

RESUMEN

Los cítricos son el cultivo frutal económicamente más importante tanto en España como en el resto de los países productores. La clave para mantener la competitividad de este sector consiste en obtener material vegetal de alta calidad, para lo cual son indispensables los programas de mejora. La mejora de cítricos por métodos clásicos es muy complicada, por lo que hay que recurrir a las nuevas tecnologías para intentar acelerar y optimizar el procedimiento. La reciente secuenciación del genoma de dos especies de cítricos ha permitido identificar una larga lista de genes candidatos a participar en determinados procesos biológicos. Sin embargo, son necesarios nuevos análisis para asociar cada gen a un fenotipo específico o función biológica.

El empleo de vectores virales para determinar la función de genes mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) ha demostrado ser una herramienta muy útil para los estudios de genética reversa realizados en plantas. Este sistema presenta ventajas respecto a los métodos tradicionales para estudiar la función de genes como son la mutagénesis o la transformación genética, ya que permite ensayar la función de numerosos genes en un corto periodo de tiempo. Esto es especialmente crítico en el caso de los cítricos, que poseen largos periodos juveniles de entre 6 y 8 años y donde la transformación de plantas adultas es muy difícil. Además, permite estudiar la función de genes que son esenciales para el crecimiento o el desarrollo de la planta y cuyo análisis es inviable con los métodos tradicionales.

Al comienzo de la tesis se había desarrollado un vector viral para cítricos basado en el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) con el que se pueden expresar proteínas pero que no se ha ensayado para estudiar la función de genes mediante VIGS. En el laboratorio disponíamos de un clon infeccioso de cDNA del genoma completo del virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV), un virus que infecta a todas las especies y variedades de cítricos ensayadas y es asintomático en la mayoría de ellas. Este clon infeccioso se ha modificado para obtener vectores virales basados en el genoma de CLBV que pueden servir tanto para expresar proteínas como para silenciar mediante VIGS genes de cítricos para la mejora genética de este cultivo. Para ello, se ha introducido un punto de corte único *PmlI* en dos zonas del genoma de CLBV: en el extremo 3' no traducible (vector *clbv3'*) o en la zona intergénica localizada entre los genes de las proteínas de movimiento y cápsida (CP) (vector *clbvIN*). Para la expresión de secuencias foráneas mediante la formación de un nuevo RNA subgenómico (sgRNA) se delimitó la secuencia mínima promotora del

sgRNA CP mediante clonación de fragmentos de distinta longitud en torno al origen de transcripción de dicho sgRNA en el vector *clbv3'*. El fragmento de 92 bases localizado entre los nt -42 y +50 respecto al inicio de transcripción del sgRNA CP contenía todos los elementos necesarios para la promoción de un nuevo sgRNA *in vivo*. Esta secuencia mínima promotora se clonó en los 2 vectores virales previamente desarrollados para generar los vectores *clbv3'pr* y *clbvINpr*, respectivamente. Ambos vectores fueron capaces de producir un nuevo sgRNA y de expresar proteínas recombinantes.

Para determinar la estabilidad de los vectores obtenidos se clonaron en ellos fragmentos de secuencias lineales de distinto tamaño, o en tándem invertido para la formación de una estructura en horquilla, y se inocularon en plantas de *N. benthamiana* y cítricos. Todas las construcciones derivadas del vector *clbv3'* se mostraron estables a lo largo de las diferentes brotaciones analizadas durante al menos 3 años, comprobándose la replicación viral e integridad del inserto. Sin embargo, no se detectó multiplicación viral con ninguna de las construcciones derivadas del vector *clbvIN*. La estabilidad de las construcciones derivadas de los vectores con el promotor duplicado dependía del tamaño del inserto. Con todas ellas se detectó replicación viral pero se observaron eventos de recombinación cuando se clonaban fragmentos superiores a 720 nt en el vector *clbvINpr* o 408 nt en el vector *clbv3'pr*.

Un factor importante para determinar la eficiencia y funcionalidad de los vectores desarrollados es conocer cómo se mueve y se distribuye el virus en los distintos tejidos de la planta. Para ello se inocularon plantas de *N. benthamiana* y cítricos con la construcción *clbv3'pr*-GFP, que expresa GFP en los tejidos donde se localiza el virus. En *N. benthamiana*, la observación de GFP permitió detectar la presencia de CLBV en la mayoría de tejidos, acumulándose preferentemente en óvulos y regiones meristemáticas. En cítricos no se pudo visualizar GFP pero el virus se detectó en regiones meristemáticas mediante RT-PCR a tiempo real e hibridación molecular. La acumulación de CLBV en tejidos meristemáticos explicaría la dificultad de eliminar este virus mediante microinjerto.

Para evaluar la capacidad de los vectores *clbv3'pr* y *clbvINpr* para expresar proteínas se clonó en ellos la secuencia completa del gen *gfp* y se cuantificó la cantidad de proteína GFP sintetizada en las plantas infectadas. En *N. benthamiana* la cantidad de GFP estimada para el vector *clbv3'pr* fue de 16 µg de proteína por gramo de peso fresco, cantidad que resultó entre 5 y 6 veces superior a la estimada

para el vector *clbvINpr*. Sin embargo, en cítricos, debido a la inestabilidad del vector *clbv3'pr*, sólo se pudo cuantificar la proteína expresada por la construcción del vector *clbvINpr*, estimándose en 0.6 µg de GFP por gramo de peso fresco.

La efectividad de los vectores *clbv3'*, *clbv3'pr* y *clbvINpr* para silenciar genes mediante VIGS se ensayó clonando fragmentos de genes tanto endógenos de plantas (*pds*, *actina*, *sulfur*) como el gen *gfp* introducido experimentalmente en plantas transgénicas. En cítricos todas las construcciones de los tres vectores indujeron fenotipo de silenciamiento del gen ensayado, aunque el vector *clbv3'* fue el más efectivo para el estudio de VIGS en este huésped. Sin embargo, en *N. benthamiana* sólo se desencadenó el silenciamiento en las plantas inoculadas con la construcción *clbv3'pr*-hp58PDS, que expresa una horquilla de doble cadena de un fragmento de 58 nt del gen *pds*. En todas las plantas silenciadas se detectó una disminución del correspondiente mRNA del gen ensayado y una acumulación de siRNAs derivados tanto del mRNA del gen insertado como del RNA genómico del virus. Por otro lado, el fenotipo de silenciamiento de los genes ensayados se observó en sucesivas brotaciones, lo que confirma la gran estabilidad de los vectores basados en el genoma de CLBV.

Los vectores virales desarrollados en esta tesis constituyen una herramienta eficiente para el estudio de la función de genes mediante genética reversa utilizando la técnica VIGS. También pueden ser útiles para estudio de genética directa mediante expresión de proteínas o para la protección del cultivo frente a enfermedades producidas por virus, bacterias y hongos o frente a plagas de invertebrados.