado con Tampón 3 (Tris-HCl pH 9.5 1 M, NaCl 0.1 M) durante 5 minutos. Finalmente, la membrana se introdujo en una bolsa de plástico con una dilución 1:100 en Tampón 3 del sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche). La membrana se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos pasados los cuales se extrajo del plástico eliminando el exceso de CSPD y se visualizó la quimioluminiscencia mediante una exposición autoradiográfica o con el analizador de imágenes “Fujifilm LAS-3000 Imager” (Fuji) (Pallás *et al.*, 1998).

3.2.9. Análisis de las plantas inoculadas mediante hibridación Northern blot

Otro tipo de método utilizado para la extracción de RNA total se basó en el uso del reactivo de extracción Ribozol™ (VWR). Se pesó alrededor de 0.1 gramos de material vegetal triturado con nitrógeno líquido y se introdujo en tubos de 1.5 ml. A estos tubos se les añadió 1 ml de Ribozol™ y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitaron intensamente y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se observó cómo se empezaron a separar dos fases. Para facilitar esta separación, se centrifugó 15 minutos a 4 °C y a 13000 rpm. La fase acuosa resultante se pasó a un tubo nuevo de 1,5 ml al que se añadieron 500 µl de isopropanol. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para volver a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, volviendo a centrifugar a 13000 rpm y 4 °C durante 5 minutos. Se descartó de nuevo el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 90 µl de agua. Para eliminar completamente los restos del Ribozol™, los RNA se volvieron a precipitar añadiendo 10 µl de AcNa pH 5.5 3 M y 2.5 V de etanol. Posteriormente, se mantuvieron 1 hora a -20°C y se centrifugaron durante 15 minutos a 13000

rpm y 4 °C, dejando secar posteriormente a temperatura ambiente. Para finalizar, el sedimento se resuspendió en 50 µl de agua estéril. Para determinar la concentración y la pureza del RNA obtenido se midió espectrofotométricamente la absorbancia a 260 nm (A260, ácidos nucleicos), a 280 nm (A280, proteínas) y a 230 (A230, compuestos fenólicos como el Ribozol™) para obtener las relaciones A260/280 y A260/A230 mediante espectrofotometría con un NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Estas extracciones de RNA fueron posteriormente analizadas en gel de agarosa desnaturalizante. En la preparación del gel de agarosa se añadieron 0.75 g de agarosa a 40.5 ml de agua estéril y 5 ml de tampón MOPS 10X (MOPS 0.4 M pH 7.0, acetato de sodio 0.1 M y EDTA 0.01 M) en un matraz de 250 ml. Una vez disuelta la agarosa, se dejó enfriar hasta 60 °C para añadir 3.75 ml de formaldehído 37 %. Se mezcló por rotación, evitando la formación de burbujas, y fue vertido en la cubeta de electroforesis correspondiente en la que se había ajustado el peine. Una vez gelificado se sumergió en el tampón de electroforesis (MOPS 1X).

En la preparación de las muestras se usó un volumen del tampón de carga (670 µl formamida, 200 µl formaldehído 37 %, 130 µl MOPS 10X, xileno cianol 0.1 %, azul de bromofenol 0.1 % y bromuro de etidio, 10 µg/ml, por cada ml de tampón de carga). Se tomaron 500 ng de la muestra de RNA totales y se añadió el tampón de carga. La mezcla se desnaturalizó a 80 °C en una placa calefactora durante 15 minutos e inmediatamente se introdujo en hielo. Una vez cargadas en el gel, las muestras se separaron a 80 V, durante 90 minutos. Posteriormente, se procedió a visualizar el gel en un transiluminador de luz UV.

Tras analizar el gel, se procedió a la transferencia por capilaridad del RNA a una membrana de nailon cargada positivamente. Para ello, el gel se colocó en contacto con la membrana y sobre estos papeles Whatman 3MM y una pila de papeles absorbentes o de filtro según el esquema mostrado en la Figura 2.4. Todos estos componentes fueron previamente empapados con tampón de transferencia SSC 10X (0.75 M cloruro de sodio, 0.075 M citrato de sodio pH 7) y colocados en un soporte sobre dos piezas de papel Whatman 3MM dispuestas a modo de puente sobre una bandeja con 400 ml de tampón de transferencia.

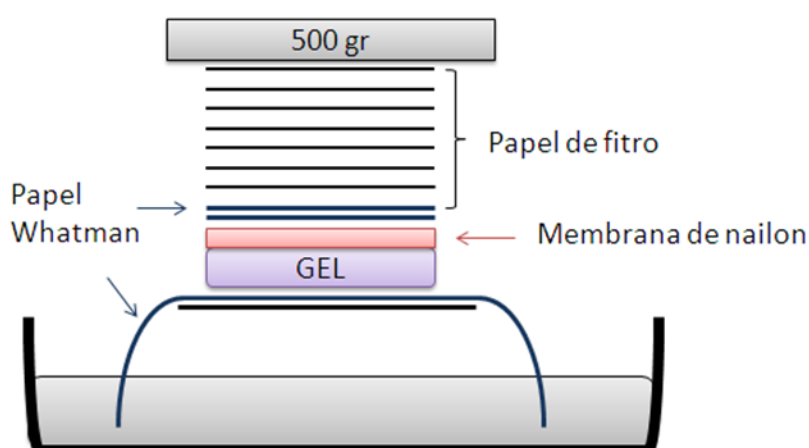


Figura 2.4: Representación esquemática de una transferencia capilar de RNA desde un gel de agarosa a una membrana de nailon.

Finalmente, en la parte superior se colocó un vidrio y una botella (500 g) para que se ejerciese presión. El montaje se dejó toda la noche. Una vez llevada a cabo la transferencia a la membrana los ácidos nucleicos fueron fijados a esta por medio de luz UV como se ha mencionado anteriormente. Estas membranas fueron posteriormente utilizadas para el proceso de hibridación molecular no radiactiva dividido en tres fases: hibridación, lavados y revelado que se llevó a cabo mediante el protocolo previamente descrito en esta sección.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Como ya se ha mencionado anteriormente en esta memoria, *A. thaliana* no puede ser infectada ni por CarMV ni por MNSV pero sí por TCV, a pesar de que estos tres virus presentan una organización genómica semejante. Con la finalidad mencionada en la Introducción, el objetivo principal del presente proyecto ha sido la obtención de virus recombinantes entre CarMV o MNSV y TCV que sean capaces de evadir la resistencia a la infección de los dos primeros por parte de esta planta modelo. La posible viabilidad de estos virus quiméricos se fundamenta en el hecho de que los sucesos de recombinación en la familia *Tombusviridae* han sido muy frecuentes en la naturaleza, probablemente debido a la capacidad de las RdRp virales de funcionar sobre moldes de RNA heterólogos (Cheng y Nagy, 2003). Cabe destacar que los tombusvirus y carmovirus son altamente recombinantes comparados con los miembros de otros géneros dentro de esta familia (Boulilla, 2011). De hecho, 14 especies de carmovirus tienen su origen en sucesos de recombinación. Teniendo en cuenta esto, en este trabajo se construyeron tres clones recombinantes distintos de MNSV y CarMV, seis en total, que pueden agruparse en tres clases: clones que intercambian la CP por la CP de TCV, clones que intercambian la CP y el extremo 3' UTR; y clones que intercambian la CP y ambos extremos UTR (5' y 3') de TCV.

4.1. Clones que intercambian la proteína de cubierta: pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV})

En primer lugar, era razonable suponer que la restricción en la infección podría deberse a las barreras de defensa antiviral de la planta y a los diferentes mecanismos que podrían tener estos virus para contrarrestarlas. En esta dirección, destaca la CP del TCV, codificada en el último ORF del genoma y que desempeña un papel fundamental en contradefensa al actuar como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional o al regular la expresión de genes de defensa gracias a su interacción con el factor de transcripción TIP. De este modo, los primeros clones de MNSV y CarMV que nos plantemos construir fueron aquellos que incorporaban la CP de TCV y que mantenían el resto de sus proteínas y extremos 3' y 5' UTR. Estas construcciones se denominaron: pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}) (Fig. 4.1).

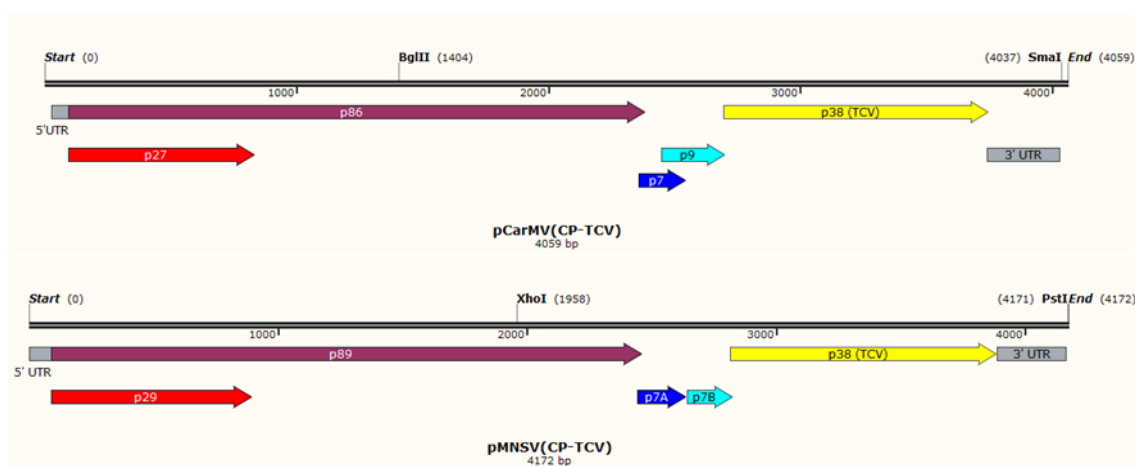


Figura 4.1: Esquema de los clones pCarMV(CP_{TCV}) (arriba) y pMNSV(CP_{TCV}) (abajo). Las distintas flechas representan los genes virales y las cajas los extremos no codificantes, tal y como están indicados. La posición en el genoma de los sitios de restricción únicos utilizados durante el proceso de clonación se indican en la correspondiente parte superior de cada clon.

4.1.1. Construcción de los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV})

La estrategia inicial consistió en la amplificación del gen de la CP de TCV a partir del vector pTCV-M y la eliminación, mediante PCR inversa con oligonucleótidos divergentes, del gen de la CP de MNSV o de CarMV a partir de los clones pMNSV-AI o pCarMV-Dix, respectivamente. Estos

tres clones contienen los genomas completos de los tres virus (ver Materiales y Métodos). Finalmente se llevaría a cabo la ligación entre ambas amplificaciones por sus extremos romos y fosforilados. Aunque la estrategia parecía sencilla no obtuvimos los resultados esperados y, por eso, nos planteamos cambiar la forma de conseguir las construcciones.

Para ello, se diseñó una segunda estrategia basada en el uso de fragmentos de DNA solapantes obtenidos por PCR. Se utilizaron 6 pares de oligonucleótidos con secuencias solapantes, 3 para cada clon (Anexo: Tabla A.1). A partir de estos se amplificaron seis fragmentos distintos. Dos de aproximadamente 1 kb (Fragmento 1, Fig. 4.2), que incluían la parte final del gen de la replicasa de CarMV o de MNSV desde los sitios de restricción únicos indicados en la figura 4.1 y los genes de las dos MP correspondientes. Dos fragmentos más de aproximadamente 0.3 kb (Fragmento 3, Fig. 4.2), que comprenden el extremo 3' UTR de CarMV o MNSV; estos fragmentos se obtuvieron utilizando como molde pCarMV-Dix o pMNSV-AI, respectivamente. Sin embargo, el extremo 3' UTR de CarMV no pudo ser amplificado correctamente, probablemente debido a que presenta un alto porcentaje de estructuras secundarias. De modo que este fragmento se solicitó sintetizado a IDT (Integrated DNA Technologies). Por último, se obtuvo un fragmento, también de aproximadamente un 1 kb, correspondiente al gen de la CP de TCV (Fragmento 2, Fig. 4.2), amplificado a partir de pTCV-M con dos pares de oligonucleótidos diferentes según se fuese a ensamblar con los fragmentos de 1 y 3 de MNSV o de CarMV. Cada fragmento amplificado fue purificado y una parte se clonó en el plásmido pJET, lo que facilitó la obtención de una mayor concentración para su posterior utilización como molde de PCR, si fuera necesaria la reamplificación para obtener más cantidad, o para secuenciar y asegurar que la amplificación por PCR se realizó correctamente.

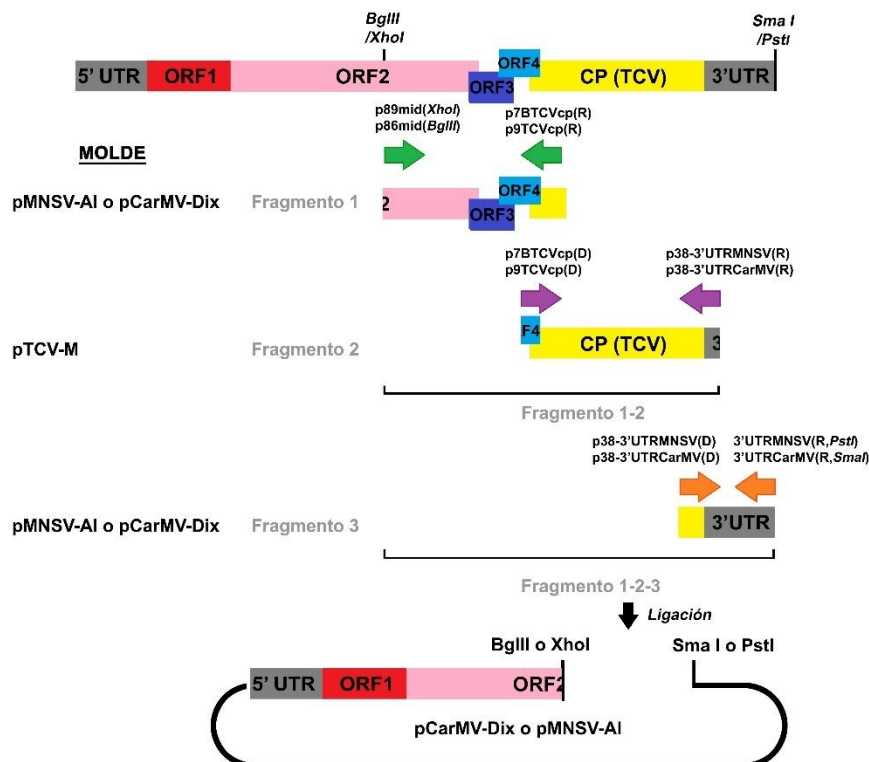


Figura 4.2: Esquema de la estrategia de ensamblaje mediante fragmentos de PCR solapantes seguida para el intercambio de las CP de MNSV o CarMV con la CP de TCV en la obtención de los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}). Las distintas flechas indican la posición de los oligonucleótidos (directo y reverso) utilizados para amplificar los fragmentos por medio de PCR. Los nombres de los oligonucleótidos utilizados se indica encima de las flechas. Las ORF pueden hacer referencia tanto a los genes de MNSV como de CarMV.

El ensamblaje de los tres fragmentos se realizó en dos etapas. En la primera se procedió a la unión de los fragmentos 1 y 2 utilizando el oligonucleótido directo de la primera parte y el reverso de la segunda, como molde se incluyeron los dos productos solapantes 1 y 2. De esta PCR se obtuvo un producto de 2 kb (Fragmento 1-2, Fig. 4.2) que también fue clonado, en parte, a pJET para ser enviado a secuenciar y comprobar la unión correcta de los fragmentos. Finalmente, se procedió al ensamblaje de la última parte, el producto de 0.3 kb o Fragmento 3 fue unido al Fragmento 1-2 mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de los extremos: el directo de la primera parte y el reverso de la tercera. Mencionar que en este par de oligonucleótidos se introdujeron los sitios de restricción únicos que flanquean esta región en pCarMV-Dix (BglII y SmaI) o en pMNSV-AI (XhoI y PstI) (Fig. 4.1, Tabla A.1 del anexo). En esta ocasión los Fragmentos 1-2 y 3 se utilizaron como molde para la reacción. Seguidamente, el Fragmento 1-2-3 resultante (Fig. 4.2) se ligó a pJET. La transformación de células DH5 α , selección de las ufc positivas mediante PCR de colonia, la purificación del DNA plasmídico y finalmente, la secuenciación con distintos oligonucleótidos permitió corroborar que el ensamblaje de la construcción era correcto. Tras obtener los resultados de secuenciación se procedió a digerir los fragmentos 1-2-3 de MNSV y de CarMV y los correspondientes plásmidos aceptores pMNSV-AI y pCarMV-Dix con las endonucleasas correspondientes: por un lado BglII, que se encuentra en medio de p86 (ORF2) de CarMV y SmaI que corta al final del extremo 3' UTR; por otro lado, XhoI situado hacia el final de p89 (ORF2) de MNSV y PstI que corta al final del correspondiente extremo 3' UTR (Fig. 4.2). Tras analizar las digestiones de ambos clones y Fragmentos 1-2-3 en gel, se ligaron y se transformaron células DH5 α con las ligaciones y los correspondientes controles. Finalmente, mediante PCR de colonia, utilizando oligonucleótidos que abarcan la zona de unión, se seleccionaron las ufc positivas, se purificaron los correspondientes plásmidos (Fig. 4.3) y se comprobaron mediante secuenciación.

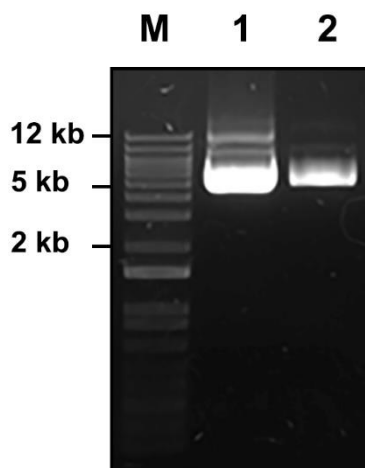


Figura 4.3: Análisis electroforético de los clones pCarMV(CP_{TCV}) (carril 1) y pMNSV(CP_{TCV}) (carril 2) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus".

4.1.2. Bioensayos de infectividad de los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP_{TCV}) y MNSV(CP_{TCV}), mediante transcripción *in vitro*

Una vez obtenidos los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}), se llevaron a cabo las correspondientes reacciones de transcripción *in vitro* para producir los transcritos virales correspondientes y realizar los bioensayos en *A. thaliana*. Para ello, dos semanas antes del día de la inoculación se sembraron semillas de *A. thaliana* y se mantuvieron en las condiciones

adecuadas de luz, temperatura y humedad. El día de la inoculación, en primer lugar, se procedió a la digestión del clon pCarMV(CP_{TCV}) con *Sma*I y pMNSV(CP_{TCV}) con *Pst*I, ambos sitios de restricción se encuentran en el final del extremo 3' UTR lo que permite linealizar los clones para generar transcritos virales de longitud completa. Además, el clon pMNSV(CP_{TCV}) fue tratado con la enzima T4 DNA polimerasa que utiliza su actividad exonucleasa para dejar los extremos romos, necesarios para una transcripción correcta de la región de interés. Finalmente se sintetizaron los transcritos de ambos clones mediante el uso de la RNA polimerasa del fago T7. El resultado fue analizado y cuantificado por gel mediante diluciones (Fig. 4.4).

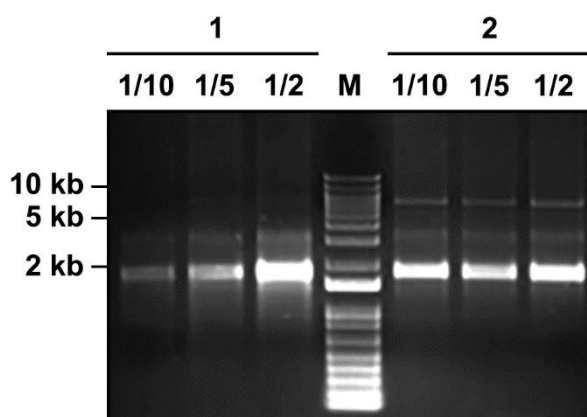


Figura 4.4: Análisis electroforético de las transcripciones de los clones pCarMV(CP_{TCV}) (carriles 1, diluciones 1/10, 1/5 y 1/2) y pMNSV(CP_{TCV}) (carriles 2, diluciones 1/10, 1/5 y 1/2) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus". Observar que los transcritos de RNA de aproximadamente 4 kb presentan una movilidad electroforética semejante al DNA bicatenario de 2 kb.

Se utilizaron 3 µg/hoja (3 hojas/planta) para inocular mecánicamente plántulas de *A. thaliana* de 15 días post-germinación con la ayuda de una varilla de vidrio y el abrasivo "carborundum" tal y como se indica en Materiales y Métodos.

4.1.3. Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP_{TCV}) y MNSV(CP_{TCV}) en *A. thaliana*

Se realizaron tres bioensayos de infectividad para cada construcción. Se inocularon alrededor de 10 plantas por construcción en cada uno. El análisis de las muestras se realizó mediante extracción de ácidos nucleicos totales e hibridación Dot blot. En la mayoría de los bioensayos se tomaron dos puntos temporales tanto a los 7 como a los 14 días tras la inoculación (7 y 14 dpi). En todos los bioensayos se evaluó la capacidad infectiva de cada RNA recombinante frente a dos controles, un control positivo en el que se inocularon transcritos del TCV obtenidos *in vitro* a partir del clon pTCV-M, linealizado con *Sma*I, y un control negativo en el que las plantas se inocularon con tampón fosfato. Este último nos permite evaluar si la inoculación mecánica afecta a la planta y, también, si se produce alguna contaminación no deseada durante el bioensayo. Sin embargo, no se observaron diferencias fenotípicas, ni a 7 ni a 14 dpi (Fig. 4.5) entre las plantas inoculadas con los RNA recombinantes, MNSV(CP_{TCV}) y CarMV(CP_{TCV}) (Fig. 4.5, 1 y 3, respectivamente) y los controles negativos (Fig. 4.5, 4). Sin embargo, todas las plantas inoculadas con los transcritos de TCV mostraron la sintomatología típica de este virus en *A. thaliana*, una reducción considerable de tamaño total y graves malformaciones foliares (Fig. 4.5, 2).

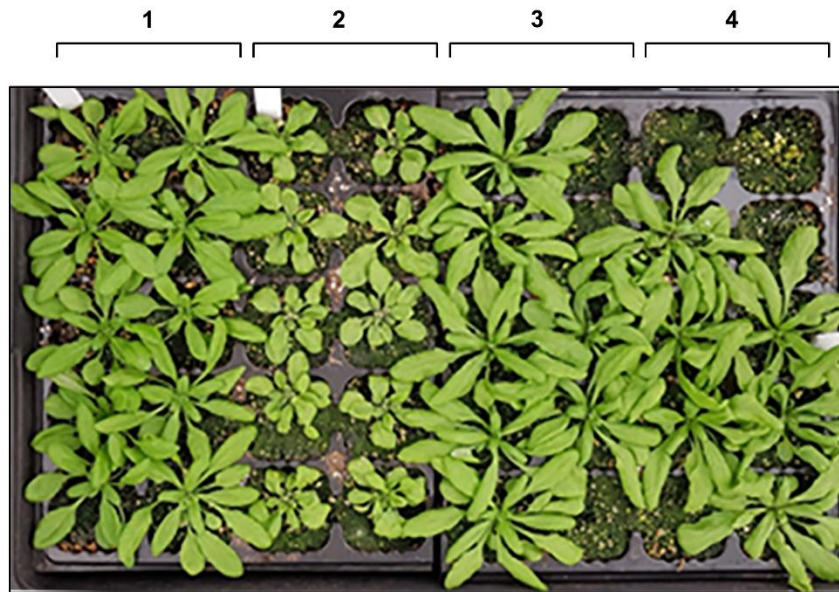


Figura 4.5: Bioensayo de infectividad en *A. thaliana* de los clones pMNSV(CP_{TCV}) y pCarMV(CP_{TCV}). La figura muestra las plantas a los 14 dpi siendo 1) las plantas infectadas con MNSV(CP_{TCV}), 2) plantas infectadas con TCV y 3) plantas inoculadas con CarMV(CP_{TCV}) y 4) plantas control negativo.

Para llevar a cabo el análisis por hibridación Dot blot, se realizó, en primer lugar, la extracción de ácidos nucleicos totales (AN) mediante el método desarrollado por Dellaporta et al. (1985) (ver Materiales y Métodos). Los AN de aproximadamente 2 mg de hoja se disolvieron en 50 μ l de agua de los cuales 1.3 μ l fueron aplicados en una membrana de nailon. En la hibridación se utilizó una ribosonda correspondiente al gen de la CP de TCV de polaridad antiviral. Esta sonda nos dará señal de hibridación en los controles positivos (TCV) y en aquellas plantas en las que el RNA recombinante haya conseguido infectar. Para valorar la infección sistémica, cada extracción de AN se obtuvo a partir de una planta completa a la que se eliminaron las hojas inoculadas. Sin embargo, para analizar la infección local, se juntaron las hojas inoculadas procedentes de varias plantas en una única extracción de AN.

En la Figura 4.6 se muestra el resultado de las hibridaciones Dot blot de uno de los bioensayos. Como era de esperar, según la sintomatología observada, los controles positivos (TCV), tanto de hojas inoculadas como de planta completa, presentaron una señal positiva tanto a 7 (Fig. 4.6; B3 y B4 para planta completa; C4 para hoja inoculada) como a 14 dpi (Fig. 4.6; B4 y B5 para planta completa, la hoja inoculada no se muestra). En cambio, el resto de muestras no dieron ninguna señal de hibridación (Fig. 4.6), salvo en una muestra en la que se observó una señal positiva, en concreto, una muestra de hoja inoculada con MNSV(CP_{TCV}) a los 14 días (Fig. 3.6, Dot blot 14 dpi, B7). Para determinar la validez de esta señal se realizó una hibridación Northern-Blot observándose la aparición de RNA virales genómicos y subgenómicos, lo que indicaba que el virus se estaba replicando (Fig. 4.7). Sin embargo, podría tratarse de una contaminación con TCV. Para analizar tal posibilidad se realizó otra hibridación Dot blot de la muestra utilizando, esta vez, una ribosonda correspondiente al gen de la replicasa auxiliar de MNSV de polaridad antiviral. Desafortunadamente, los resultados de este análisis solamente mostraron señal de hibridación en el control positivo de MNSV (Fig. 4.7, B4), estableciendo que las señales obtenidas con la sonda de TCV eran debidas a contaminaciones con este mismo virus.

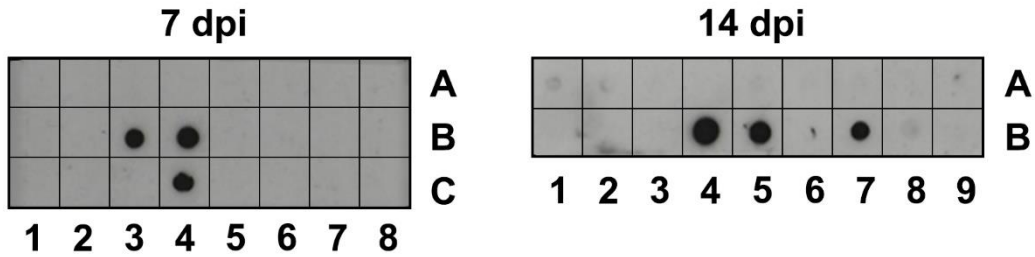


Figura 4.6: Análisis mediante hibridación Dot-blot de las muestras de ácidos nucleicos extraídas de los bioensayos con MNSV(CP_{TCV}) y CarMV(CP_{TCV}) a 7 y 14 dpi. Dot-blot 7dpi: A1-A5) AN de plantas completas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}); A6-A8 y B1-B2) AN de plantas completas inoculadas con CarMV(CP_{TCV}); B3-B4) AN de plantas completas inoculadas con TCV; B5-B6) AN de plantas completas inoculadas con tampón fosfato; B7-B8) AN de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}); C1-C2) AN de hojas inoculadas con CarMV(CP_{TCV}); C3) AN de hojas inoculadas con tampón fosfato; C4) AN de hojas inoculadas con TCV. Dot-blot 14 dpi: A1-A5) AN de plantas completas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}); A6-A9 y B1) AN de plantas completas inoculadas con CarMV(CP_{TCV}); B2-B3) AN de plantas completas inoculadas con tampón fosfato; B4-B5) AN de plantas completas inoculadas con TCV; B6-B7) AN de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}); B8) AN de hojas inoculadas con CarMV(CP_{TCV}), B9) AN de hojas inoculadas con tampón fosfato. En ambos casos se utilizó una ribosonda de secuencia complementaria al gen de la CP de TCV.

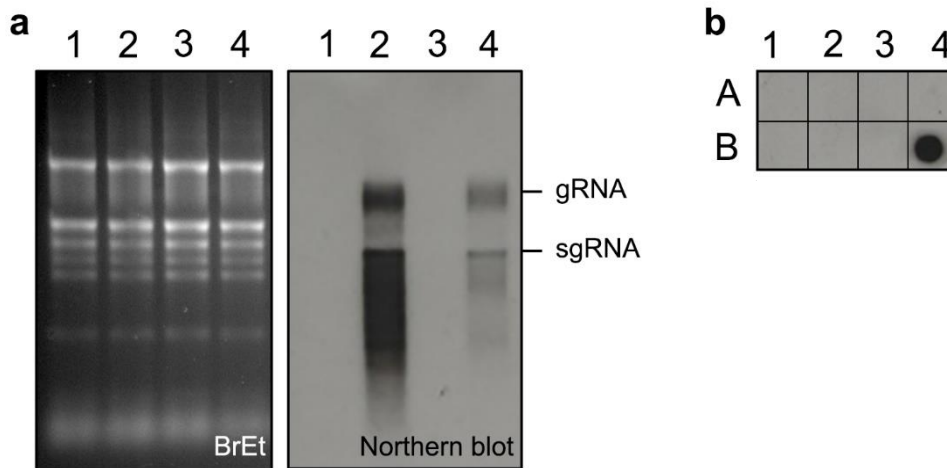


Figura 4.7: a) Análisis mediante hibridación Northern blot de las muestras de RNA de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}) a 14 dpi. A la izquierda se muestra la tinción con bromuro de etidio de los RNA extraídos con el reactivo Ribozol™ y a la derecha el resultado de la hibridación con la ribosonda de secuencia complementaria a la CP de TCV. 1. RNA de plantas completas inoculadas con tampón fosfato, 2. RNA de plantas completas inoculadas con TCV, 3 y 4. RNA de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}) equivalentes a los AN aplicados en B6 y B7, respectivamente, en el Dot blot de 14 dpi de la figura 3.6. b) Análisis mediante hibridación Dot blot de las muestras de AN de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}) con una ribosonda de secuencia complementaria a la replicasa auxiliar de MNSV. A1, AN de plantas completas inoculadas con tampón fosfato. A2, AN de plantas completas inoculadas con TCV. A3 y A4, AN de hojas inoculadas con MNSV(CP_{TCV}) equivalentes a los AN aplicados en B6 y B7, respectivamente, en el Dot blot de 14 dpi de la figura 3.6. B4, RNA de plantas de melón infectadas con MNSV-AI.

4.2. Clones que intercambian la proteína de cubierta y el extremo 3'UTR: pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV})

Tal y como se ha observado en los resultados obtenidos anteriormente, la inoculación de los RNA virales CarMV(CP_{TCV}) o MNSV(CP_{TCV}) no produjeron síntomas de infección visibles en *A. thaliana*, ni presentaron una capacidad replicativa detectable, lo que nos lleva a pensar que la capacidad infectiva de TCV en *A. thaliana* podría no residir únicamente en su CP. Puesto que los virus carecen de un sistema de traducción de proteínas propio, otra etapa esencial en el establecimiento de una infección viene determinada por la capacidad del gRNA de ser

reconocido como un RNA mensajero en la célula huésped. Esta particularidad es esencial para la síntesis temprana de la RdRp y, por tanto, necesaria para iniciar la replicación del RNA viral y la traducción del resto de proteínas virales. Tanto los gRNA como los sgRNA de los carmovirus no poseen ni estructura “CAP” ni una cola poli(A) por lo que estos virus dependen de mecanismos no canónicos para iniciar la traducción. En este proceso, los 3’ CITES situados en los extremos 3’ UTR desempeñan un papel esencial al actuar como sitios de unión de factores de iniciación de la traducción que inducen la unión de ribosomas o subunidades ribosomales al extremo 5’. Además, en el extremo 3’-UTR también se sitúan los promotores de la RdRp (Simon y Miller, 2013; Simon, 2015; Miras *et al.*, 2017; Truniger *et al.*, 2017).

Así, utilizando como base los clones anteriores, pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}), en las siguientes construcciones que nos planteamos se incorporó el extremo 3’ UTR del TCV para determinar si la capacidad infectiva de este último en *A. thaliana* reside en los procesos regulados por esta región: traducción y replicación viral. Las construcciones obtenidas se denominaron: pCarMV(CP-3’UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3’UTR_{TCV}) (Fig. 4.8)

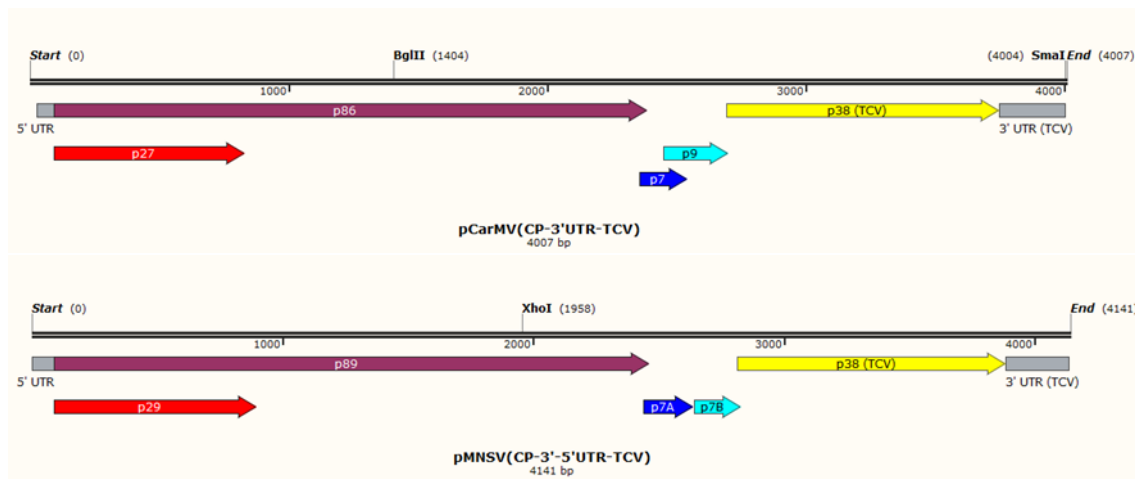


Figura 4.8: Esquema de los clones pCarMV(CP-3’UTR_{TCV}) (arriba) y pMNSV(CP-3’UTR_{TCV}) (abajo). Las distintas flechas representan los genes virales y las cajas los extremos no codificantes, tal y como están indicados. La posición en el genoma de los sitios de restricción únicos utilizados durante el proceso de clonación se indican en la correspondiente parte superior de cada clon.

4.2.1. Construcción de los clones pCarMV(CP-3’UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3’UTR_{TCV})

La incorporación sobre los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}) del extremo 3’ UTR de TCV se realizó utilizando la misma estrategia anterior de fragmentos solapantes. Para ello se realizó la amplificación de dos fragmentos (Fig. 4.9): un primer fragmento de 1 kb, idéntico al obtenido para los clones anteriores, incluye parte de la ORF 2, la 3 y 4 y se amplificó utilizando como molde pMNSV-AI o pCarMV-Dix (Fragmento 1, Fig. 4.9); un segundo de tamaño similar que contiene la ORF 5 o CP y el extremo 3’ UTR de TCV, se amplificó utilizando como molde pTCV-M (Fig. 4.9, Fragmento 2’). Para ello utilizamos 8 oligonucleótidos, 4 para cada clon con secuencias solapantes (Anexo: Tabla A.1). El ensamblaje del Fragmento 1 de MNSV con el 2’ para generar el Fragmento 1-2’ se realizó como en los clones anteriores, incorporando los sitios de restricción indicados (Fig. 4.9). Este Fragmento 1-2’ se clono en pJET para su secuenciación y reamplificación. En cambio, para CarMV, aunque se realizó la misma estrategia que para MNSV, tras varios intentos fallidos se optó por cambiarla. Para ello, se utilizaron 4 oligonucleótidos (Anexo: Tabla A.1) que amplifican los mismos fragmentos 1 y 2’ pero que incorporaban el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción de tipo IIS BsmBI. Se utilizó pUPD2 como plásmido aceptor en una técnica semejante a la usada en el denominado proceso de

domesticación del sistema de clonaje GoldenBraid (Fig. 4.10). El resultado de la reacción de ensamblaje del Fragmento 1-2' en pUPD2 fue transformado en células DH5α y se seleccionaron las ufc positivas que presentaban resistencia a cloranfenicol, color blanco y amplificaban el fragmento deseado por PCR de colonia.

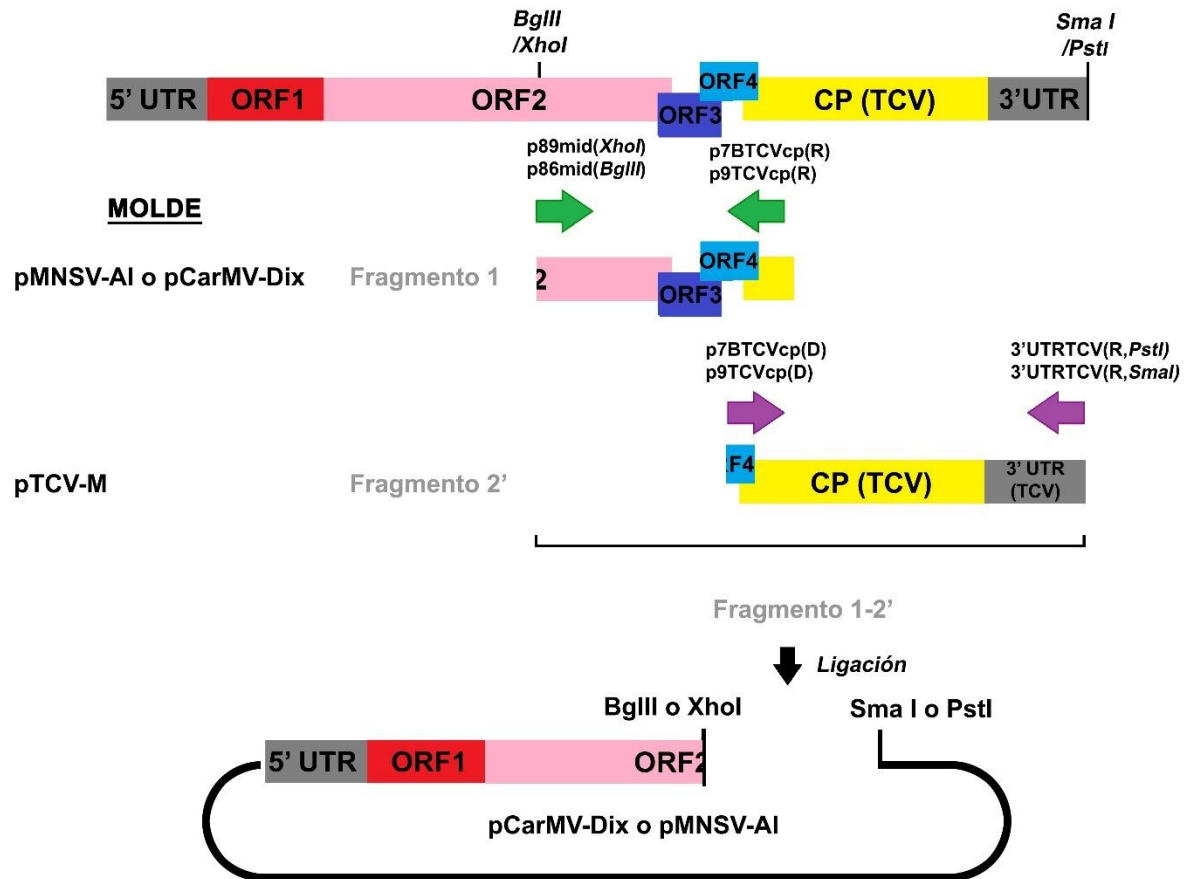


Figura 4.9: Esquema de la estrategia de ensamblaje mediante fragmentos de PCR solapantes seguida para la obtención de los clones pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}). Las distintas flechas indican la posición de los oligonucleótidos (directo y reverso) utilizados para amplificar los fragmentos por medio de PCR. Los nombres de los oligonucleótidos utilizados se indica encima de las flechas. Las ORF pueden hacer referencia tanto a los genes de MNSV como de CarMV.

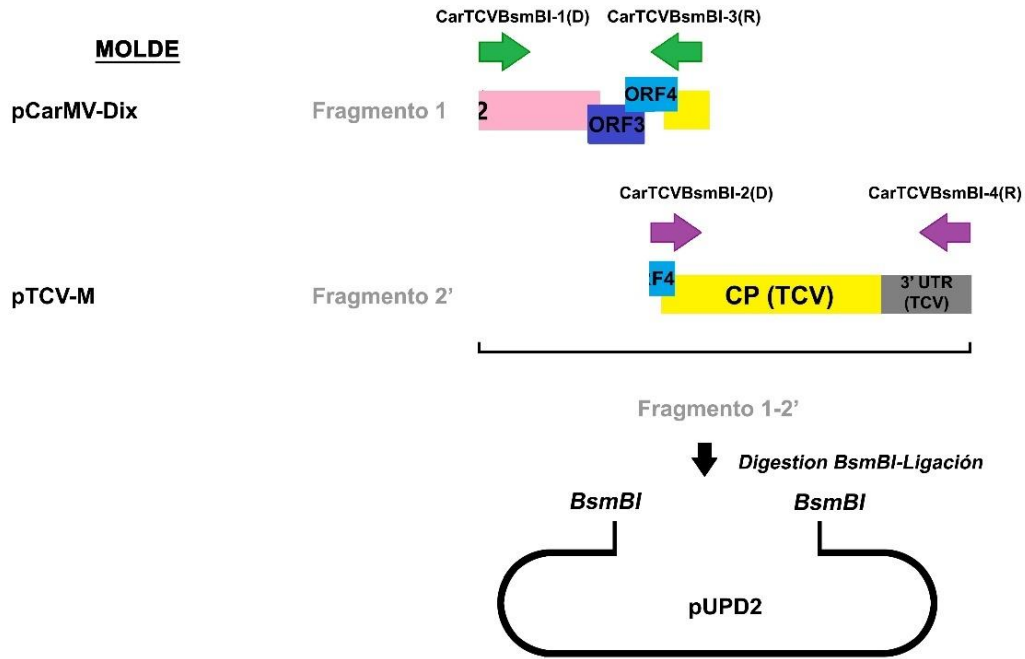


Figura 4.10: Esquema de la estrategia de ensamblaje mediante el uso de la endonucleasa *BsmBI* seguida para la obtención del clon *pCarMV*(CP-3'UTR_{TCV}). Las distintas flechas indican la posición de los oligonucleótidos (directo y reverso) utilizados para amplificar los fragmentos por medio de PCR. Los nombres de los oligonucleótidos utilizados se indica encima de las flechas. Las ORF pueden hacer referencia a los genes de *CarMV*.

Una vez ambos Fragmentos 1-2' fueron comprobados por secuenciación, se procedió a la unión al plásmido correspondiente, pMNSV-AI o pCarMV-Dix utilizando los correspondientes enzimas de restricción, tal y como se ha descrito anteriormente. Transcurrido el tiempo de ligación, se transformaron células DH5α con ambas reacciones y las ufc se analizaron mediante PCR de colonia con oligonucleótidos que abarcaban la región de unión. Finalmente se procedió a la purificación de los plásmidos, su análisis en gel de agarosa (Fig. 4.11) y su secuenciación.

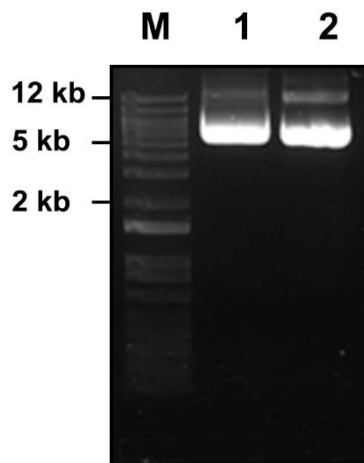


Figura 4.11: Análisis electroforético de los clones *pCarMV*(CP-3'UTR_{TCV}) (carril 1) y *pMNSV*(CP-3'UTR_{TCV}) (carril 2) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus"

4.2.2. Bioensayos de infectividad de los clones pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) y MNSV(CP-3'UTR_{TCV}), mediante transcripción *in vitro*.

La linealización de las construcciones mediante digestión con endonucleasas, las transcripciones, el análisis y cuantificación de los transcritos virales de MNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) (Fig. 4.12) se realizaron conforme a lo descrito anteriormente.

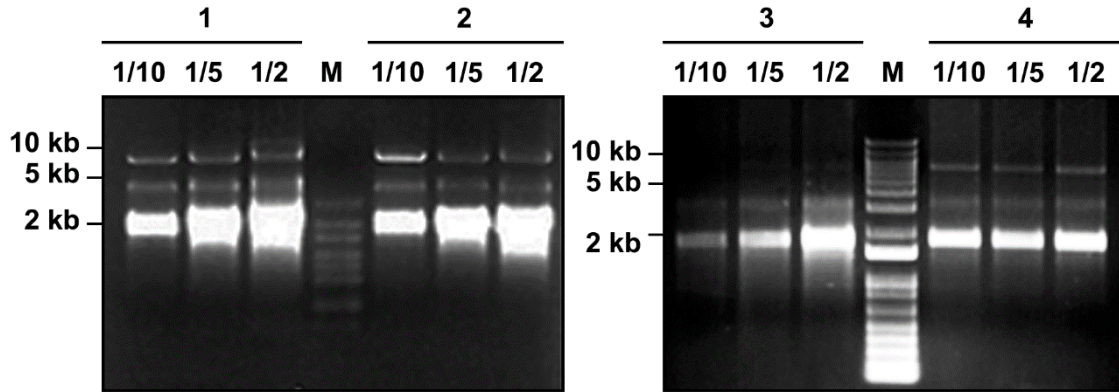


Figura 4.12: Análisis electroforético de las transcripciones de los clones pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) (carriles 1, diluciones 1/10, 1/5 y 1/2) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}) (carriles 3, diluciones 1/10, 1/5 y 1/2) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus"; carriles 2 y 4: transcritos de RNA del clon pTCV-M. Observar que los transcritos de RNA de aproximadamente 4 kb presentan una movilidad electroforética semejante al DNA bicatenario de 2 kb.

4.2.3. Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) y MNSV(CP-3'UTR_{TCV}) en *A. thaliana*

Se realizaron tres bioensayos para cada construcción, tal y como se ha descrito con anterioridad. Esta vez tampoco se observaron, en general, diferencias fenotípicas, ni a 7 ni a 14 dpi (Fig. 4.13) entre las plantas inoculadas con los RNA recombinantes, CarMV(CP3'-UTR_{TCV}) y MNSV(CP3'-UTR_{TCV}) (Fig. 4.13, 2 y 3), y los controles negativos (Fig. 4.13, 4). Sin embargo, prácticamente todas las plantas inoculadas con los transcritos de TCV mostraron de nuevo la sintomatología típica (Fig. 4.13, 1).

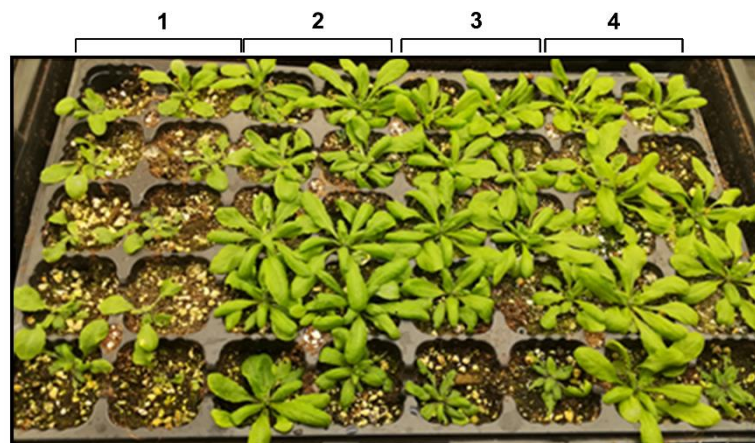


Figura 4.13: Bioensayo de infección en *A. thaliana* de los clones pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}). La figura muestra las plantas a los 14 dpi siendo 1) plantas inoculadas con TCV, 2) plantas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}), 3) plantas inoculadas con MNSV(CP-3'UTR) y 4) plantas inoculadas con tampón fosfato.

En primer lugar, para el ensayo del clon pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) tanto para el análisis Dot blot a los 7 como a los 14 dpi se observó una señal de hibridación intensa en el control positivo (Fig. 4.14, B6 7dpi y B6-B7, 14 dpi). Esta vez, algunas de las muestras de planta completa inoculadas con MNSV(CP-3'UTR_{TCV}) mostraron una señal de hibridación débil (Fig. 4.14, A1, A3 y A6 a 7 dpi, A1 y B1, a 14 dpi). Sin embargo, estas muestras fueron analizadas en otro Dot blot utilizando la ribosonda de la replicasa auxiliar de MNSV no detectándose señal de hibridación (estos datos no se muestran), por lo que probablemente estas señales débiles fueran debidas a hibridaciones inespecíficas.

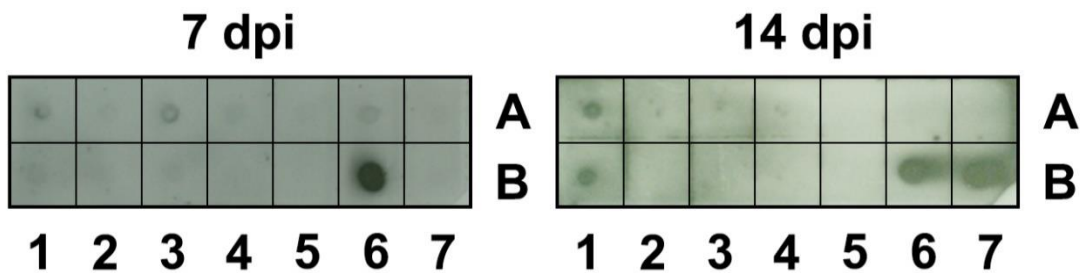


Figura 4.14: Análisis mediante hibridación Dot-blot de las muestras de ácidos nucleicos extraídas de los bioensayos con MNSV(CP3'UTR_{TCV}) a 7 y 14 dpi. A1-A7 y B1-B3) AN de plantas completas inoculadas con MNSV(CP3'UTR_{TCV}); B4-B5) AN de plantas completas inoculadas con tampón fosfato; B6-B7 AN de plantas completas inoculadas con TCV. En ambos casos se utilizó una ribosonda de secuencia complementaria al gen de la CP de TCV.

En el análisis del clon pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}), los Dot blot a 7 dpi (Fig. 4.15, izquierda) mostraron una señal de hibridación intensa en la muestra de AN de planta completa inoculada con TCV (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, C6). También, se observó una señal más débil en la muestra de AN de hojas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, C7), una muestra de AN de planta completa inoculada con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, B6) y una muestra inoculada con tampón fosfato, una posible contaminación (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, B7). Todas estas muestras fueron analizadas de nuevo mediante Dot blot utilizando, esta vez, una ribosonda de secuencia complementaria a la replicasa auxiliar de CarMV (Fig. 4.16). La muestra de AN de hojas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) que dio señal de hibridación con la sonda de TCV (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, C7) también la dio con la sonda de CarMV (Fig. 4.16, A2), al igual que la muestra de AN de planta completa inoculada con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) (Fig. 4.15, Dot blot 7 dpi, B6). Aunque en este último caso la señal fue mucho más débil (Fig. 4.16, C3). Desafortunadamente, no quedó suficiente cantidad de tejido de esta muestra para obtener RNA de calidad suficiente (extracción con el reactivo Ribozol™) y poder realizar un análisis Northern blot.

En el análisis por hibridación Dot blot de las muestras de AN a 14 dpi (Fig. 4.15, derecha), tal y como se esperaba, se observó una señal de hibridación intensa en los controles de plantas completas inoculadas con TCV, además, también se detectó la presencia de una señal de hibridación clara en una muestra de AN de planta completa inoculada con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}).

Sin embargo, la hibridación de esta muestra con la ribosonda de CarMV, descrita anteriormente, fue negativa (Figura 4.16, D1).

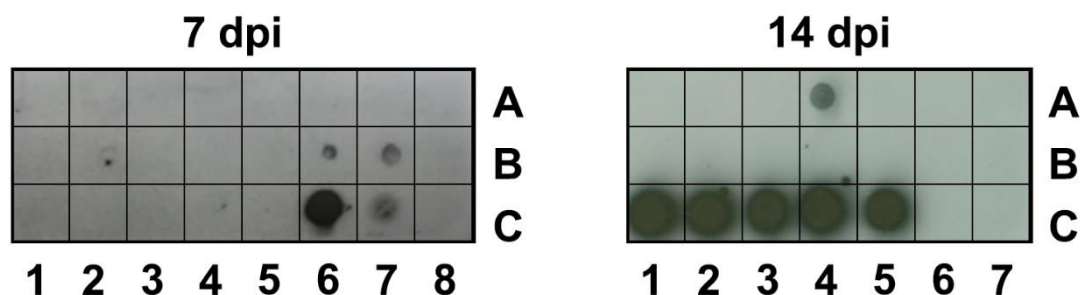


Figura 4.15: Análisis mediante hibridación Dot-blot de las muestras de ácidos nucleicos extraídas de los bioensayos con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) a 7 y 14 dpi. Dot blot a 7 dpi: A1-A8 y B1-B6) AN de plantas completas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}); B7-B8) AN de plantas completas inoculadas con tampón fosfato; C6 AN de planta completa inoculada con TCV, B7) AN de hojas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}). Dot blot a 14 dpi: A1-A7 y B1-B7) AN de plantas completas inoculadas con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}); C1-C5) AN de plantas completas inoculadas con TCV; C6-C7) AN de planta completa inoculada con tampón fosfato. En ambos casos se utilizó una ribosonda de secuencia complementaria al gen de la CP de TCV.

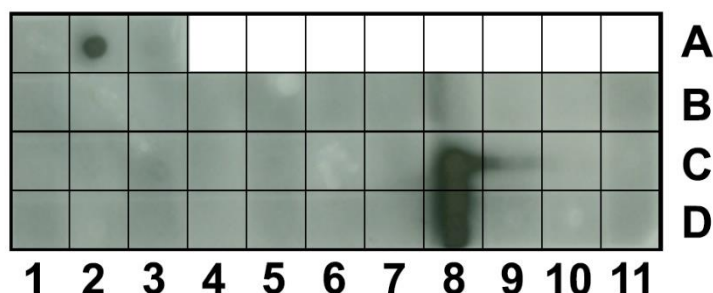


Figura 4.16: Análisis mediante hibridación Dot-blot de las muestras de ácidos nucleicos extraídas de los bioensayos con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) a 7 y 14 dpi utilizando una ribosonda de secuencia complementaria al gen de la replicasa auxiliar de CarMV. Muestras a 7 dpi: A1) AN de hojas inoculadas con TCV; A2) AN de hojas inoculadas con CarMV(CP3'UTR_{TCV}); A3) AN de planta completa inoculada con tampón fosfato; B1-B11 y C1-C3) AN de planta completa inoculada con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}); C4-C5) AN de planta completa inoculada con TCV. Muestras a 14 dpi: C6-C7) AN de planta inoculada con tampón fosfato; C9-C11 y D1-D11) AN de planta completa inoculada con CarMV(CP-3'UTR_{TCV}). C8) RNA total de *Nicotiana benthamiana* inoculada con CarMV.

4.3. Clones que intercambian la proteína de cubierta y los extremos UTR: pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV})

El inicio de la traducción de la RdRp viral requiere que los ribosomas se unan al extremo 5' UTR del gRNA, esto solo se consigue si los extremos 3' y 5' UTR de gRNA están muy próximos puesto que los eIFs implicados en el reclutamiento de los ribosomas permanecen unidos a los 3' CITE. La forma general de enviarlos al extremo 5', en carmovirus, es estableciendo interacciones a larga distancia entre las horquillas de los 3'CITE y las estructuras secundarias presentes en el 5' UTR (Stupina *et al.*, 2011; Truniger *et al.*, 2017). Sin embargo, el TCV es el único carmovirus estudiado donde esta interacción RNA-RNA no se produce, de hecho, el TCV puede funcionar perfectamente con el 5' UTR de otro carmovirus como el virus de los anillos necróticos del iris japonés (*Japanese iris necrotic ringspot virus*, JINRV) (Simon, 2015). Esta situación nos hizo desarrollar en primer lugar las construcciones anteriores de MNSV y CarMV con únicamente el extremo 3' UTR del TCV. Sin embargo, ninguno de los RNA recombinantes MNSV(CP-3'UTR_{TCV}) o CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) mostraron una señal clara de infección sistémica. Aunque se requieren más experimentos para confirmarlo, el único indicio de infección se produjo con el clon pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}) a nivel local, lo que podría indicar el establecimiento de pequeñas infecciones a nivel

celular, o de pocas células contiguas, que no alcanzarían los niveles de replicación necesarios para desarrollar una infección sistémica. Con la intención de mejorar esta situación y puesto que se ha mostrado que el extremo 5' UTR es determinante para la traducción viral en otros carmovirus, se diseñaron dos nuevas construcciones en las que se incorporó el extremo 5' UTR del TCV a los clones pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}). Así, se obtuvieron las construcciones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (Fig. 4.17)

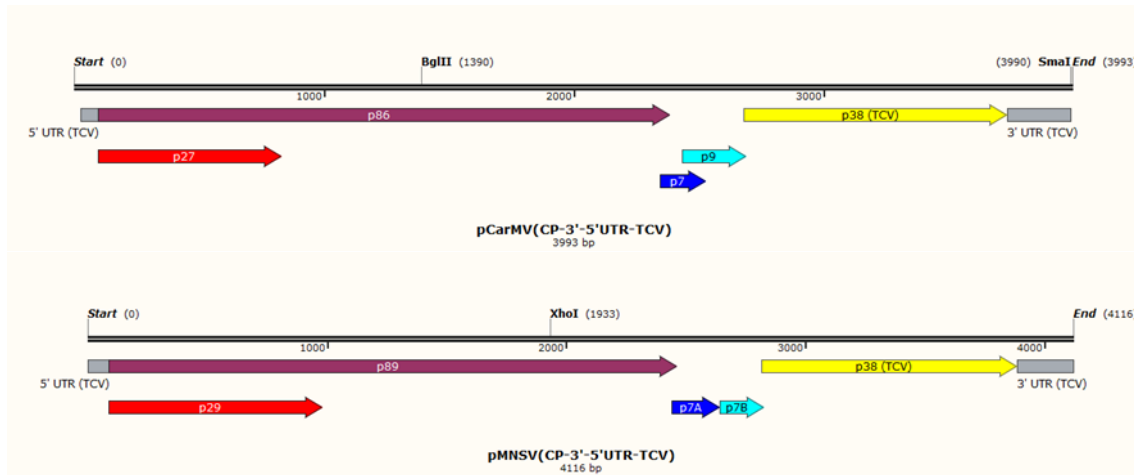


Figura 4.17: Esquema de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (arriba) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (abajo). Las distintas flechas representan los genes virales y las cajas los extremos no codificantes, tal y como están indicados. La posición en el genoma de los sitios de restricción únicos utilizados durante el proceso de clonación se indican en la correspondiente parte superior de cada clon.

4.3.1. Construcción de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV})

Debido al pequeño tamaño del extremo 5' UTR del TCV (63nt), este se introdujo en los clones pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}) mediante una estrategia de PCR inversa. El 5' UTR se dividió en dos regiones de aproximadamente 31-32 nt y cada una se incluyó en la región 5' de dos oligonucleótidos divergentes (Fig. 4.18). Uno de polaridad antiviral que incluyó en su región 3' la secuencia correspondiente al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y el segundo, de polaridad viral, que incluyó en su región 3' la secuencia correspondiente a los primeros 20 nt de las replicasas auxiliares del MNSV (p29) o del CarMV (p27). De esta forma, utilizando como molde el clon pMNSV(CP-3'UTR_{TCV}) o pCarMV(CP-3'UTR_{TCV}), se incorporará el extremo 5' no codificante del TCV a la vez que se eliminará el 5' UTR original (Fig. 4.18). Con esta PCR se sintetizó un fragmento de DNA de unas 7 kb que correspondía directamente a la construcción completa. Tras confirmar, mediante electroforesis en gel de agarosa, que el tamaño del fragmento amplificado era el correcto, purificamos la banda y se llevó a cabo una digestión con la enzima DpnI para eliminar los plásmidos metilados utilizados como molde. Como los oligonucleótidos se sintetizaron con un grupo fosfato en su extremo 5', se evitó este paso limitante de fosforilación y el fragmento purificado se utilizó directamente en una reacción de autoligación. Se transformó *E. coli* DH5 α con la ligación y las ufc crecidas en placa fueron analizadas mediante PCR de colonia. En esta PCR se utilizó un oligonucleótido directo específico del extremo 5' UTR del TCV (TCV-5'UTR (directo), Tabla A.1 del Anexo) y uno reverso de las replicasas auxiliares del MNSV o del CarMV. Tras purificar los plásmidos de interés, se enviaron a secuenciar.

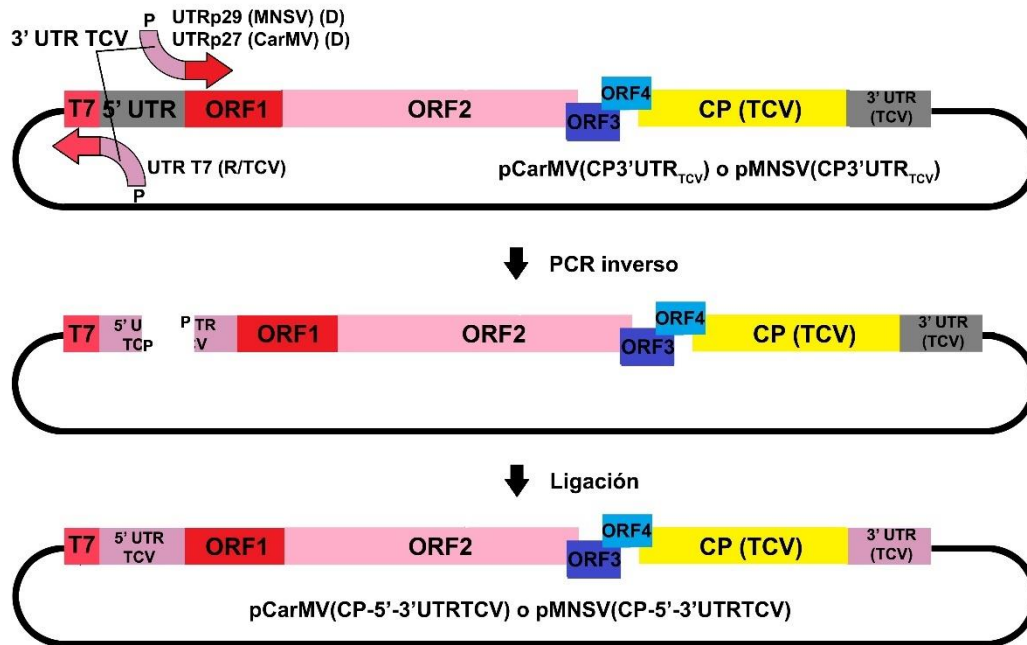
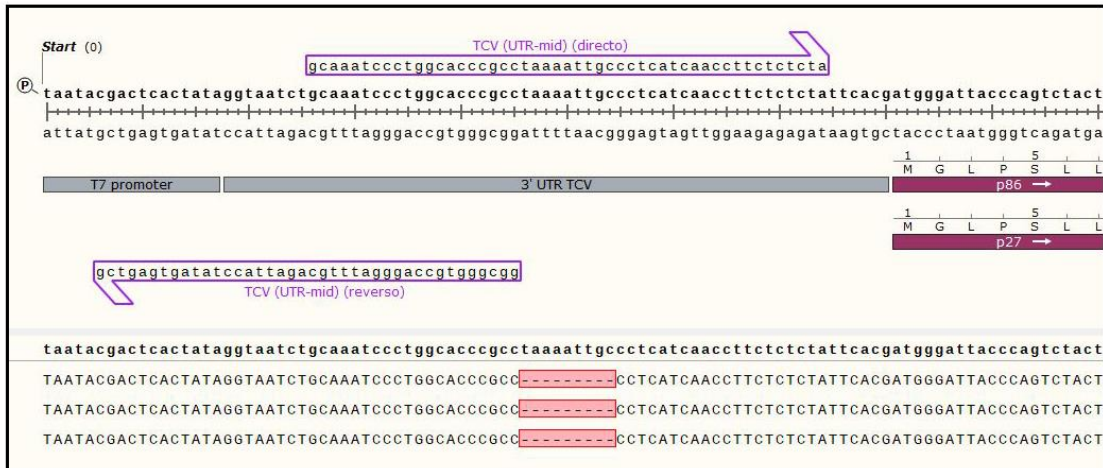


Figura 4.18: Esquema de la estrategia utilizada para la obtención de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}). Las flechas representan las posiciones de los oligonucleótidos (directo y reverso) utilizados para la amplificación. Los nombres de los oligonucleótidos utilizados se indica en las flechas. Las ORF pueden hacer referencia tanto a los genes de MNSV como de CarMV.

Los resultados de la secuenciación mostraron repetidamente una deleción de entre 6 y 9 nt, las más pequeñas, en la región de unión de los oligonucleótidos para los dos clones (Fig. 4.19). Tras repetir este procedimiento en varias ocasiones y llegar al mismo resultado, se pensó que esta deleción podía ser debida a una mala síntesis de los oligonucleótidos o a un evento de recombinación homóloga entre las regiones ricas en pares GC que flanqueaban la región delecionada. Para corregir esto, utilizando como molde aquellos plásmidos que presentaban la deleción, se realizó una nueva PCR inversa. En este caso se diseñaron dos oligonucleótidos sobre la región 5' UTR del TCV, uno de ellos contenía las secuencias delecionadas en su región central pero compartía su extremo 5' con el segundo oligonucleótido, por lo que eran solapantes (Fig. 4.19). Tras la PCR, se obtuvo un fragmento de DNA de unas 7 kb que fue purificado, tratado con DpnI y directamente fue introducido mediante electroporación en células DH5 α , que lo autoligarían por recombinación homóloga. Los plásmidos de las ufc obtenidas fueron directamente enviados a secuenciar y, finalmente, se obtuvieron las construcciones deseadas (Fig. 4.20).

a



b



Figura 4.19: Representación de la secuencias correspondientes a la región 3' UTR del TCV mostrando las deleciones en el punto de unión de algunos clones de pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (a) y de pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (b).

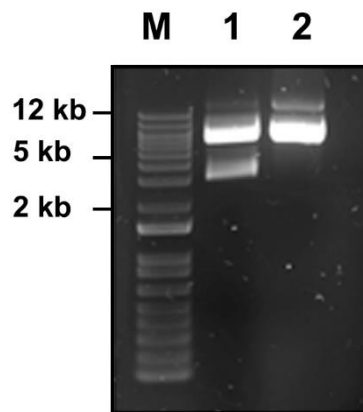


Figura 4.20: Análisis electroforético de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (carril 1) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (carril 2) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus"

4.3.2. Bioensayos de los clones pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) en planta: síntesis de los RNA recombinantes, CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}), mediante transcripción *in vitro*.

La linealización de las construcciones mediante digestión con las correspondientes endonucleasas, las transcripciones, el análisis y la cuantificación de los transcritos virales de MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (Fig. 4.21) se realizaron conforme a lo descrito anteriormente.

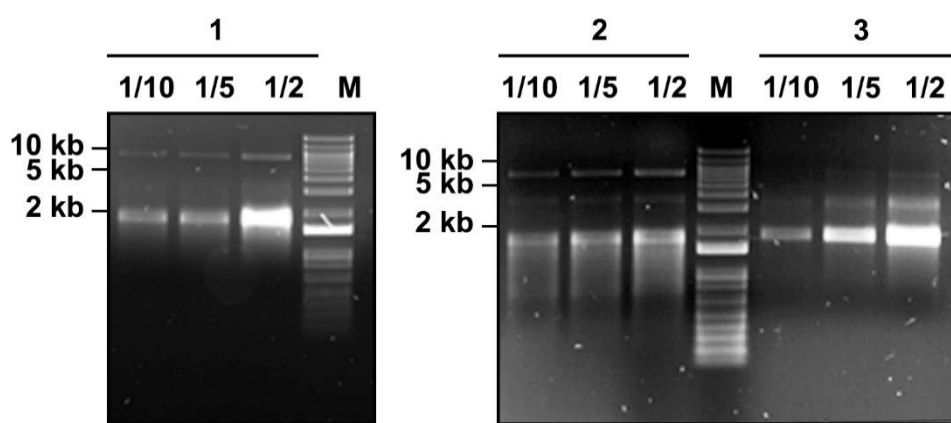


Figura 4.21: Análisis electroforético de las transcripciones de los clones pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (carriles 1) y pCarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (carriles 3) en gel de agarosa al 1 % TAE 1X. M: marcador de DNA "1 kb Plus"; carriles 2: transcritos de RNA del clon pTCV-M. Observar que los transcritos de RNA de aproximadamente 4 kb presentan una movilidad electroforética semejante al DNA bicatenario de 2 kb.

4.3.3. Análisis de la inoculación de los RNA recombinantes CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) en *A. thaliana*

Esta vez, solo se realizó un bioensayo para ambos clones, tal y como se ha descrito con anterioridad. Como en los bioensayos previos, tampoco se observaron, en general, diferencias fenotípicas, ni a 7 ni a 14 dpi (Fig. 4.22) entre las plantas inoculadas con los RNA recombinantes, MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (Fig. 4.22, 1 y 2), y los controles negativos (Fig. 4.22, 3). Únicamente, algunas plantas inoculadas con los RNA mostraron un retraso en el crecimiento, probablemente debido a problemas de plagas de mosca en el invernadero, pero no desarrollaron malformaciones foliares. Como en el resto de bioensayos, prácticamente todas las plantas inoculadas con los transcritos de TCV mostraron los síntomas característicos de la infección (Fig. 4.22, 4).

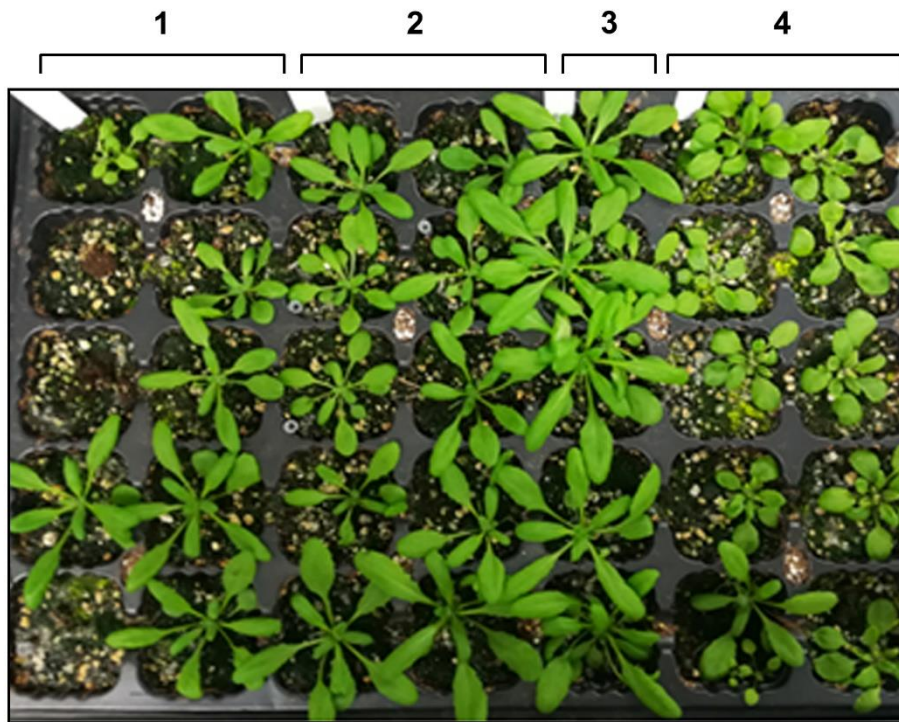


Figura 4.22: Bioensayo de infección en *A. thaliana* de los clones pMNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y pCarMV(CP3'-5'-UTR_{TCV}). La figura muestra las plantas a los 14 dpi siendo 1) plantas inoculadas con MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}), 2) plantas infectadas con CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}), 3) plantas inoculadas con tampón fosfato, 4) plantas infectadas con TCV.

Tal y como podemos observar en la figura 4.23, ninguna de las muestras de AN de plantas completas inoculadas con CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) o MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) mostraron señal de hibridación con la ribosonda de la CP de TCV a 14 dpi. Tampoco se vio señal a 7 dpi ni en hoja inoculada (datos no mostrados). Solo se observó señal de hibridación en los controles positivos de plantas infectadas con TCV.

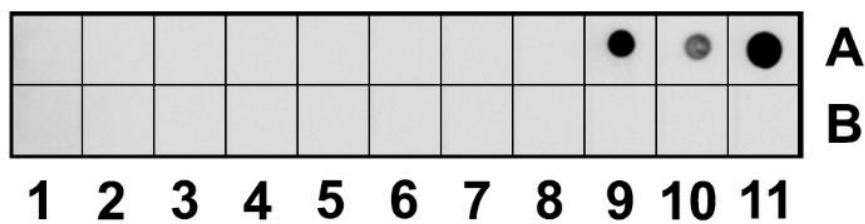


Figura 4.23: Análisis mediante hibridación Dot blot de las muestras de AN extraídas de planta completa en los bioensayos con CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (A1-A8) y con MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) (B1-B8) a 14 dpi. A9-A11) AN de plantas completas inoculadas con TCV. B9-B10) AN de planta completa inoculada con tampón fosfato. Se utilizó una ribosonda de secuencia complementaria al gen de la CP de TCV.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En el presente proyecto se ha estudiado la capacidad infecciosa en *A. thaliana* de seis construcciones distintas de MNSV y CarMV conteniendo distintos elementos funcionales de secuencia del TCV. Se pretendía determinar donde residía estructuralmente la capacidad de TCV para infectar *A. thaliana* y conseguir virus funcionales en esta planta modelo para posteriores estudios de interacción con factores celulares. Sin embargo, ninguno de los clones ensayados generó una infección sistémica. En esta discusión se pretende dar una explicación razonada del porqué de cada construcción, explicando las diferencias que existen entre las regiones intercambiadas de cada virus y dando las posibles razones por las que las construcciones no funcionaron.

La mayor parte de los virus han desarrollado adaptaciones para asegurar la infección del hospedador. Una de estas adaptaciones la constituyen las proteínas supresoras del silenciamiento de RNA (*viral suppressor of RNA silencing*, VSR) que reprimen el proceso de defensa en la planta que se inicia tras una acumulación umbral de dsRNA virales en el citoplasma (Cao *et al.*, 2010). Aunque los carmovirus, como TCV, CarMV y MNSV, utilizan como VSR su proteína de la cápsida (CP), cada una de ellas puede actuar mecanísticamente de forma diferente y en etapas diferentes dentro del proceso de silenciamiento génico. Esto podría suponer un factor limitante en la adaptación de estos virus a las plantas que son capaces de infectar.

Durante las etapas iniciales de la infección de TCV, los dsRNA virales son procesados principalmente por DCL4 en siRNA de 21 nt, que se incorporan en AGO1 para activar el proceso primario de silenciamiento antiviral (Azevedo *et al.*, 2010). Sin embargo, la CP de TCV es un potente supresor del silenciamiento de RNA, tanto a nivel local como sistémico, que actúa mediante el secuestro de siRNA y la interacción directa con AGO1 (Qu *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2010). En este último proceso están implicados dos motivos GW (glicina/triptófano), semejantes al motivo repetitivo GW/WG de las proteínas celulares que interactúan con AGO. Estos motivos están situados en las regiones amino y carboxilo de la proteína. Otros trabajos, más recientes, también sugieren que estos motivos GW permitirían establecer la unión a siRNA (Pérez-Canamás y Hernández, 2015). La actividad VSR de la CP de TCV es necesaria para la carga del virus en el sistema vascular pero el ensamblaje de los viriones no es un requisito para un movimiento sistémico eficaz (ver Pallás *et al.*, 2011 para una revisión). Sin embargo, la entrada desde el floema a las células del mesófilo en partes distales del hospedador requiere la encapsidación (Cao *et al.*, 2010). Además, en infecciones en el ecotipo Col0 de *A. thaliana*, la CP de TCV interacciona con el factor de transcripción TIP (factor de tipo NAC) provocando la inhibición de la ruta de ácido salicílico, el aumento de los niveles de acumulación virales y la disminución de la sintomatología. Esta situación es debida a que la interacción CP-TIP mantiene a TIP fuera del núcleo evitando la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta (Ren *et al.*, 2005; Donze *et al.*, 2014).

Por otro lado, la CP de CarMV, de tamaño y estructura similar a la de TCV, también se ha caracterizado como un potente VSR (datos no publicados del laboratorio). Sin embargo, solo posee el motivo GW de la región amino terminal (Pérez-Canamás y Hernández, 2015). La CP de MNSV, a pesar de ser este virus un carmovirus, es más parecida a las CP de los miembros del género Tombusvirus. Las CP de los tombusvirus no poseen actividad VSR; de hecho, estos virus presentan un VSR diferente, la proteína denominada p19. Sin embargo, la CP de MNSV ha

adquirido este mecanismo de inhibición del silenciamiento génico puesto que no solo une con una alta afinidad RNA virales de manera inespecífica de secuencia, sino que también une siRNA tanto monocatenarios como bicatenarios (Serra-Soriano *et al.*, 2017). Esta proteína no presenta motivos GW, pero su capacidad de unión a moléculas de RNA de distinta naturaleza reside en la adaptación del dominio R y del brazo que une este dominio con el dominio S. Esta propiedad es debida a la interacción de las cargas positivas de esta región y las cargas negativas del RNA (Serra-Soriano *et al.*, 2017).

Por tanto, las tres CP descritas, aunque estructuralmente semejantes pueden ser funcionalmente diferentes. Sin embargo, aunque la CP de TCV se requiere para la entrada de TCV en el sistema vascular por su actividad VSR y para formar viriones que le permitan la salida del floema, esta proteína no es necesaria para el inicio de la replicación ni para el movimiento célula a célula en *A. thaliana* (Cao *et al.*, 2010). Con estos precedentes, los resultados obtenidos con los clones pCarMV(CP_{TCV}) y pMNSV(CP_{TCV}) eran predecibles puesto que ni MNSV ni CarMV puede infectar localmente esta planta. Por tanto, esta capacidad no parece residir, inicialmente, en la presencia de la CP del TCV, sino que tiene que estar vinculada a etapas mucho más tempranas de la infección, como el inicio de la traducción o de la replicación. Por tanto, en las siguientes construcciones se intentó solucionar esta situación, aunque se mantuvo la presencia del gen de la CP de TCV para facilitar la infección sistémica.

La estructura CAP en el extremo 5' y la cola poli(A) en el 3' son elementos críticos que actúan en *cis* durante la traducción canónica del mRNA iniciada cuando el extremo 5' es reconocido por el factor eIF4E y la cola poli(A) por la proteína de unión de la cola poli(A), PABP (Truniger *et al.*, 2017). La iniciación eficiente de la traducción requiere que los extremos 3' y 5' estén próximos. Así, los extremos de los mRNA eucarióticos se conectan con un puente de proteínas que se forma cuando eIF4G interacciona con el factor de iniciación eIF4E, unido a la estructura CAP en 5', y con la PABP, unida a la cola poli(A) en 3'. Entonces, el mRNA se circulariza y la subunidad 40S con el Met-tRNA_i y otros factores forman un complejo terciario (43S) al unirse a eIF4G que escanea en la dirección 5' → 3' hasta encontrar un codón de inicio. En este momento se produce la unión de la subunidad 60S para generar el ribosoma 80S (Stupina *et al.*, 2011).

Puesto que ni los gRNA ni los sgRNA de los carmovirus poseen estas estructuras en los extremos no codificantes, tienen que llevar a cabo un inicio de la traducción no canónico usando elementos en *cis* y mecanismos alternativos desarrollados para reclutar la maquinaria de traducción del hospedador, compitiendo con sus mRNA y evitando las defensas del hospedador a nivel de la traducción (Truniger *et al.*, 2017). Muchos virus de RNA utilizan alternativas para iniciar la traducción como las secuencias IRES (sitios de entrada de ribosomas internos) localizadas en el extremo 5'. Suelen ser en su mayoría virus de animales, pero para los virus de RNA de plantas, como los carmovirus, los extremos 5' tienen un tamaño tan limitado que excluye el reclutamiento de ribosomas por medio de secuencias IRES. En estos encontramos los 3' CITE, (*cap-independent translation enhancers*) que reclutan factores de iniciación del hospedador. La aproximación de estos factores al extremo 5' opuesto del RNA se realiza, generalmente, mediante interacciones RNA-RNA (Stupina *et al.*, 2011). Los 3' CITE se pueden agrupar en siete clases distintas en función de los factores implicados y los mecanismos utilizados. De nuevo, CarMV, MNSV, y TCV presentan 3' CITE diferentes denominados PTE, ISS y TSS, respectivamente (Truniger *et al.*, 2017):

- 3' CITE de tipo PTE: consisten en dos ramas helicoidales conectadas por un una zona rica en citosinas o pirimidinas (dominio C) situadas sobre un tallo con un bucle asimétrico rico en guaninas (domino G); este domino G interacciona mediante un pseudonudo con

- el dominio C (Simon, 2015); se ha descrito que interacciona con eIF4E, aunque requiere el complejo eIF4F completo (eIF4A, eIF4E y eIF4G) para su actividad.
- 3' CITE de tipo ISS: poseen forma de I (I-shaped); es el más pequeño descrito con alrededor de 60 nt de media; presenta un bucle final de 5 a 8 nt y dos bucles asimétricos que sobresalen del tallo principal; también interacciona con el complejo eIF4F a través de la subunidad eIF4E.
 - 3' CITE de tipo TSS: poseen forma de T (T-shaped); está formado por tres horquillas (H4a, H4b y H5) y dos pseudonudos (Ψ_2 y Ψ_3) que se pliegan en una estructura similar al tRNA canónico (Truniger *et al.*, 2017); a diferencia de las dos estructuras anteriores no se ha descrito ninguna interacción con factores eIF; sin embargo, esta estructura potencia la traducción al unirse directamente al sitio P de la subunidad 60S y al ribosoma 80S (Stupina *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012, revisado en Truniger *et al.*, 2017).

Cabe destacar que el 3' CITE de tipo ISS ha sido identificado en diferentes aislados de MNSV, MNSV-M α 5, MNSV-AI y MNSV-264. Sin embargo, el ISS de MNSV-264 es capaz de funcionar con niveles muy bajos de eIF4E, incluso en su ausencia o utilizando eIFiso4E. A diferencia del ISS de MNSV-M α 5 y MNSV-AI, el ISS de MNSV-264 permite a este aislado evitar determinadas resistencias en melón o incluso infectar nuevos huéspedes como *N. benthamiana* (Truniger *et al.*, 2017).

A pesar de este precedente y de que el 3' CITE de TCV interacciona con la maquinaria de traducción celular de manera diferente a los de MNSV y CarMV, las inoculaciones de MNSV(CP-3'UTR_{TCV}) y de CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) no dieron los resultados esperados. Aunque se necesita confirmar el resultado con experimentos alternativos, tan solo CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) podría haber infectado *A. thaliana* de forma local. Este resultado podría ser debido a que al cambiar solo el extremo 3' UTR y no el 5' UTR, la circularización del RNA necesaria para acercar los eIF o la subunidad ribosomal al extremo 5' podría no producirse eficientemente. El 3' CITE del aislado MNSV-M α 5, denominado Ma5TE, requiere la presencia del extremo 5' UTR en *cis*. La estructura secundaria de este extremo 5' está formada por 5 bucles de los cuales dos son complementarios al extremo 3' CITE produciéndose entre ambos extremos una interacción basada en la complementariedad. Esta interacción es la responsable de llevar el complejo de inicio de la traducción unido a Ma5TE al extremo 5' del gRNA (Miras *et al.*, 2018). En este mismo trabajo se mostró, mediante herramientas bioinformáticas, que los extremos 5' y 3' del gRNA del CarMV también presentan secuencias complementarias entre sí. Por lo tanto, entre los extremos 5' y 3' de los virus MNSV y CarMV tendrían lugar interacciones RNA:RNA que serían las responsables del inicio eficiente de la traducción, independientemente de la presencia del CAP. Sin embargo, en TCV no se detectan interacciones canónicas o no canónicas de larga distancia entre las dos regiones. En cambio, se ha propuesto que serían los propios ribosomas los que promoverían la interacción entre los extremos 5' y 3' UTR de TCV. De hecho, tal y como se ha mencionado con anterioridad en esta memoria, el TCV puede funcionar perfectamente con un 5' UTR de otro carmovirus, JINRSV, que presenta un 3' CITE de tipo PTE igual que CarMV (Simon, 2015). Sin embargo, se ha descrito que el 5' UTR de TCV contiene una región de 19 nt, rica en pirimidinas y cerca del codón de inicio, que favorece la traducción de ORF internas independientemente del resto del extremo 5'. Además, en presencia de ribosomas 80S o de la subunidad 40S, esta región queda protegida de la degradación por lo que ambos extremos, 5' y 3', son sinérgicos para la mejora de la traducción (Stupina *et al.*, 2011). De este modo, los RNA quimera necesitarían también el extremo 5' del TCV para llevar a cabo una traducción eficiente. Sin embargo, la introducción de esta región en MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) tampoco dio lugar a la infección de *A. thaliana*.

Aunque la horquilla Pr, localizada en el extremo 3' proximal, está conservada estructuralmente en carmovirus, y sus RdRp son capaces de reconocer moldes heterólogos del mismo género, esta propiedad podría no ser tan general como se supone. Por tanto, una de las posibles causas de los resultados negativos obtenidos en este trabajo podría residir en la incompatibilidad de la RdRp de MNSV o CarMV con las secuencias promotoras de TCV, que se intercambiaron con el extremo 3' UTR. Esto significa que, aun produciéndose la traducción de la RdRp, la replicación de los gRNA y sgRNA y la traducción del resto de proteínas no se iniciaría, al menos eficientemente. En este caso, se debería de determinar si las RdRp de CarMV y MNSV son capaces de reconocer la horquilla Pr de TCV. Además, la horquilla Pr también participa en una interacción conservada a larga distancia necesaria para la lectura a través del codón de parada de la replicasa auxiliar. Puesto que la complementariedad de bases de esta región con la horquilla Pr podría ser fundamental, esta interacción podría perderse al cambiar la región promotora. Finalmente, esta situación impediría la síntesis de la RdRp y el inicio del proceso de replicación.

Como trabajo futuro se podría realizar una nueva construcción de MNSV y/o CarMV que manteniendo el 3' CITE de TCV conservase la Pr propia del virus. Sin embargo, el 3' CITE TSS de TCV actúa como un andamio para la interacción con elementos circundantes, el bucle de la horquilla Pr y el bucle asimétrico de la denominada horquilla H4, a través del bucle interno de la horquilla H5. Estos elementos están altamente relacionados con la acumulación y traducción del virus. La interacción de la RdRp con el extremo 3' de TCV provoca un cambio conformacional generalizado que desorganiza estructuralmente el 3' CITE TSS y los elementos necesarios para una unión al ribosoma, inhibiendo la traducción (Stupina *et al.*, 2011; Firth y Brierley, 2012). Estas interacciones coordinan cuando el RNA se utiliza como molde en los procesos incompatibles de replicación y traducción (Yuan *et al.*, 2012; Simon, 2015), por lo que separar estos elementos estructurales podría impedir su funcionalidad.

Otra línea de investigación futura será el análisis de la posible intercambiabilidad funcional de las correspondientes proteínas de movimiento, no abordado aquí por las dificultades metodológicas que se describen en el párrafo siguiente, y que podría dilucidar si, como se ha descrito para otros sistemas (e.g. Fujita *et al.*, 1996), las MPs son las responsables de la especificidad de huésped observada en lo carmovirus. Al igual que el extremo 3' UTR, el resto del genoma de los carmovirus está extremadamente compactado y sus distintas ORF se encuentran solapadas. Además, presentan un número elevado de estructuras secundarias y terciarias repartidas por el genoma que son capaces de interactuar a larga distancia. Esto último dificulta más el intercambio de partes por separado ya que un simple cambio en un extremo del genoma puede dar lugar a una no funcionalidad de alguna de las partes en el otro extremo del genoma viral imposibilitando así la infección. Sería interesante, para continuar con este trabajo, realizar un estudio previo de los puntos de recombinación encontrados de forma natural en estos virus antes de iniciar nuevas construcciones. Estos puntos de recombinación suelen presentar estructuras secundarias activadoras que son reconocidas por la RdRp viral y que provocan un salto de la replicasa de un molde a otro (Cheng *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los resultados alcanzados en el presente Trabajo Final de Máster pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1. Se ha estudiado la capacidad infecciosa en *A. thaliana* de tres construcciones distintas de MNSV y tres de CarMV conteniendo distintos elementos funcionales de secuencia del TCV. Estos elementos, que incluían la proteína de cubierta y los extremos 3' y 5' UTR, fueron introducidos de manera secuencial y aditiva.
2. CarMV(CP_{TCV}) y MNSV(CP_{TCV}), que contienen la CP de TCV, no infectaron *A. thaliana* ni local ni sistémicamente. Este resultado es esperable teniendo en cuenta que TCV no requiere su CP para iniciar la infección ni para moverse célula a célula, aunque si para entrar y salir del sistema vascular.
3. CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) pero no MNSV(CP-3'UTR_{TCV}), que contiene la CP y el extremo 3' de TCV, dio lugar a una posible infección a nivel local apuntando a que el inicio de la traducción podría ser la etapa limitante que confiere la capacidad de infectar *A. thaliana* a TCV. Sin embargo, CarMV(CP-3'UTR_{TCV}) no fue capaz de infectar sistémicamente, lo que indica que: i) se requieren otros factores para una invasión sistémica exitosa y/o ii) la infección local fue muy poco eficiente.
4. La introducción del extremo 5' UTR del TCV en CarMV(CP-3'-5'UTR_{TCV}) y en MNSV(CP-3'-5'UTR_{TCV}), como método para mejorar la eficiencia de la traducción de las construcciones anteriores, tampoco generó los resultados esperados al no observarse infección ni local ni sistémica. Este resultado sugiere que la replicación podría estar afectada, ya que al cambiar el extremo 3' UTR no solo cambiamos los elementos implicados en el inicio no canónico de la traducción sino también las regiones promotoras reconocidas por la RdRp viral.
5. La organización genómica y la estrategia de expresión génica de los carmovirus, con ORF solapadas, elementos funcionales de estructura secundaria y terciaria repartidos por todo el genoma y síntesis de sgRNA, dificulta estudios como el desarrollado en este trabajo, ya que un simple cambio en un extremo del RNA viral puede dar lugar a una pérdida de función en partes distales o afectar negativamente una funcionalidad diferente de la que se esperaba.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., et al.** (2016) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, **161**, 2921–2949.
- Azevedo, J., García, D., Pontier, D., et al.** (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.*, **24**, 904–915.
- Blake, J.A., Lee, K.W., Morris, T.J. and Elthon, T.E.** (2007) Effects of turnip crinkle virus infection on the structure and function of mitochondria and expression of stress proteins in turnips. *Physiol. Plant.*, **129**, 698–706.
- Bolger, E.M., Arsova, B. and Usadel, B.** (2018) Plant genome and transcriptome annotations: from misconceptions to simple solutions. *Brief. Bioinform.*, **19**, 437–449.
- Boullilla, M.** (2011) Positive selection, molecular recombination structure and phylogenetic reconstruction of members of the family Tombusviridae: Implication in virus taxonomy. *Genet. Mol. Biol.*, **34**, 647–660.
- Burgyan, J. and Havelda, Z.** (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends. Plant Sci.*, **16**, 265–272.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E.T., Sit, T.L. and Lommel, S.A.** (2001) The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **39**, 419–460.
- Cañizares, M.C., Marcos, J.F. and Pallás, V.** (2001) Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of Carnation mottle virus (CarMV) and phylogenetic relationships within the Tombusviridae family. *Arch. Virol.*, **146**, 2039–2051.
- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M.G., Simon, A.E., Morris, T.J. and Qu, F.** (2010) The Capsid Protein of Turnip Crinkle Virus Overcomes Two Separate Defense Barriers To Facilitate Systemic Movement of the Virus in *Arabidopsis*. *J. Virol.*, **84**, 7793–7802.
- Carrington, J.C., Heaton, L.A., Zuidema, D., Hillman, B.I. and Morris, T.J.** (1989) The genome structure of turnip crinkle virus. *Virology*, **170**, 219–226.
- Carrington, J.C. and Morris, T.J.** (1986) High resolution mapping of carnation mottle virus-associated RNAs. *Virology*, **150**, 196–206.
- Cheng, C.P. and Nagy, P.D.** (2003) Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *J. Virol.*, **77**, 12033–12047.
- Cheng, C.P., Panavas, T., Luo, G. and Nagy, P.D.** (2005) Heterologous RNA replication enhancer stimulates in vitro RNA synthesis and template-switching by the carmovirus, but not by the tombusvirus, RNA-dependent RNA polymerase: implication for modular evolution of RNA viruses. *Virology*, **341**, 107–121.
- Cimino, P.A., Nicholson, B.L., Wu, B., Xu, W. and Whithe, K.A.** (2011) Multifaceted regulation of translational readthrough by RNA replication elements in a Tombusvirus. *PLoS Pathol.*, **7**.
- Cohen, Y., Qu, F., Gisel, A., Morris, T.J. and Zambryski, P.C.** (2000a) Cell-to-cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged Turnip crinkle virus. *Virology*, **273**, 258–266.
- Cohen, Y., Qu, F., Gisel, A., Morris, T.J. and Zambryski, P.C.** (2000b) Nuclear localization of

- Turnip crinkle virus movement protein p8. *Virology*, **273**, 276–285.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Report.*, **1**, 19–21.
- Donze, T., Qu, F., Twigg, P. and Morris, T.J.** (2014) Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in *Arabidopsis* by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology*, **449**, 207–214.
- Firth, A.E. and Brierley, I.** (2012) Non-canonical translation in RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, **93**, 1385–1409.
- Fujita, A., Mise, K., Okuno, T., Ahlquist, P. and Furusawa, I.** (1996) A single codon change in a conserved motif of a bromovirus movement protein gene confers compatibility with a new host. *Virology*, **223**, 283–291.
- Gallitelli, D. and Hull, R.** (1985) Characterization of satellite RNAs associated with tomato bushy stunt virus and five other definitive tombusviruses. *J. Gen. Virol.*, **66**, 1533–1543.
- García-Castillo, S., Sánchez-Pina, M. and Pallás, V.** (2003) Spatio-temporal analysis of the RNAs, coat and movement (p7) proteins of Carnation mottle virus in Chenopodium quinoa plants. *J. Gen. Virol.*, **84**, 745–749.
- García, J.A. and Pallás, V.** (2015) Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.*, **11**, 21–30.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2009) A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology*, **395**, 133–142.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2006) Functional analysis of the five Melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2371–2380.
- Genovés, A., Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2010) The Intra- and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol. Plant-microbe Interact.*, **23**, 263–272.
- Genovés, A., Pallás, V. and Navarro, J.A.** (2011) Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic and viral cell-to-cell movement. *J. Virol.*, **85**, 7797–7809.
- Gómez-Aix, C., García-García, M., Aranda, M.A. and Sánchez-Pina, M.A.** (2015) Melon necrotic spot virus replication occurs in association with altered mitochondria. *Mol. Plant-microbe Interact.*, **28**, 387–397.
- Gosalvez, B., Navarro, J.A., Lorca, A., Botella, F., Sánchez-Pina, M.A. and Pallás, V.** (2003) Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *J. Virol. Methods*, **113**, 87–93.
- Guilley, H., Carrington, J.C., Balázs, E., Jonard, G., Richards, K. and Morris, T.J.** (1985) Nucleotide sequence and genome organization of Carnation mottle virus. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6663–6667.
- Hacker, D.L., Petty, I.T.D., Wei, N. and Morris, T.J.** (1992) Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, **186**, 1–8.
- Harrison, B.D. and Wilson, T.M.A.** (1999) Tobacco mosaic virus: Pioneering research for a century. *Trans. R. Soc. London B.*, **354**, 517–685.
- Hsu, T.H. and Spindler, K.R.** (2012) Identifying host factors that regulate viral infection. *PLoS Pathol.*, **8**(7):e1002772.
- Hull, R.** (2002) Induction of Disease 1: Virus Movement through the Plant and Effects on Plant

- Metabolism. In L. Academic Press, ed. *Matthew's Plant Virology*. Hull, R., pp. 373–436.
- Jablonsky, S.A. and Morrow, C.** (1995) Mutation of the aspartic acid residues of the GDD sequence motif of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase results in enzymes with altered metal ion requirements for activity. *J. Virol.*, **69**, 1532–1539.
- Jo, Y., Choi, H. and Cho, W.K.** (2015) Complete genome sequence of a Carnation mottle virus infecting hop plants. *Genome Announc.*, **3**, 1–2.
- Kamer, G. and Argos, P.** (1984) Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7269–7282.
- Kneller, E.L.P., RAKontondrafara, A.M. and Miller, W.A.** (2006) Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res.*, **119**, 63–75.
- Li, V.Z., Qu, F. and Morris, T.J.** (1998) Cell-to-cell movement to turnip crinkle virus is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology*, **244**, 416.
- Marcos, J.F., Vilar, M., Pérez-Payá, E. and Pallás, V.** (1999) In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). *Virology*, **255**, 354–365.
- Marsh, M. and Helenius, A.** (2006) Virus Entry: Open Sesame. *Cell*, **124**, 729–740.
- Martínez-Turiño, S. and Hernández, C.** (2011) A membrane-associated movement protein of Pelargonium flower break virus shows RNA-binding activity and contains a biologically relevant leucine zipper-like motif. *Virology*, **413**, 310–319.
- Martínez-Turiño, S. and Hernández, C.** (2012) Analysis of the subcellular targeting of the smaller replicase protein of Pelargonium flower break virus. *Virus Res.*, **163**, 580–591.
- Martínez-Turiño, S. and Hernández, C.** (2010) Identification and characterization of RNA-binding activity on the ORF1-encoded replicase protein of Pelargonium flower break virus. *J. Gen. Virol.*, **91**.
- Martínez-Turiño, S. and Hernández, C.** (2009) Inhibition of RNA silencing by the coat protein of Pelargonium flower break virus: distinctions from closely related suppressors. *J. Gen. Virol.*, **90**, 519–525.
- May, J., Johnson, P., Saleem, H. and Simon, A.E.** (2017) A Sequence-Independent, Unstructured Internal Ribosome Entry Site Is Responsible for Internal Expression of the Coat Protein of Turnip Crinkle Virus. *J. Virol.*, **91**, 1–16.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. and Silhavy, D.** (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.*, **80**, 5747–5756.
- Miller, W.A. and Koev, G.** (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*, **273**, 1–8.
- Miras, M., Miller, W.A., Truniger, V. and Aranda, M.A.** (2017) Non-canonical translation in plant RNA viruses. *Front. Plant Sci.*, **494**.
- Miras, M., Rodríguez-Hernández, A.M., Romero-López, C., Berzal-Herranz, A., Colchero, J., Aranda, M.A. and Truniger, V.** (2018) A Dual Interaction Between the 5'- and 3'-Ends of the Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) RNA Genome Is Required for Efficient Cap-Independent Translation. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1–16.
- Mochizuki, T., Ohnishi, J., Ohki, T., Kanda, A. and Tsuda, S.** (2008) Amino acid substitution in the coat protein of Melon necrotic spot virus causes loss of binding to the surface of *Ospidium bornocanus* zoospores. *J. Gen. Plant Pathol.*, **74**, 176–181.
- Morris, T.J. and Carrington, J.C.** (1988) Carnation mottle virus and viruses with similar

- properties. In Renate Koenig, ed. *The Plant Viruses*. New York: Plenum Press, pp. 73–112.
- Navarro, J.A., Genovés, A., Climent, J., Saurí, A., Martínez-Gil, L., Mingarro, I. and Pallás, V.** (2006) RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology*, **356**, 57–67.
- Navarro, J.A. and Pallás, V.** (2017) An Update on the Intracellular and Intercellular Trafficking of Carmoviruses. *Front. Plant Sci.*, **8**, 1–7.
- Norrander, J., Kempe, T. and Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**, 101–106.
- Oh, J.W., Kong, Q., Song, C., Carpenter, C.D. and Simon, A.E.** (1995) Open reading frames of turnip crinkle virus involved in satellite symptom expression and incompatibility with *Arabidopsis thaliana* ecotype Dijon. *Mol Plant-microbe Interact*, **8**, 979–987.
- Ohki, T., Akita, F., Mochizuki, T., Kanda, A., Sasaya, T. and Tsuda, S.** (2010) The protruding domain of the coat protein of Melon necrotic spot virus is involved in compatibility with and transmission by the fungal vector *Oplidium bornovanus*. *Virology*, **402**, 129–134.
- Ouibrahim, L. and Caranta, C.** (2013) Exploitation of natural genetic diversity to study plant-virus interactions: what can we learn from *Arabidopsis thaliana*? *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 844–854.
- Pagán, I., Fraile, A., Fernández-Fueyo, E., Montes, N., Alonso-Blanco, C. and García-Arenal, F.** (2010) *Arabidopsis thaliana* as a model for the study of plant-virus co-evolution. *Philos. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci.*, **365**, 1983–1995.
- Pallás, V. and García, J.A.** (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.*, **92**, 2691–2705.
- Pallás, V., Genovés, A., Sánchez-Pina, M.A. and Navarro, J.A.** (2011) Systemic Movement of Viruses Vía the Plant Phloem. In C. Caranta, M. A. Aranda, M. Tepfer, and J. J. López-Moya, eds. *Recent Advances in Plant Virology*. Caister Academic Press, p. 470.
- Pallás, V., Mas, P. and Sánchez-Navarro, J.A.** (1998) Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods Mol. Biol.*, **81**, 461–468.
- Pérez-Canamás, M. and Hernández, C.** (2015) Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J. Biol. Chem.*, **290**, 3106–3120.
- Qu, F. and Morris, T.J.** (1999) Carmoviruses (Tombusviridae). In R. G. Webster and A. Granoff, eds. *Encyclopedia of Virology*. Academic Press.
- Qu, F., Ren, T. and Morris, T.J.** (2003) The coat protein of Turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.*, **77**, 511–522.
- Rajendran, K.S., Pogany, J. and Nagy, P.D.** (2002) Comparison of Turnip crinkle virus RNA-dependent RNA polymerase preparations expressed in *Escherichia coli* or derived from infected plants. *J. Virol.*, **76**, 1707–1717.
- Ren, T., Qu, F. and Morris, T.J.** (2005) The nuclear localization of the *Arabidopsis* transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of Turnip crinkle virus. *Virology*, **331**, 316–324.
- Riviere, C.J. and Ronchon, D.** (1990) Nucleotide sequence and genomic organization of melon necrotic spot virus. *J. Gen. Virol.*, **71**, 1887–1896.
- Riviere, C.J., Pot, J., Tremaine, J.H. and Ronchon, D.M.** (1989) Coat protein of melon necrotic spot carmovirus is more similar to those of tombusviruses than those of carmoviruses. *J. Gen. Virol.*, **70**.

- Russo, M., Burgyan, J. and Martelli, G.P. (1994) Molecular Biology of Tombusviridae. *Adv. Virus Res.*, **44**, 381–428.
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A. and Orzaez, D. (2013) GoldenBraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol.*, **162**, 1618–1631.
- Serra-Soriano, M., Navarro, J.A. and Pallás, V. (2017) Dissecting the multifunctional role of the N-terminal domain of the Melon necrotic spot virus coat protein in RNA packaging, viral movement and interference with antiviral plant defence. *Mol. Plant Pathol.*, **18**, 837–849.
- Serra-Soriano, M., Pallás, V. and Navarro, J.A. (2014) A model for transport of a viral membrane protein through the early secretory pathway: minimal sequence and endoplasmic reticulum lateral mobility requirements. *Plant J.*, **77**.
- Shi, Y., Ryabov, E. V., Wezel, R. van, Li, C., Jin, M., Wang, W., Fan, Z. and Hong, Y. (2009) Suppression of local RNA silencing is not sufficient to promote cell-to-cell movement of Turnip crinkle virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signal Behav.*, **4**, 15–22.
- Simon, A.E. (2015) 3'UTRs of carmoviruses. *Virus Res.*, **206**, 27–36.
- Simon, A.E. and Miller, W.A. (2013) 3' cap-independent translation enhancers in plant viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, **67**, 21–42.
- Song, C. and Simon, A.E. (1995) Requirement of a 3'-terminal stem-loop in vitro transcription by a RNA dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **254**, 6–14.
- Song, C. and Simon, A.E. (1994) RNA-dependent RNA polymerase from plants infected with Turnip crinkle virus can transcribe (+)- and (-)-strands of virus-associated RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 8792–8796.
- Stein, L. (2001) Genome annotation: from sequence to biology. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 493–503.
- Stupina, V.A., Yuan, X., Meskauskas, A., Dinman, J.D. and Simon, A.E. (2011) Ribosome Binding to a 5' Translational Enhancer Is Altered in the Presence of the 3' Untranslated Region in Cap-Independent Translation of Turnip Crinkle Virus. *J. Virol.*, **85**, 4638–4653.
- Sun, X. and Simon, A.E. (2006) A cis-replication element functions in both orientations to enhance replication of Turnip crinkle virus. *Virology*, **352**, 39–51.
- Taliansky, M., Torrance, L. and Kalinina, N.O. (2008) Role of plant virus movement proteins. In *Plant Virology Protocols*. Humana Press, pp. 33–54.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C. and Maule, A.J. (2003) Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, **306**, 33–41.
- Truniger, V., Miras, M. and Aranda, M.A. (2017a) Structural and functional diversity of plant virus 3'-cap-independent translation enhancers (3'-CITEs). *Front. Plant Sci.*, **2047**.
- Truniger, V., Miras, M. and Aranda, M.A. (2017b) Structural and Functional Diversity of Plant Virus 3'-Cap-Independent Translation Enhancers (3'-CITEs). *Front. Plant Sci.*, **8**, 1–14.
- Vilar, M., Esteve, V., Pallás, V., Marcos, J.F. and Pérez-Payá, E. (2001) Structural properties of Carnation mottle virus p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **276**.
- Vilar, M., Saurí, A., Marcos, J.F., Mingarro, I. and Pérez-Payá, E. (2005) Transient structural ordering of the RNA-binding domain of Carnation mottle virus p7 movement protein modulates nucleic acid binding. *ChemBiochem*, **6**, 1391–1396.
- Vilar, M., Saurí, A., Monne, M., Marcos, J.F., Heijne, G. van, Pérez-Payá, E. and Mingarro, I. (2002) Insertion and topology of a plant viral movement protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, **277**, 23447–23452.

- Wada, Y., Tanaka, H., Yamashita, E., Kubo, C., Ichiki-Uehara, T., Nakazono-Nagaoka, E., Omura, T. and Tsukihara, T.** (2008) The structure of melon necrotic spot virus determined at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **64**, 8–13.
- Wang, A.** (2015) Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **53**, 45–66.
- Yuan, X., Shi, K. and Simon, A.E.** (2012) A Local, Interactive Network of 3' RNA Elements Supports Translation and Replication of Turnip Crinkle Virus. *J. Virol.*, **86**, 4065–4081.

ANEXO

8. ANEXO

Tabla A.1: Secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre del cebador	Secuencia
p89mid (directo/MNSV)	CGAACTCGAGTGCACGACGAG (XhoI)
p7B-TCVcp (reverso/MNSV+TCV)	ACTCTAGGATCATTTCATTCTAACCATCGCCATTTGTA
p7B-TCVcp (directo/MNSV+TCV)	TACAAATGGCGATGGTTAGAATGGAAAATGATCCTAGAGT
p38-3UTRMNSV (reverso/MNSV)	TTGGAGTACAATAAATCAAACATAAATTCTGAGTGCTTGCC
p38-3UTRMNSV (directo/MNSV)	GGCAAGCACTCAGAATTTAGTTTGATTTATTGTACTCCAA
3UTRMNSV (reverso/MNSV)	ATGCCTGCAGGGCGGGATGGG (PstI)
p86mid (directo/CarMV)	GACAAGATCTTGGGGAGGACC (BglII)
p9-TCVcp (reverso/CarMV)	ACTCTAGGATCATTTCATTGGTGTACTTATCGAAATG
p9-TCVcp (directo/ CarMV)	CATTTTCGATAACTACACCAAATGGAAAATGATCCTAGAGT
p38-3UTRCarMV (reverso/CarMV)	AACAACTTTTCTGTTGCATCTAAATTCTGAGTGCTTGCC
p38-3UTRCarMV (directo/CarMV)	GGCAAGCACTCAGAATTTAGATGCAACAGAAAAGTTTGTT
3UTRCarMV (reverso/CarMV)	ACGTCCCGGGCGGGGAAAGAGTAC (SmaI)
CarTCVBsmBI-1 (directo)	GCGCCGTCTCGCTCGGACAAGATCTGGGGAGGACC (BsmBI)
CarTCVBsmBI-3 (reverso)	GCGCCGTCTCGTCATTTTCATTGGTGTA (BsmBI)
CarTCVBsmBI-2 (directo)	GCGCCGTCTCGCTCACAGGAAACAGCTATGAC (BsmBI)
CarTCVBsmBI-4 (reverso)	GCGCCGTCTCGATGATCCTAGAGTCCGGAA (BsmBI)
UTR T7 (reverso/TCV)	TTTAGGCGGGTGCCAGGGATTTGCAGATTACCCCTATAGTGACTUG TATTA
UTRp29 (MNSV) (directo)	ATTGCCCTCATCAACCTTCTCTATTACGATGGATACTGGTTTGAA ATTC
UTRp27 (CarMV) (directo)	ATTGCCCTCATCAACCTTCTCTATTACGATGGGATTACCCAGTCT ACTAG
TCV-5'UTR (directo)	GGTAATCTGCAAATCCCTGGCAC
TCV-3'UTR(PstI) (reverso)	GAGCGCGCCCCCCCCCGGACGGGACGTCTGCAG (PstI)
TCV (UTR-mid) (directo)	GCAAATCCCTGGCACCCGCCTAAAATTGCCCTCATCAACCTTCTCTCT
TCV (UTR-mid) (reverso)	GGCGGGTGCCAGGGATTTGCAGATTACCTATAGTGAGTCG