

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



*Caracterización y secuenciación de un aislado español del
virus del mosaico del tomate.*

Grado en Biotecnología

Curso 2015-2016

Autor:

Joan Arias Moreno

Tutor:

Carmelo López del Rincón

Director:

José Antonio Darós Arnau

Valencia, marzo 2016



Datos del trabajo

Título:	Caracterización y secuenciación de un aislado español del virus del mosaico del tomate
Autor:	Joan Arias Moreno
Localidad y fecha:	Valencia, 22 de Marzo de 2016
Tutor:	Carmelo López Del Rincón
Director:	José Antonio Darós Arnau
Tipo de licencia:	Licencia Creative Commons. "Reconocimiento no Comercial Sin Obra Derivada"

Resumen

El virus del mosaico del tomate (ToMV) es un virus de RNA perteneciente al género *Tobamovirus* que se encuentra distribuido por todo el mundo y causa importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Los síntomas característicos de la infección consisten en un retraso en el crecimiento de los tejidos foliares, así como la aparición de manchas de color amarillo, el conocido mosaico. Los frutos de las plantas afectadas suelen tener un menor tamaño, con la consiguiente pérdida de productividad, y pueden mostrar manchas necróticas, lo que disminuye su valor comercial. Las variedades de tomate de mayor interés comercial habitualmente contienen genes que confieren resistencia a algunas infecciones virales. Entre ellos están los genes *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2²* que confieren resistencia al ToMV. En este trabajo se ha caracterizado un aislado español del ToMV, que inicialmente se pensaba que era capaz de romper la resistencia que confieren estos genes. Para ello, primero se clonó y secuenció este aislado español del ToMV. Se comparó su secuencia con la de otras variantes presentes en las bases de datos. El aislado español del ToMV mostró gran similitud con la variante de secuencia DQ873692.1, para la que se ha descrito la capacidad de superar la resistencia de *Tm-2* y *Tm-2²*. Con el clon infeccioso se inocularon las variedades de tomate Enate, Palamós, Marglobe y Fimande, que contienen el gen de resistencia *Tm-2²* en homocigosis, heterocigosis o no lo contienen (las dos últimas), respectivamente. Se determinó la infectividad y la sintomatología en cada una de las variedades. Los resultados mostraron que el aislado español del ToMV caracterizado en este trabajo no es capaz de superar la resistencia del gen *Tm-2²* cuando se encuentran en homocigosis o heterocigosis.

Palabras clave: virus, tomate, resistencia, tobamovirus, ToMV, clon infeccioso

Resum

El virus del mosaic de la tomata (ToMV) és un virus de RNA que pertany al gènere *Tobamovirus* que es troba distribuït per tot el món i causa importants pèrdues econòmiques en cultius de tomata (*Solanum lycopersicum* L.). Els símptomes característics de la infecció consisteixen en

un retard en el creixement dels teixits foliars, així com l'aparició de taques de color groc, el conegut mosaic. Els fruits de les plantes afectades solen tenir menor tamany, amb la consegüent pèrdua de productivitat, i poden mostrar taques necròtiques, el que disminueix el seu valor comercial. Les varietats de tomata de major interès comercial habitualment contenen gens que confereixen resistència a algunes infeccions virals. Entre ells hi ha els gens *Tm-1*, *Tm-2* i *Tm-2²* que confereixen resistència a ToMV. En aquest treball s'ha caracteritzat un aïllat espanyol del ToMV, que inicialment es pensava que era capaç de trencar la resistència que confereixen aquests gens. Per a això, primer es va clonar i seqüenciar aquest aïllat espanyol del ToMV. Es va comparar la seva seqüència amb la d'altres variants presents en les bases de dades. L'aïllat espanyol del ToMV va mostrar gran similitud amb la variant de seqüència DQ873692.1, per a la que s'ha descrit la capacitat de superar la resistència de *Tm-2* i *Tm-2²*. Amb el clon infecciós es van inocular les varietats de tomata Enate, Palamós, Marglobe i Fimande, que contenen el gen de resistència *Tm-2²* en homozigosi, heterozigosi o no el contenen (les dues últimes), respectivament. Es va determinar la infectivitat i la simptomatologia en cadascuna de les varietats. Els resultats van mostrar que l'aïllat espanyol del ToMV caracteritzat en aquest treball no és capaç de superar la resistència del gen *Tm-2²* quan es troba en homozigosi o heterozigosi.

Paraules clau: virus, tomata, resistència, tobamovirus, ToMV, clon infecciós

Abstract

Tomato mosaic virus (ToMV) is an RNA virus belonging to the genus Tobamovirus that is worldwide distributed and causes significant economic losses in tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.). Symptoms of infection consist in a stunting of leaf tissues as well as the appearance of yellow coloration, the well-known mosaic. Fruits of affected plants tend to be smaller, resulting in lower productivity, and may show necrotic spots, reducing their commercial value. Tomato varieties of greater commercial interest usually contain genes that confer resistance to some viral infections. Among these, are the *Tm-1*, *Tm-2* and *Tm-2²* genes that confer resistance to ToMV. A Spanish isolated of ToMV, which initially was thought to be able to break the genes resistance conferring these genes, has been characterized in this work. To do this, first we cloned and sequenced this Spanish isolated of ToMV. Its sequence was compared with other variants present in databases. The Spanish isolate of ToMV showed great similarity to the sequence variant DQ873692.1, which has the ability to overcome the resistance of *Tm-2* and *Tm-2²* genes. With the infectious clone, we inoculated Enate, Palamós, Marglobe and Fimande tomato varieties, which are homozygous, heterozygous or not containing (last two), respectively, the resistance gene *Tm-2²*. Infectivity and symptoms in each of the varieties were determined. The results showed that the Spanish isolated of ToMV characterized in this work is not able to overcome the resistance of *Tm-2²* gene when present in homozygosity or heterozygosity.

Key words: virus, tomato, resistance, tobamovirus, ToMV, infectious clone

Índice

1. Introducción	1
1.1. Historia	1
1.2. Tobamovirus.....	2
1.3. ToMV	5
1.4. Genes de resistencia en tomate.....	8
2. Objetivo	10
3. Materiales y métodos	11
3.1 Materiales	11
3.1.1 Material vegetal	11
3.1.2. Material bacteriano.....	11
3.1.3. Plásmidos	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Extracción de RNA bicatenario viral y purificación mediante cromatografía de celulosa CF11.....	11
3.2.1.1. Extracción	11
3.2.1.2. Cromatografía de celulosa	11
3.2.2. Transcripción inversa (RT).....	12
3.2.3. PCR con DNA polimerasa Phusion.....	12
3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa	12
3.2.5. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa.....	13
3.2.6. Digestión de DNA con enzimas de restricción	13
3.2.7. Ligación de DNA	13
3.2.8. Ensamblaje Gibson	13
3.2.9. Purificación de ácidos nucleicos.....	13
3.2.10. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α mediante electroporación y crecimiento de las colonias aisladas en medio de cultivo líquido.....	14
3.2.11. Extracción rápida de plásmidos para análisis electroforético y miniprep	14
3.2.12. Cuantificación y secuenciación del DNA	14
3.2.13. Inoculación mecánica de ToMV	15
3.2.14. ELISA	15

4. Resultados y discusión	16
4.1. Construcción de un clon infeccioso de la cepa Aramburu del ToMV	16
4.2. Secuenciación del clon infeccioso del ToMV y comparación de este con las cepas descubiertas hasta la fecha.....	18
4.3. Inoculación de diferentes variedades de tomate con ToMV-Ara y análisis de los síntomas	29
4.4. Análisis por ELISA de las plantas inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara	34
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	37

Introducción

1.1. Historia

El conocimiento de las enfermedades virales en plantas empezó a acuñarse a finales del siglo XIX, pero existen evidencias de que mucho antes ya se había trabajado con este tipo de patógenos. En 1576, en Inglaterra se escribió un tratado de botánica en el cual se mencionaba la aparición de nuevos patrones de coloración en hojas y pétalos, lo cual incrementaba el valor de las plantas entre coleccionistas. En 1884 el microbiólogo Charles Chamberland inventó el filtro Chamberland, el cual tenía un tamaño de poro menor que el de una bacteria, de manera que cuando este hacía pasar una disolución con bacterias, era capaz de recoger un filtrado libre de bacterias. Por otro lado, el biólogo Dimitri Ivanovski, utilizó este filtro para poder estudiar lo que actualmente se conoce como virus del mosaico del tabaco (TMV), aunque no fue capaz de demostrar que el agente causal de la infección, el cual persistía aunque filtrara las soluciones que posteriormente eran utilizadas para inocular las plantas, era un virus. En 1899, Martinus Beijerinck repitió los experimentos de Ivanovski y quedó convencido de que el agente causal de la infección era un virus. Observó que el virus solo se replicaba dentro de células vivas en división.

En 1935, el bioquímico y virólogo Wendell Stanley examinó el TVM y gracias a la microscopía electrónica descubrió que estaba compuesto principalmente por proteínas. El TVM fue uno de los primeros virus en ser cristalizados y por lo tanto, la primera nanoestructura que pudo ser vista con detalle (Bernal y Fankuchen, 1941). Los virus de plantas suelen causar grandes problemas en la producción agrícola, lo que traduce en grandes pérdidas económicas (Tabla 1) o problemas sociales. Estos últimos son más comunes en países en vía de desarrollo donde los recursos son muy escasos (Strange y Scott, 2005).

Tabla1. Pérdidas económicas producidas por diferentes virus de plantas. Adaptado de Prins y Goldbach (1996)

Cultivo	Virus	País	Perdidas/año
Arroz	Tungro	Sud este asiático	\$1,5 x 10 ⁹
	Ragged stunt	Sud este asiático	\$1,4 x 10 ⁵
	Hoja blanca	Sur y centro américa	\$9 x 10 ⁶
Cebada	Barley yellow dwarf	RU	£6 x 10 ⁶
Trigo	Barley yellow dwarf	RU	£5 x 10 ⁶
Patata	Potato leafroll	RU	£3 - 5 x 10 ⁷
	Potato virus Y		
	Potato virus X		
Remolacha azucarera	Beet yellows	RU	£5 - 50 x 10 ⁶
	Beet mild yellows		
Cítricos	Citrus tristeza	Todo el mundo	£9 - 24 x 10 ⁶
Cassava	African cassava mosaic	África	\$2 x 10 ⁹
Diferentes cultivos	Tomato spotted wilt	Todo el mundo	\$1 x 10 ⁹

En el caso particular del TMV, las pérdidas agronómicas dependen de una serie de condiciones como pueden ser la cepa del virus, la edad de la planta en el momento de la inoculación del agente viral, así como también de las condiciones de cultivo. En un estudio realizado en Ohio (EE UU), se observó que en plantas de tomate infectadas por TMV cultivadas en invernadero, las pérdidas producidas en el fruto eran de entre un 12-15% en comparación con plantas sanas. Por el contrario, en un estudio hecho en Reino Unido, estas pérdidas fueron del 23%. Estas pérdidas de productividad se traducen tanto en disminución del número como del tamaño de los frutos. Las pérdidas también están asociadas con la edad en la que la planta es infectada. Por ejemplo, en un estudio realizado en Michigan (EE UU), se comprobó que se produjo una pérdida del 54% en plantas que habían sido inoculadas momentos después del trasplante. Por otro lado, se obtuvo un 14% de pérdidas en plantas que habían sido inoculadas dos meses después del trasplante. En un estudio realizado en Florida (EE UU), la inoculación del virus en plantas dos semanas después del trasplante resultó en un 25-30% de pérdidas en la productividad. Estos estudios muestran como las condiciones afectan los perjuicios provocados por las infecciones víricas de las plantas (Arden et al., 1986).

1.2. Tobamovirus

David Baltimore, biólogo estadounidense y premio Nobel en 1975 por descubrir que el RNA puede ser transcrito a DNA (por la enzima transcriptasa reversa o retrotranscriptasa), diseñó el sistema de clasificación de los virus que se conoce como clasificación Baltimore. La clasificación Baltimore se basa en el mecanismo de producción de mRNA que sigue cada virus. Los virus deben generar mRNA a partir de su genoma para producir proteínas y replicarse, pero cada familia de virus utiliza mecanismos diferentes. El genoma de los virus puede ser monocatenario (ss) o bicatenario (ds), de RNA o DNA, puede utilizar o no la transcriptasa inversa (RT) y, además, los virus ssRNA pueden ser positivos (+) o negativos (-). En la Figura 1 se muestra la clasificación de los virus en 7 grupos distintos según el genoma que esté presente.

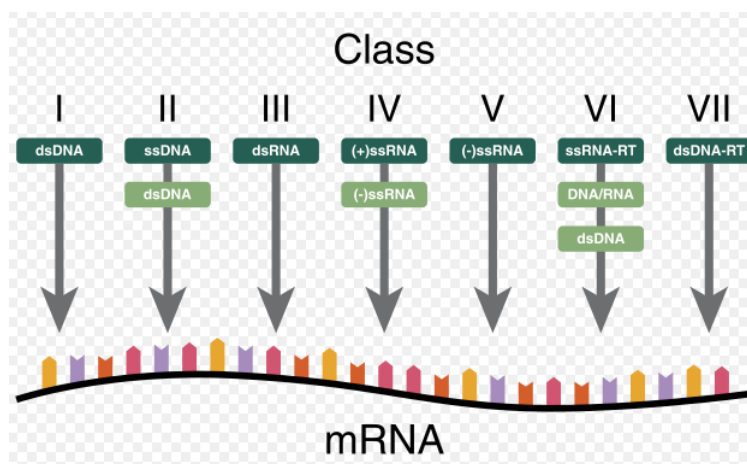


Figura 1. Clasificación de los virus según D. Baltimore

El virus del mosaico del tomate (ToMV), según la clasificación taxonómica moderna, es un virus de orden no asignado perteneciente a la familia *Virgaviridae* (Figura 2) y al género *Tobamovirus* (Figura 3), incluido en el grupo 4 de la clasificación de taxonomía viral propuesta por D. Baltimore.

Family: <i>Virgaviridae</i> (6 Genera) history	
Genus: <i>Furovirus</i>	(6 Species) history
Genus: <i>Hordeivirus</i>	(4 Species) history
Genus: <i>Pecluvirus</i>	(2 Species) history
Genus: <i>Pomovirus</i>	(4 Species) history
Genus: <i>Tobamovirus</i>	(35 Species) history

Figura 2. Diferentes géneros de la familia *Virgaviridae*. Tomado de ICTV Taxonomy

Genus: <i>Tobamovirus</i> (35 Species) history	
Species: <i>Bell pepper mottle virus</i>	history
Species: <i>Brugmansia mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Cactus mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Clitoria yellow mottle virus</i>	history
Species: <i>Cucumber fruit mottle mosaic virus</i>	history
Species: <i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	history
Species: <i>Cucumber mottle virus</i>	history
Species: <i>Frangipani mosaic virus</i>	history
Species: <i>Hibiscus latent Fort Pierce virus</i>	history
Species: <i>Hibiscus latent Singapore virus</i>	history
Species: <i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	history
Species: <i>Maracuja mosaic virus</i>	history
Species: <i>Obuda pepper virus</i>	history
Species: <i>Odontoglossum ringspot virus</i>	history
Species: <i>Paprika mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Passion fruit mosaic virus</i>	history
Species: <i>Pepper mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i>	history
Species: <i>Rehmannia mosaic virus</i>	history
Species: <i>Ribgrass mosaic virus</i>	history
Species: <i>Sammons's Opuntia virus</i>	history
Species: <i>Streptocarpus flower break virus</i>	history
Species: <i>Sunn-hemp mosaic virus</i>	history
Species: <i>Tobacco latent virus</i>	history
Species: <i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	history
★ Species: <i>Tobacco mosaic virus</i>	history
Species: <i>Tomato mosaic virus</i>	history
Species: <i>Tomato mottle mosaic virus</i>	history
Species: <i>Tropical soda apple mosaic virus</i>	history
Species: <i>Turnip vein-clearing virus</i>	history
Species: <i>Ullucus mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Wasabi mottle virus</i>	history
Species: <i>Yellow tailflower mild mottle virus</i>	history
Species: <i>Youcai mosaic virus</i>	history
Species: <i>Zucchini green mottle mosaic virus</i>	history

Figura 3. Especies pertenecientes al género *Tobamovirus*. Tomado de ICTV Taxonomy.

El ToMV fue considerado durante mucho tiempo como una cepa del TMV, pero desde 1976 está descrito como un virus distinto de este, pudiendo ser diferenciado por la gama de especies indicadoras, afinidades serológicas y secuencia del genoma viral. En la Figura 4 se puede observar la cercanía filogenética que ambos comparten (Gibbs, 1999).

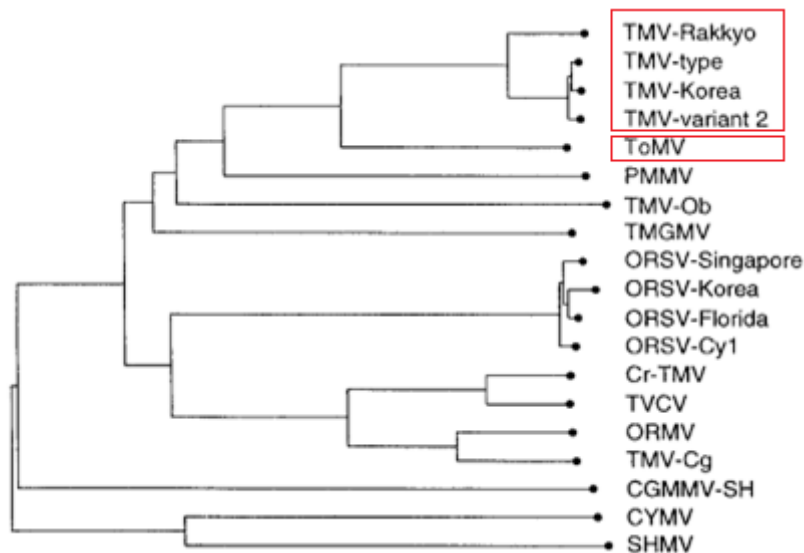


Figura 4. Árbol de distancias filogenéticas (neighbour-joining tree) calculado a partir de las diferencias nucleotídicas (excluyendo gaps) entre las replicasas de 19 tobamovirus (Gibbs, 1999).

En relación a la organización genómica de los tobamovirus, se caracterizan por tener una cápsida rígida y alargada de aproximadamente unos 18 nm y una longitud de unos 300 nm. Los capsómeros que la constituyen están compuestos de una única cadena polipeptídica de entre 17 y 18 kilodaltons (kDa), y se distribuyen helicoidalmente alrededor de una molécula de RNA lineal de polaridad positiva que contiene 4 fases de lectura abiertas (ORF) que codifican cuatro polipéptidos (Figura5). En el extremo 5' del genoma hay una estructura metilada o "cap" y secuencias no codificantes. En el extremo 3' también hay secuencias no codificantes.

La primera ORF codifica una proteína de 126 kDa la cual se traduce del RNA genómico y tiene motivos de secuencia de metiltransferasas y de helicasas. La segunda ORF codifica una proteína de 183 kDa y en combinación con la proteína de la ORF 1 forman parte del complejo de replicación viral (formando la RNA polimerasa RNA dependiente, RdRp), además de encontrarse también implicadas en la dispersión del virus a larga distancia (Gilardi, 2000).

Por otro lado, la tercera ORF codifica una proteína de aproximadamente unos 30 kDa implicada en el movimiento del virus de célula a célula, una proteína de movimiento (MP). Esta proteína se traduce a partir de un mensajero subgenómico 3' terminal con el RNA genómico. Este mRNA carece de estructura "cap" en su extremo 5'. La MP se localiza en las paredes celulares y es capaz de modificar el tamaño del poro de los plasmodesmos (Gilardi, 2000). Tiene un dominio de unión a ácidos nucleicos monocatenarios, lo que se ha interpretado como una función de modificar la estructura del RNA del virus, haciendo que tenga un menor volumen y así poder pasar por los plasmodesmos modificados (Citovsky et al., 1992).

La cuarta ORF codifica una proteína de 17.5 kDa la cual es la proteína de la cápside del virus. Esta proteína también es traducida a partir de un mensajero subgenómico y cumple una función estructural como proteína de cubierta del virus (CP). Es necesaria para el movimiento sistémico del virus, además, de ser el inductor de los genes de resistencia presentes en las plantas infectadas (Knorr y Dawson, 1988; Gilardi, 2000).

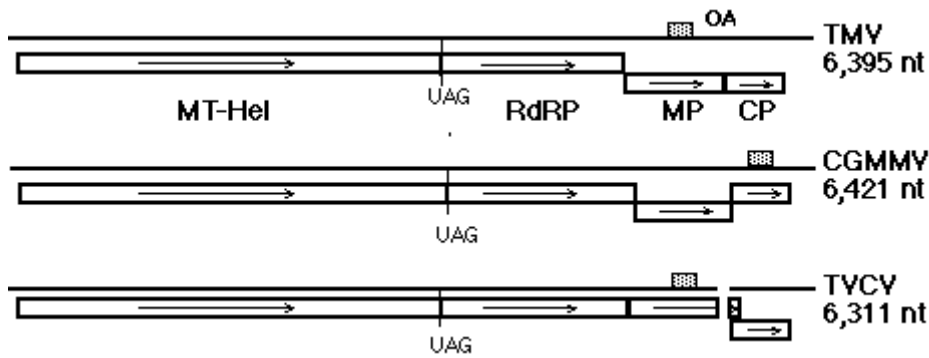


Figura 5. Esquema de la organización genómica de algunos tobamovirus. Tomado de Lartey et al., 1996.

1.3. ToMV

El ToMV es un virus perteneciente al género *Tobamovirus*, con un genoma monocatenario positivo de RNA (ssRNA). Este virus actualmente se encuentra disperso por todo el mundo (Figura 6).

tomato mosaic (Tomato mosaic virus)

Host plants / species affected

- Amaranthus retroflexus (redroot pigweed)
- Capsicum (peppers)
- Capsicum annuum (bell pepper)
- Capsicum frutescens (chilli)
- Chenopodium murale (nettleleaf goosefoot)
- Cornus florida (Flowering dogwood)
- Gomphrena globosa (Globe amaranth)
- Hibiscus rosa-sinensis (China-rose)
- Impatiens hawkeri
- Ixora casei
- Nicotiana tabacum (tobacco)
- Petunia
- Physalis (Groundcherry)
- Picea rubens (red spruce)
- Solanum lycopersicum (tomato)
- Solanum melongena (aubergine)
- Solanum tuberosum (potato)
- Sonchus oleraceus (common sowthistle)
- Syringa vulgaris (lilac)



Figura 6. Distribución del ToMV en el mundo y especies susceptibles de ser infectadas. Tomado de Plantwise Knowledge Bank.

ToMV infecta las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sistémicamente, causando el conocido síntoma del mosaico, el cual está caracterizado por la aparición de diferentes tonalidades de verde en ciertas regiones de la planta (He et al., 2012). El ToMV es un virus que dentro del género de los tobamovirus guarda una gran relación con el TMV, por lo que el ToMV ha sido también conocido como TMV cepa tomate (Valiente, 2003).



Figura 7. Fotografía de microscopio electrónico de una muestra de raíz de tomate infectada por el ToMV. La varilla del virus mide 200 nm (Pfleger, 1991).

Con relación a los síntomas, en los tejidos foliares se puede encontrar el conocido mosaico en las hojas superiores con distintas coloraciones de verde y amarillo (Figura 8). Los síntomas del mosaico, generalmente, van acompañados de otros síntomas como pueden ser deformaciones foliares, como por ejemplo curvatura de estas o hojas acampanadas (Fernández, 1969). En cuanto a los daños producidos en el fruto, se puede citar la necrosis de los tejidos internos, así como también reducción del tamaño y de la producción (Figura 9). Los frutos también pueden sufrir deformaciones (Pfleger et al. 1991; Rodríguez, et al. 1996; Dax et al., 1998). Las plantas infectadas por ToMV también suelen presentar un cierto retraso en el crecimiento.

Estos síntomas, como se ha comentado anteriormente, pueden variar dependiendo de diversos factores, entre ellos la cepa del virus, el cultivar de tomate, la intensidad de la luz, la temperatura, la edad de la planta en el momento de la infección, el contenido de nitrógeno en el suelo, etc.



Figura 8. Síntomas del ToMV en hojas (Aguado et al., 2014).



Figura 9. Síntomas del ToMV en fruto (Aguado et al., 2014).

En la Tabla 2 se muestran los daños que causa una infección del ToMV (TMV-L en la tabla) en las diferentes partes de la planta en comparación con un control. Las pérdidas asociadas con la infección aumentan cuando esta infección está provocada por dos virus a la vez, como es el caso del virus X de la patata (PVX). La altura de la planta infectada con ToMV se reduce aproximadamente en un 14% mientras que la infección combinada la reduce en un 48%, aproximadamente.

Tabla 2. Daños ocasionados en una planta de tomate debido a la coinfección por ToMV y PVX (Olusegun S. et al., 2002).

Treatment Combination	Height at harvest (cm)**	Number of leaves at harvest*	Stem girth (mm)**	Shoot weight (g)		Root weight (g)		Days to flowering (dpi)	Yield of edible fruits at 1st harvest***		
				Fresh	Dry	Fresh	Dry		Mean no. per plant	Mean wt. per plant (g)	Mean wt. of a fruit (g)
TMVL ₁₁ A alone	85.3 b	23 b	10.6 b	74.8 b	11.89 b	10.43 b	1.74 b	33.0 cd	2.3 a	334.8 ab	148.5 ab
TMV-L alone	70.3 c	16.3 cd	9.0 d	62.3 d	9.07 d	9.71 b	1.59 b	35.5 c	1.8 a	241.3 b	138.5 b
PVX alone	64.7 cd	17.8 c	9.4 cd	63.1 d	8.94 d	7.51 c	1.19 c	30.5 d	1.8 a	247.5 b	142.9 ab
TMV-L plus TMVL ₁₁ A	78.2 b	21.8 b	10.1 bc	69.2 c	10.43 c	9.94 b	1.60 b	32.3 d	1.8 a	244.0 b	141.4 b
PVX plus TMV-L	51.9 e	13.8 e	7.0 e	46.6 f	6.21 f	5.18 d	0.74 e	48.5 a	0.3 b	17.8 c	71.0 c
PVX before TMV-L	57.7 de	16 cd	7.6 e	49.8 ef	6.86 f	5.51 d	0.81 e	44.8 b	0.5 b	42.5 c	85.0 c
TMV-L before PVX	62.8 d	15.5 de	7.7 e	53.0 e	7.71 e	6.78 c	1.04 cd	45.5 b	0.3 b	20.5 c	82.0 c
PVX plus TMVL ₁₁ A	52.2 e	14.5 de	7.3 e	48.3 ef	6.46 f	6.83 c	1.02 d	47.0 ab	0.5 b	41.3 c	82.5 c
Healthy control	98.6 a	25.5 a	12.5 a	90.9 a	16.08 a	13.13 a	2.42 a	31.8 d	2.8 a	442.5 a	161.4 a

Means followed by the same letter(s) in the columns are not significantly different according to Tukey-Kramer's HSD test ($P=0.05$).

* Values are means of four plants at seven weeks after initial inoculations.

** Edible fruit (ripe tomato of any size) derived from the first round of flowering

Los tobamovirus pueden colonizar las células de la planta mediante dos mecanismos principalmente: heridas mecánicas, debidas por ejemplo a factores ambientales, o mediante vectores, como por ejemplo, insectos, ácaros, nematodos y hongos habitantes del suelo. Una vez se encuentre la partícula viral dentro de la célula, esta se desensamblará y utilizará las herramientas de replicación y traducción de la planta para poder proliferar.

Los virus de ssRNA, como es el caso del ToMV, poseen codificado en su genoma su propia RpRd, pero aun así, estos virus precisan de los mecanismos de transcripción y traducción de la propia planta para poder proliferar.

El primer paso una vez la partícula viral se encuentra en la célula infectada es realizar una copia de la hebra positiva (+) en una hebra negativa (-) y complementaria. La traducción y replicación del mismo molde es un proceso en el cual los ribosomas y la actividad de la RdRp deben estar regulados (Barry and Millar, 2002).

Durante el resultado del proceso de traducción del genoma viral se produce la síntesis de proteínas víricas como la CP, MP y replicasa. Durante la replicación se producen múltiples copias del genoma viral, las cuales serán utilizadas para lograr una infección sistémica de la planta hospedadora. Los virus utilizan la vía simplástica para establecer la infección sistémica en las plantas susceptibles. Sin embargo, en el hospedador existen otros factores proteicos como son los receptores codificados por genes de resistencia, la presencia de los cuales limitan el movimiento local y sistémico del virus cuando se produce una interacción denominada incompatible (Stange, 2006).

1.4. Genes de resistencia en tomate

El tomate es una de las plantas hortícolas más extendidas y más utilizadas en el mundo. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercialización. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada. Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa conocido como mecanismo de defensa de unión gen a gen. Este se basa en el reconocimiento entre los productos de un gen de resistencia (R) de la planta, y un gen de avirulencia (avr) del patógeno. Este reconocimiento puede desencadenar la respuesta hipersensible que induce la producción de especies químicas oxidantes, síntesis de callosa y lignina, aumento de los niveles de ácido salicílico, lo que limita el movimiento del patógeno por la planta (Stange, 2006).

Entre los genes de resistencia a ToMV en tomate destacan 3 genes principales *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2^α* o *Tm-2²*. De los tres, *Tm-2²* es el que confiere más resistencia para diferentes cepas de ToMV (Dilip et al., 2013). Además suele ser el más estudiado en programas de mejora vegetal.

El gen *Tm-1* ha sido heredado de *Lycopersicum hirsutum*. Las plantas portadoras de este gen no son afectadas por las razas más comunes del ToMV, aunque el virus sí que se puede hospedar y multiplicar en estas, pero de una forma más lenta en comparación con las plantas sensibles (Khush, 1964). Este gen está ubicado en el brazo corto del cromosoma 2, e induce resistencia más eficazmente cuando se presenta en forma homocigótica. La resistencia se expresa en los protoplastos (Watanabe, 1987).

Los genes *Tm-2* y *Tm-2²* han sido heredados de *Lycopersicon peruvianum* y son alélicos. Las plantas muestran respuesta hipersensible y permanecen libres del virus después de ser inoculadas, y sólo presentan lesiones necróticas en el punto de inoculación (Khush et al., 1964). *Tm-2* está localizado en el cromosoma 9, cerca del centrómero (Weber y Pfitzner, 1998). Estos genes son similares estructuralmente pero se pueden diferenciar respecto a la respuesta que cada uno produce frente a la infección. Se ha podido comprobar que este gen interfiere en la capacidad del virus para moverse en la planta (Motoyoshi y Oshima, 1977).

Con el intercambio de dos aminoácidos de la región carboxiterminal de la MP del TMV, se puede superar la resistencia a este gen. En la tabla 3 se observa la resistencia, susceptibilidad o tolerancia generada por los diferentes genes de resistencia para diferentes cepas de ToMV.

Tabla 3. Efecto de los genes de resistencia en diferentes cepas de ToMV. Tomado de Genetic improvement of

TMV strains	<i>Tm-1/</i> +	<i>Tm-1/</i> <i>Tm-1</i>	<i>Tm-2/</i> +	<i>Tm-2/</i> <i>Tm-2</i>	<i>Tm-2²/</i> +	<i>Tm-2²/</i> <i>Tm-2</i>	<i>Tm-1/+</i> <i>Tm-2/+</i>	<i>Tm-1/+</i> <i>Tm-2/Tm-2²</i>
0	T	T	R*	R	R*	R	R	R
OY	T	T	R*	R	R*	R	R	R
1	S	S	R*	R	R*	R	R*	R
2	T	T	S	S	R*	R	R	R
1.2	S	S	S	S	R*	R	S	R*

T = tolerance reaction, mild mosaic symptoms, little or no effect on growth.

S = normal susceptible reaction.

R = normal resistance reaction, no symptoms.

R* = resistance reaction, a systematic hypersensitive necrotic reaction which is deleterious may occur.

tomato.

El uso de marcadores moleculares facilita mucho la tarea de realizar programas de mejora, debido a que se puede comprobar de una manera rápida y relativamente simple si una variedad concreta presenta o no los genes de resistencia.

Objetivo

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar un aislado español de ToMV, aparentemente capaz de romper la resistencia de *Tm-2* y *Tm-2²*. En reconocimiento del virólogo que lo detectó (Dr. José Aramburu, IRTA, Cabrils, Barcelona), este aislado se ha nombrado ToMV-Ara.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Material vegetal

En los experimentos de infección viral se inocularon plantas de tomate (Enate, con el gen *Tm-2²* en homocigosis, Palamós, con el gen de resistencia *Tm-2²* en heterocigosis, Marglobe y Fimande sin resistencia al ToMV) de entre 23 y 26 días. Tras la inoculación, las plantas se crecieron en una cámara a 25°C con iluminación artificial mediante tubos fluorescentes y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

3.1.2. Material bacteriano

Para la clonación y construcción de los plásmidos se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli*.

3.1.3. Plásmidos

El genoma del ToMV-Ara se clonó en un plásmido binario derivado de pCLEAN-G181 (Thole et al., 2007). En este plásmido el RNA del virus se expresa mediante un promotor y un terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y su extremo 3' se produce por el corte de una ribozima derivada de la cadena negativa del virus δ de la hepatitis humana.

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción de RNA bicatenario viral y purificación mediante cromatografía de celulosa CF11

3.2.1.1. Extracción

En un vaso de precipitado se mezcló 40 ml de fenol saturado y neutralizado, 11.3 ml de H₂O, 2 ml de 1 M Tris-HCL (pH 9), 1.2 ml 10% SDS, 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8), 1.25 ml 2-mercaptoetanol. Se cortó el tejido (2.5 g) en trozos de aproximadamente 1 cm², se traspasaron al vaso y se homogenizó con un Polytron (Kinematica). El extracto se centrifugó 15 min a 8000 rpm. Posteriormente se recogió la fase acuosa y se añadió medio volumen de fenol saturado y neutralizado, se agitó y se volvió a centrifugar (15 min a 8000 rpm). Finalmente se recogió la fase acuosa.

3.2.1.2. Cromatografía de celulosa

Al extracto se añadió 1 ml de STE (x10) y 1.72 ml de etanol. A continuación se añadió 0.25 g de celulosa no iónica (CF11, Whatman) y se mantuvo en agitación durante 1 h. Posteriormente se centrifugó 3 min a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó tres veces la celulosa con 30 ml de 35% de etanol en STE. Posteriormente se eluyó 3 veces con 3.33 ml de STE y se descartaron los restos de celulosa. A continuación se centrifugó 5 min a 8000 rpm y se descartaron los restos de celulosa. Se añadieron 2.5 volúmenes (25ml) de etanol y se incubó 2 h a -20 °C. Finalmente se centrifugó 15 min a 8000 rpm, se lavó el sedimento con 70% de etanol y se resuspendió con agua hasta los 10 ml.

3.2.2. Transcripción inversa (RT)

La preparación de RNA se utilizó para obtener un cDNA con la transcriptasa inversa M-MuLV. Para ello en un tubo de Eppendorf de 0.2 ml se pipetearon 2 µl del RNA molde extraído anteriormente, 1 µl de cebador (D1876) y 3.5 µl de agua; se mezcló con el vortex y se incubó 1.5 min a 98°C y se dejó bajar la temperatura a 42°C. Se añadió 3.5 µl de la mezcla compuesta por 2 µl de tampón de RT (x5) (250 mM Tris-HCL, pH 8.3, 250mM KCL, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl de 10 mM dNTPs, 0.25 µl de inhibidor de RNasas (40 U/ µl) y 0.25 µl de la enzima M-MuLV RT (200 U/µl Thermo Scientific). Finalmente se incubó 45 min a 42°C, 10 min a 50°C y 5 min a 60°C.

3.2.3. PCR con DNA polimerasa Phusion

A partir del cDNA obtenido en la reacción de RT se realizaron dos amplificaciones por PCR del fragmento 3' del genoma viral y una del fragmento 5'. En la PCR el volumen de reacción final fue de 20 µl. En tubos Eppendorf de 0.2 ml se mezcló 1 µl de producto de la RT, 4 µl de tampón HF (x5) (Thermo Scientific), 0.6 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), 0.4 µl de 10 mM dNTPs, 0.4 µl de cada cebador (25 pmol/µl), 0.2 µl del enzima DNA polimerasa Phusion (2U/µl) (Thermo Scientific) y la cantidad de agua miliQ necesaria para alcanzar el volumen final. La reacción se incubó 30 s a 98°C, seguidos de 30 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C para productos menores a 1kpb. Para productos mayores se aplicó la regla de 15 s/1 kpb. Tras los 30 ciclos, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C. En general, para cada PCR se ajustaron el tiempo de extensión y el número de ciclos en función del producto a amplificar.

3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis en gel de agarosa 1% se realizaron para separar y analizar los fragmentos de DNA. Para preparar la agarosa se añadieron 4 g de esta a 40 ml de tampón TAE (x10) (TAE x1 es 40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7.2) y 360 ml de agua. La mezcla se calentó hasta disolver la agarosa y se mantuvo a 60°C. Se utilizaron minigeles (8 x 6.5 x 0.5 cm) o geles más grandes (15 x 11 x 0.5 cm), dependiendo del número de muestras. Los geles se preparan vertiendo 25 ml o 75 ml, respectivamente, de agarosa 1% sobre el soporte donde estaba el peine con el número de pocillos requerido, y dejando enfriar al menos 15 min. A continuación, se retiró el peine y se colocó el gel con su soporte en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos con la cantidad correspondiente del tampón de carga LB (x10) (50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.0025% azul de bromofenol y 0.0025% xilencianol).

En todas las electroforesis también se cargaron 10 µl del marcador de pesos moleculares de 1 kpb de Thermo Scientific. Tras la carga, los minigeles se corrieron 75 min a 60 V y los geles más grandes a 75 V durante 90 min.

Para la detección del DNA, el gel se colocó en una cubeta con 200 ml de agua y 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Tras 15 min en agitación, el gel se lavó tres veces con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio. El DNA se visualizó mediante irradiación con luz ultravioleta (UVITEC).

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

Para purificar DNA a partir de fragmentos de gel de agarosa se utilizó el kit DNA Clean & Concentration™-5 (Zymo Research). Los fragmentos del gel de agarosa que contenían el DNA de interés se cortaron, introdujeron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se pesaron.

A continuación se añadieron 3 volúmenes del tampón de disolución de agarosa (ADB) y se incubó 5-10 min a 55°C hasta disolver el gel. La mezcla se traspasó a una columna de gel de sílice situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 10 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Después se lavó la columna añadiendo 200 µl del tampón de lavado (WB), centrifugando 10 s a 13000 rpm. Se retiró el filtrado y se volvió a lavar la columna con 200 µl de WB. La columna se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y el DNA se eluyó con el volumen adecuado (según el caso) de tampón TEL (10 mM Tris-HCl pH 8.5), incubando 1 min a temperatura ambiente y centrifugando otro minuto a 13000 rpm.

3.2.6. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Para digerir DNA con enzimas de restricción, se añadió a un tubo Eppendorf de 0.5 ml la cantidad adecuada de DNA, 10 U (en general 1 µl) del enzima de restricción, el tampón adecuado y se incubó 1 h a la temperatura óptima de cada enzima.

3.2.7. Ligación de DNA

Todas las reacciones de ligación se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Para ello se añadieron las cantidades de DNA a ligar convenientes, 2 µl del tampón de la DNA ligasa T4 (x10; Thermo Scientific), 1 µl del enzima T4 DNA ligase (5 U) y agua hasta llegar a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó 1 h a 22°C.

3.2.8. Ensamblaje Gibson

Este método se utilizó para insertar fragmentos de DNA en un plásmido. Para construir plásmidos mediante ensamblaje Gibson, se amplificaron por PCR los diferentes DNA con los cebadores calculados por el programa NEBuilder (New England Biolabs). Los DNA's se separaron por electroforesis y se purificaron del gel. Se mezclaron en cantidades adecuadas en un volumen final de 5 µl, con un exceso molar de los insertos 2-3 veces superior al del plásmido. Se añadió un volumen de Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs) y se incubó 1 h a 50°C. Los productos de la reacción se purificaron mediante cromatografía en columnas de gel de sílice (Zymo Research) y se utilizaron para electroporar *E. coli* DH5α.

3.2.9. Purificación de ácidos nucleicos

Para realizar la purificación se utilizó el kit DNA Clean & Concentration™-5 (Zymo Research). Se añadieron 100 µl del tampón de unión (DBB) al DNA, y la mezcla se traspasó a una columna de gel de sílice situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó 10 s a velocidad máxima, se retiró el filtrado y la columna se lavó dos veces con 200 µl de WB, primero centrifugando 10 s y después 30 s. Cuando el DNA purificado se destinó a electroporar bacterias, se realizó un lavado adicional con 200 µl de etanol al 80%, centrifugando 30 s. Finalmente, la columna se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y, para eluir el DNA, se añadió el volumen deseado de TEL. En el caso de las electroporaciones, se añadió 8 µl de TEL diluido (x0.1). Se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se recogió el eluido.

3.2.10. Transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación y crecimiento de las colonias aisladas en medio de cultivo líquido

Se mezclaron 8 μ l de los productos de las ligaciones o distintas cantidades de los plásmidos purificados con 40 μ l de células competentes (recogidas a densidad óptica a 600 nm [DO₆₀₀] de 0.6 y resuspendidas en 10% glicerol) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. La mezcla se traspasó a una cubeta de 0.1 cm enfriada en hielo y se procedió a electroporar con un electroporador ECM399 (BTX) con una descarga de 5 ms a 1500 V. Rápidamente, se añadió 1 ml de SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa, pH 7.0). Las células se recogieron con una pipeta y se volvieron a traspasar al tubo Eppendorf para dejarlas recuperando en agitación durante 1 h a 37°C.

A partir de los cultivos en placa, se seleccionaron colonias aisladas con las características deseadas y se cultivaron en 3 ml de LB líquido con el antibiótico adecuado (ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 μ g/ml. En el caso de *E. coli*, las células se incubaron en agitación toda la noche a 37°C.

3.2.11. Extracción rápida de plásmidos para análisis electroforético y miniprep

Se llenó un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 0.5 ml del cultivo saturado y se centrifugó 2 min a 13000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 30 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), agitando con el vortex. A continuación se añadieron 30 μ l de fenol:cloroformo (1:1, saturado en tampón Tris-HCl pH 8.0), se mezcló bien con el vortex y se centrifugó 5 min a 13000 rpm. Finalmente, se tomaron 5 μ l de la fase acuosa, a los que se añaden 5 μ l de tampón de carga con RNasa. La mezcla se cargó en un gel de agarosa para su análisis electroforético.

Para la purificación de plásmidos se utilizó el kit comercial Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Se llenaron tubos Eppendorf de 2 ml con cultivos saturados de *E. coli*, se centrifugó 2 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendió el sedimento en 250 μ l de tampón CRA (solución de resuspensión celular) mezclando con vortex. Se añadieron 250 μ l de CLA (solución de lisis celular) y 10 μ l de APS (solución proteasa alcalina), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 350 μ l de NBS (solución de neutralización), se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 13000 rpm. Una vez centrifugado, el sobrenadante se transfirió a una columna de gel de sílice situada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml.

Se centrifugó 30 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Seguidamente, la columna se lavó dos veces con 750 μ l y 250 μ l de CWA (solución de lavado) centrifugando 30 s y 1 min, respectivamente, a 13000 rpm. Finalmente, se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 80 μ l de agua libre de nucleasas y, tras incubación 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 2 min a 13000 rpm para recoger el eluido.

3.2.12. Cuantificación y secuenciación del DNA

Antes de secuenciar el DNA se midió la concentración de este mediante una medida espectrofotométrica utilizando un NanoDrop ND-1000. Una vez cuantificado, se procedió a

secuenciar el DNA. Para ello se utilizó el servicio de secuenciación del IBMCP que dispone de un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Las muestras se proporcionaron como alícuotas de 5 µl, a concentración de al menos 100 ng/µl. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las de la base de datos de secuencia del NCBI. Mediante el programa ClustalW se alinearon las secuencias para detectar posibles mutaciones.

3.2.13. Inoculación mecánica de ToMV

Para inocular plantas con ToMV, se trituró tejido infectado por el virus en mortero con nitrógeno líquido y se añadieron 10 volúmenes del tampón TI (50 mM de fosfato potásico pH 8.0, 1% PVP-10, 1% PEG-6000, 10 mM 2-mercaptoetanol). La mezcla se mantuvo siempre en hielo. Se preparó carborundo al 10% en el mismo tampón. La inoculación se realizó pipeteando primero 5 µl de la solución de 10% carborundo sobre el haz de la hoja a inocular y, después, restregando suavemente sobre la hoja un bastoncillo higiénico empapado en el extracto sin clarificar. Diferentes variedades de plantas de tomate (Enate, Palamós, Marglobe y Fimande) se inocularon con dos cepas diferentes de ToMV (cepa 0 y cepa Aramburu).

3.2.14. ELISA

La técnica analítica DAS-ELISA (double antibody sandwich, enzyme linked immunosorbent assay) se basa en la detección de la proteína de la cápsida del virus mediante la utilización de anticuerpos específicos. Para realizar este análisis se tapizó una placa de poliestireno de 96 pocillos colocando en cada pocillo 200 µl de tampón de recubrimiento (0.05 M carbonato sódico, pH 9.6) que contenía 1 µl/ml de anticuerpo y se incubó durante 2 h a 37°C. A continuación, se realizaron cuatro lavados con PBS-T (0.14 M NaCl; 1 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 2.5 mM KCl y 0.05% Tween 20). En cada pocillo se aplicaron 200 µl del extracto homogeneizado y se dejó durante otras 2 h a 37°C. El extracto se preparó con muestras de hojas apicales de cada planta homogeneizadas en tampón fosfato. A continuación, se realizaron otros cuatro lavados, se añadió 1 µl/ml del anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en tampón PBS-T más 1% de polivinilpirrolidona (PVP) incubándolo 2 h a 37°C y, seguidamente, se realizaron otros cuatro lavados con PBS-T. Para el revelado se añadieron 0.2 mg/pocillo de 4-nitrofenil-fosfato en tampón sustrato (0.1 M dietanolamina y 0.02 % azida de sodio, pH 9.6) y la placa se incubó 30 min a 37°C para facilitar el desarrollo del color.

La reacción serológica se analizó mediante lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un fotómetro Titertek multiscan MCC/340. Se consideraron muestras positivas (infectadas con TSWV) aquellas cuyos valores medios de absorbancia fueron iguales o superiores al triple de la absorbancia media de los controles negativos (plantas no inoculadas).

4. Resultados y discusión

4.1. Construcción de un clon infeccioso de la cepa Aramburu del ToMV

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el aislado Aramburu del ToMV. Para ello, a partir del RNA viral extraído de plantas infectadas se construyó un clon infeccioso amplificándose el genoma en dos fragmentos (ToMV I y ToMV II) mediante RT-PCR y ensamblándolos en un plásmido binario. En la Figura 10A se muestra la electroforesis preparativa a partir de la cual se purificó el vector (pG35tZ) digerido con BsaI. En la Figura 10B aparecen los dos cDNAs resultado de amplificar el genoma viral en dos fragmentos. Los cebadores utilizados en estas amplificaciones están en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los dos fragmentos del genoma viral. Se incluye también cebador de la RT.

Fragmento	Cebadores
RT	D1876: 5' -TGGGCCCAACCGGGGTTCCG-3'
ToMV I	D1877: 5' -GAAGTTCATTTCATTGGAGAGGGTATTTTACAACAATTACC-3' D1878: 5' -CTTGACCTCATGTACAGTATGGACATCTG-3'
ToMV II	D1879: 5' -CTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCG-3' D1880: 5' -GGAGATGCCATGCCGACCCTGGGCCCAACCGG-3'

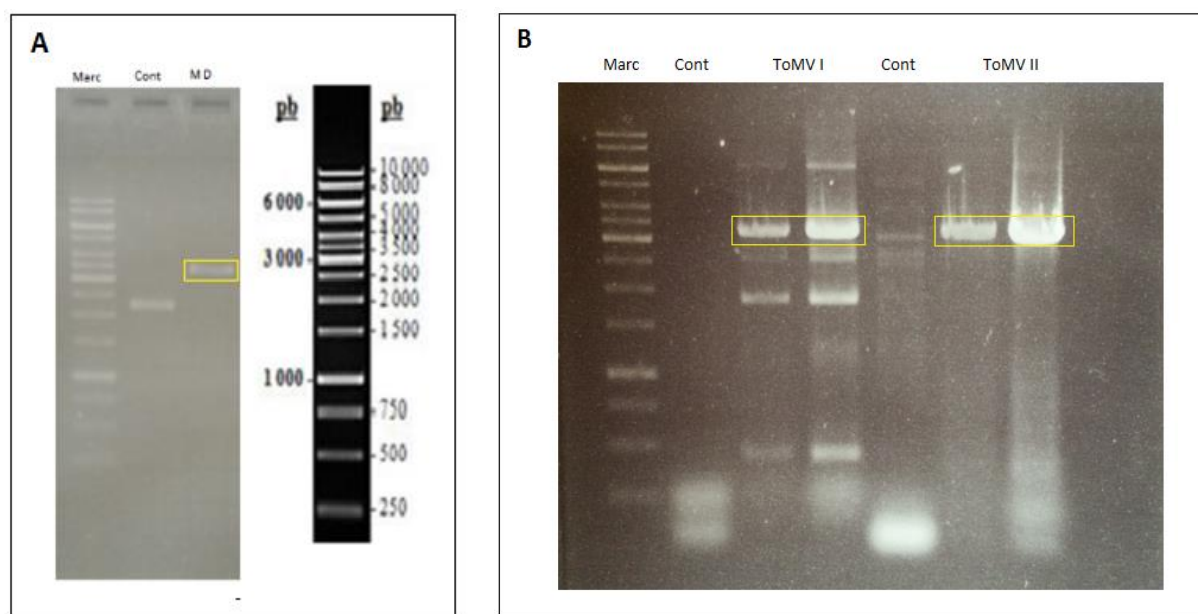


Figura 10. Construcción de un clon infeccioso del ToMV. (A) Electroforesis en gel de agarosa en el que se muestra (de izquierda a derecha) el marcador de pesos moleculares de 1 kpb (ver esquema de la derecha), el plásmido pG35tZ sin digerir y digerido con BsaI. (B) Electroforesis en gel de agarosa con los dos productos (ToMV I y ToMV II) de amplificación por RT-PCR del genoma del ToMV. Se incluyen controles de RT-PCR y el marcador de pesos moleculares.

Se realizó la electroporación con el producto de la reacción de ensamblaje y se seleccionaron bacterias transformadas en placas con kanamicina. Se picaron colonias y se realizó una extracción rápida de plásmidos (Figura 11).

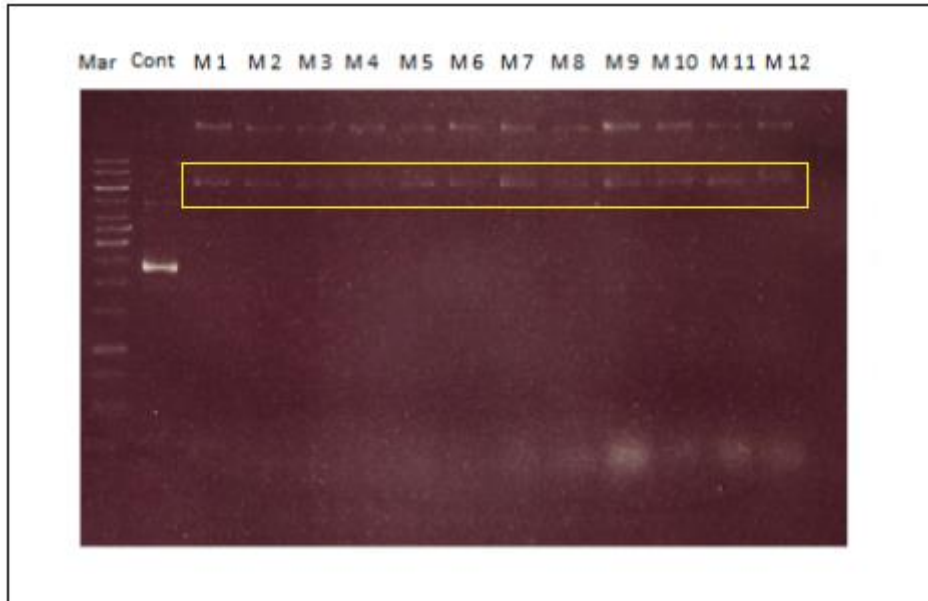


Figura 11. Análisis de plásmidos que contienen el cDNA del ToMV-Ara. Mar, marcador de pesos moleculares (ver esquema en Figura 10A); Cont, control correspondiente al vector de clonación vacío; M1 a M12, plásmidos purificados de 12 colonias distintas.

Una vez analizados los clones, se purificaron los plásmidos de los cultivos M2, M8, M9, M10, M11 y M12, que se seleccionaron arbitrariamente, pues todos los plásmidos presentaban un tamaño óptimo. Los plásmidos seleccionados se analizaron en un gel de agarosa (Figura 12).



Figura 12. Análisis de plásmidos con un cDNA del ToMV-Ara mediante electroforesis en gel de agarosa. Mar, marcador de pesos moleculares (ver esquema en Figura 10A); Cont, control correspondiente al vector de clonación vacío; M2, M8, M9, M10, M11 y M12, plásmidos purificados de los distintos cultivos.

Todos los plásmidos mostraron el mismo comportamiento electroforético. Para continuar el análisis, se escogieron el 10 y el 11 por estar más concentrados. Con estos plásmidos se transformó *Agrobacterium tumefaciens* y se seleccionaron colonias en placas con rifampicina, tetraciclina y kanamicina. Los clones recombinantes de *A. tumefaciens* se crecieron en medio líquido y los cultivos se utilizaron para agroinocular plantas de *N. benthamiana*. Varios días tras la inoculación, las plantas agroinoculadas con el clon 10 mostraron síntomas de la infección. Las plantas agroinoculadas con el clon 11 nunca llegaron a mostrar síntomas. Estos resultados indican que el plásmido correspondiente al clon 10, al que en lo sucesivo se llamará pGToMV-Ara, contiene un clon infeccioso del aislado Aramburu del ToMV. Por alguna razón, que no se siguió investigando, el plásmido 11 no contiene un clon infeccioso.

4.2 Secuenciación del clon infeccioso del ToMV y comparación de éste con las variantes de secuencia descritas hasta la fecha

Para conocer la secuencia de nucleótidos del aislado Aramburu del ToMV, se procedió a realizar toda una serie de reacciones de secuenciación utilizando como molde pGToMV-Ara, con los cebadores que se especifican en la Tabla 5. El genoma del virus se dividió en siete bloques que se fueron secuenciando en ambos sentidos con parejas de cebadores.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la secuenciación de ToMV-Ara.

Bloque	Cebador
1	D1958: 5' -GTATGTTTGCAAACTTACTTC-3'
	D1959: 5' -GAAGTAAGTTTTGCAAACATAC-3'
2	D1960: 5' -CTTTAGAAGTCGATCCAATGAC-3'
	D1961: 5' -GTCATTGGATCGACTTCTAAAG-3'
3	D1962: 5' -GATTCATTTTTGATGAATTACG-3'
	D1963: 5' -CGTAATTCATCAAAAATGAATC-3'
4	D1964: 5' -CTCCGAAAGATGTCAAACCAAC-3'
	D1965: 5' -GTTGGTTTGACATCTTTCGGAG-3'
5	D1966: 5' -GATATACAACAAGCTGCTAATC-3'
	D1967: 5' -GATTAGCAGCTTGTGTATATC-3'
6	D1968: 5' -CCCATGGAACCTTCAGAAGAAG-3'
	D1969: 5' -CTTCTTCTGAAAGTCCATGGG-3'
7	RF547: 5' -ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3'
	D1026: 5' -CTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGAA-3'

Una vez determinada la secuencia de cada bloque se ensambló la secuencia experimental del ToMV-Ara, que se muestra en la Figura 13. Esta secuencia se contrastó con la variante de secuencia de referencia del ToMV en el GenBank (NC_002692.1). El alineamiento se muestra en la Figura 14. En verde se indican los cambios de ToMV-Ara con respecto a la secuencia de referencia.

GTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATTCCTACAACACTACA
ATGGCATAACACAAAACAGCCACATCTTCCGCTTTGCTTGAGACCGTCCGAGGTAACAATACCTTGGTCA
ACGATCTTGCAAAGCGGCTCTATATGACACAGCGGTCGATGAATTTAATGCTAGGGACCGCAGGCCTAA
AGTCAATTTTTCCAAAAGTAGTAAGCGAAGAACAGACGCTTATTGCAACCAAAGCCTACCCAGAATTCCAA
ATTACATTCCTACAACACGCAGAACGCTGTGCATTCCTTGCAGGCGGTCTCCGATCATTAGAATTGGAAT
ATCTGATGATGCAAATTCCTACGGATCATTTGACATATGATATCGGAGGTAATTTTGCATCTCATCTGTT
CAAAGGGCGAGCATAACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCTGGATGTCCGCGACATAATGCGGCACGAGGGC
CAAAAGGACAGTATTGAACTATACCTTTCTAGGCTCGAGAGGGGCAACAAACACGTCCCAAACCTTCCAAA
AGGAAGCTTTTCGACAGATACGCTGAAATGCCAAACGAAGTAGTCTGTCCAGTACTTTCCAAACGTGTAG
GCATTCCTCAAGAATGTTACACGGGAAGAGTGTATGCTATTGCTTTGCATAGTATATACGATATACCTGCC
GACGAGTTCGGCGCGGCACTGCTGAGAAAAGATGTACATGTATGTTATGCCGCTTTCCACTTTTCCGAGA
ATTTACTTCTCGAAGATTACACGTCACCTCGATGAGATCAATGCATGTTTCCAAAGAGATGGAGACAG
GTTGACTTTTTCTTTCATCTGAGAGTACTCTTAATTATAGTCATAGTTATTCTAATATTCTTAAGTAT
GTTTGCAAAACTTACTTCCAGCTCTAATAGAGAGGTTTACATGAAGGAGTTTTTAGTAAGTACTAGAGTTA
ATACTTGGTTTTGTAAATTTTCTAGAATAGATACTTTCTTATTGTACAAAGGTGTAGCGCATAAGGGTGT
AGATAGTGAGCAGTTTTTACAAGGCTATGGAAGACGCATGGCACTACAAAAAGACTCTTGCATGTGCAAC
AGTGAAGAAGTCTTGTAGAGGATTTCTCATCAGTTAATTACTGGTTTTCCAAAAATGAGGGATATGGTGA
TAGTTCCACTATTTGACATATCTCTCGAGACTAGTAAAAGAACACGCAAGGAGGCTTTAGTTTTCAAAGGA
CTTTGTTTTATACAGTGTAAATCACATTCGTACGTACCAGGCCAAAGCGCTTACTTACTCCAACGTGTTA
TCTTTCGTCGAATCAATTCGTTTCGAGAGTGATCATTAACGGGGTTACTGCTAGGTCTGAGTGGGATGTCCG
ATAAATCATTATTACAGTCTTGTGATGACGTTCTTCTACATAACCAAGCTTCCGCTTCTGAAAGACGA
TCTTTTGATTAGCAAGTTTGCATTTGGTCCAAAAACTGTCTCACAACATGTGTGGGATGAGATTTCCCTA
GCTTTCCGCAATGCTTTCCCATCGGTCAAGGAAAGATTAATAAACCGGAAACTGATCAAAATTACGGAGA
ATGCGTTAGAGATCAGGGTGCCGATCTTTATGTCACTTTCCATGATAGGTTAGTTTTCTGAGTACAAAAT
GTCAGTGGACATGCCGCTGTAGACATTAGGAAAAGGATGGAAGAACTGAGGAAATGTACAATGCCTG
TCCGAACTGTCTGTACTTAAAAATTCAGACAAGTTCGATGTTGATGTTTTTTCCAGATGTGCCAATCTT
TAGAAGTCGATCCAATGACTGCAGCAAAGGTAATAGTAGCAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCT
CACGTTTGAACAGCCCACCGAAGCTAATGTTGCGCTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGGG
GCGTTGGTAGTTACCTCAAGAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAGGGTTCGATGGCCCGTGGTGGATTAC
AATTGGCCGATTATCTGGCGACGTTCTGAATCTTCATACACTAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTCTCGA
GCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTTCGTTAATTCATAAGCAGATGTGTTTCGATCGTGTACACGGGCCCT
CTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTATAGACAGCCTGGTAGCCTCGCTCTCTGCTGCGGTGTGCAATC
TAGTGAAGATCCTAAAAGATACAGCTGCGATTGACCTTGAACCTCGTCAAAGTTCCGGAGTTCTGGATGT
TGCTTCAAAAAGGTGGCTAGTTAAACCATCCGCAAAGAACCATGCATGGGGGGTGTGTTGAGACTCATGCC
AGGAAAATACACGTCGCATTAAGTGGAGCAGATGAATTTGGCATTATTACGTGCGATAACTGGCGACGGG
TGGCTGTGAGTTCAGAGTCGGTAGTATATCTGATATGGCTAAACTCAGGACTCTGAGAAGATTGCTTAA
AGATGGAGAACCACACGTTAGTTTCAGCAAAGGTGGTTTTTGGTGGATGGCGTTCCAGGGTGCGGGAAAACA
AAGGAAATTTCTTCAAGAGTTAATTTTGAAGAAGATCTAATTTCTTGTCCCTGGTTCGTCGCAAGCTGCCGAGA
TGATCAGAAGAAGAGCTAATGCGTCCGGCATAATAGTGGCTACAAAGGATAATGTGCGCACCGTTCGATTC
ATTTTTGATGAATTACGGGAAAAGGGCAGCTGTCAGTTCAAAGGATTGTTTCATAGACGAAGGTTTGATG
CTGCATACTGGTTGTGTGAATTTCTTGGTTGAAATGTCTCTGTGCGATATTGCATATGTTTATGGAGACA
CCCAACAAATTCGTACATCAACAGAGTAACTGGTTTTCCCGTACCCTGCACACTTTGCAAAATTTGGAGGT
CGACGAAGTCGAAACAAGAAGAACTACTTTCGTTGTCCGGCTGATGTACACACTTCCATAATCAAAGG
TACGAAGGACACGTAATGTGCACGCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCAGGAAATGGTTAGTGGGGCTG
CGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGGAAAATTTTGACTTTTACACAGTCTGACAAGGAGGC
CCTTCTCTCAAGGGGCTATGCAGATGTCCATACTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTA
TCGTTAGTTTCGACTAACACCTACGCCGTGATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGT
TGTC AAGACACACAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAGA
TTTGAACAGGTTAGTAGTTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTACTCAATAGCAATTACAG
GTCGACTCTGTGTTTTAAAAATTTCAATCTTTTTGTAGCAGCTCCAAAGACTGGAGATATATCTGATATGC
AATTTTACTATGATAAGTGTCTTCTGGGAACAGCACGTTGTTGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAA
ATTGACTGACATTTCTCTGAATGTCAAAGATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAA
GATGTCAAACCGACTTTAATACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGG

AAAATCTAGTTGCGATGATTAAAAGAAATTTTAATTCACCAGAGTTGTCGGAGTAGTTGATATTGAAAA
 TACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGGAAAAAAGAAAACCAAACAAA
 AATTTTTACTGTTTAGTAGAGAGTCTCTCGATAGGTGGATAGCAAAGCAAGAACAAGTCACAATTGGTC
 AGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATCTTCCAGCCGTTGATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACC
 GAAGCAGAAACTGGATCTGTCAATTCAGACAGAATATCCAGCGTTGCAAACGATTGTGTATCATTCAAAG
 AAAATCAACGCAATATTTGGTCTCTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTATTGACTCAA
 GCAGATTCTTGTCTTTACGAGAAAGACACCGGCTCAGATCGAAGATTTCTTCGGAGATCTAGACAGTCA
 TGTCCCAATGGACGTA CTGAGTTGGATATTTTGAAGTATGATAAGTCTCAAACGAGTTTCATTGTGCT
 GTT GAGTACGAAATCTGGAGGAGACTGGGTCTGGAGGATTTTTTAGCAGAAGTGTGGAACAAGGGCATA
 GGAAAACCACTCTGAAAAGATTACACTGCTGGTATAAAAACGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTGA
 TGTAACAACCTTTTATCGGTAATACCGTCATCATTGCTTCTGCTGCTTGCATCAATGCTCCCGATGGAAAAA
 TTGATAAAAAGGAGCCTTCTGCGGAGATGACAGTTTGTGTACTTTCCTAAGGGTTGTGAGTATCCCGATA
 TACAACAAGCTGCTAATCTAATGTGGAATTTTGAGGCCAAACTATTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCTG
 CGGGAGGTACGTGATTCATCACGATAGAGTTGCATAGTATACTACGACCCTTTGAAGCTGATTTGAAA
 CTTGGTGCTAAACACATCAAGGATTGGGATCATTGGAGGAGTTCAGAAGATCCCTCTGTGATGTTGCTG
 AGTCGTTGAACAATTTGTGCGTATTACACGCAATTGGACGACGCTGTTGGGGAGGTTTATAAAAACCGCCCC
 ACCTGGTTCGTTTGTATAAGAGTTTGTGTTAAGTATTTGTGTCAGATAAAGTTTTGTTTAGAAGTTTATTT
 CTTGATGGCTCTAGTTGTTAAAGGTAAGGTAATATTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCCGAGAAA
 CTTCTCCCGTCGATGTTTACGCCTGTAAAGAGTGTATGGTTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCATG
 AAAATGAATCATTGTCTGAAGTAAATCTCTTAAAAGGTGTAACCTTATAGAAGGTGGGTATGTTTGCTT
 AGTTGGTCTCGTTGTGTCGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAAATTGCCGTGGTGGTGTGAGTGTCTGCATG
 GTTGACAAGAGAATGGAAAAGAGCGGACGAAGCCACACTGGGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAAGC
 GGTTTCAGTTTAAAAGTGGTCCCAAATACGGTATTACAACAAAGGATGCAGAAAAGAACATATGGCAGGT
 CTTAGTAAATATTAATAAATGTAATAATGAGTGCAGGCTACTGCCCTTTGTGATTAGAATTTGTGTCTGTG
 TGTATTGTTTATAAAAAATAATATAAAATTTGGGTTGAGGAGAAAGTAACGAGTGTGAACGATGGAGGACCC
 ATGGAACCTTCAGAAGAAGTGTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCCGTTAGACTCGCAAAGT
 TTCGAACCAAATCCTCAAAAAGAGGTCCGAAAAATAATAATAATTTAGGTAAGGGCGTTTCCAGCGGAAG
 GCCTAAACCAAAAAGTTTGTGATGAAGTTGAAAAGAGTGTGATAAATTTGATTGAAGATGAAGCCGAGACG
 TCGGTGCGGATTTCTGATTCGTATTAAATATGTCCTTACTCAATCATTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTT
 GTCATCTGTATGGGCTGACCCTATAGAATTTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAGTTTCAA
 ACACAGCAAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCTTTCCCTCAGAGCACCG
 TCAGATTTCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCTCTAATTACTGCGTT
 GCTGGGGTCTTTGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACCAGCAGAATCCGACAACAGCTGAA
 ACGTTAGATGCTACCCGACGGGTAGACGACGCTACGGTTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTA
 ATGAACTAGTAAGAGGTA CTGGACTGTACAATCAAAATACTTTTGAAAGTATGTCTGGGTGGTCTGGAC
 CTCTGCACCTGCATCTTAAATGCATAGGTGCTGAAATATAAAGTTTGTGTTTCTAAAACACACGTGGTAC
 GTACGATAACGTATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAAGGTTAGTGTCTTGGAGCGCGGGAGTAA
 ACATATATGGTTCATATATGTCCGTAGCACGTAAAAAAGCGAGGGATTTCGAATTCCTCCCGGAACCCCGG
 GTTGGGGCCCA

Figura 13. Secuencia nucleotídica experimental del ToMV-Ara una vez ensamblados los diferentes segmentos

NC_002692.1 ToMV-Ara	GTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAATTACATTTTACATT GTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAATTACATTTTACATT *****
NC_002692.1 ToMV-Ara	CTACAAC TACAATGGCATAACACAAACAGCCACATCGTCCGCTTTGCTTGAGACCGTCC CTACAAC TACAATGGCATAACACAAACAGCCACATCTCCGCTTTGCTTGAGACCGTCC *****
NC_002692.1 ToMV-Ara	GAGGTAACAATACCTTGGTCAACGATCTTGCAAAGCGGCGTCTATATGACACAGCGGTAG GAGGTAACAATACCTTGGTCAACGATCTTGCAAAGCGGCGTCTATATGACACAGCGGTG *****
NC_002692.1 ToMV-Ara	ATGAATTTAATGCTAGGGACCGCAGGCTAAAGTCAATTTTTCCAAAGTAGTAAGCGAAG ATGAATTTAATGCTAGGGACCGCAGGCTAAAGTCAATTTTTCCAAAGTAGTAAGCGAAG *****
NC_002692.1 ToMV-Ara	AACAGACGCTTATTGCAACCAAAGCCTACCCAGAATTCCAAATACATTCTACAACACGC AACAGACGCTTATTGCAACCAAAGCCTACCCAGAATTCCAAATACATTCTACAACACGC *****

NC_002692.1 AGAATGCTGTGCATTCCCTTGCAAGGCGGTCTCCGATCATTAGAATTGGAATATCTGATGA
ToMV-Ara AGAA GCTGTGCATTC CTGCAAGGCGGTCTCCGATCATTAGAATTGGAATATCTGATGA

NC_002692.1 TGCAAATTCCTACGGATCATTGACATATGATATCGGAGGTAATTTTGCATCTCATCTGT
ToMV-Ara TGCAAATTCCTACGGATCATTGACATATGATATCGGAGGTAATTTTGCATCTCATCTGT

NC_002692.1 TCAAAGGCGAGCATACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCTAGATGTCCGCGACATAATGC
ToMV-Ara TCAAAGGCGAGCATACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCT GATGTCCGCGACATAATGC

NC_002692.1 GGCACGAGGGCCAAAAGGACAGTATTGAACTATACCTTTCTAGGCTCGAGAGGGGCAACA
ToMV-Ara GGCACGAGGGCCAAAAGGACAGTATTGAACTATACCTTTCTAGGCTCGAGAGGGGCAACA

NC_002692.1 AACATGTCCCAAACCTCCAAAAGGAAGCTTTCGACAGATACGCTGAAATGCCAAACGAAG
ToMV-Ara AACAGTCCCAAACCTCCAAAAGGAAGCTTTCGACAGATACGCTGAAATGCCAAACGAAG

NC_002692.1 TAGTCTGTACGATACTTTCCAACGTTAGGCATTCTCAAGAATGTTACACGGGAAGAG
ToMV-Ara TAGTCTGTACGATACTTTCCAACGTTAGGCATTCTCAAGAATGTTACACGGGAAGAG

NC_002692.1 TGTATGCTATTGCTTTGCATAGTATATACGATATACCTGCCGACGAGTTCGGCGCGGCAC
ToMV-Ara TGTATGCTATTGCTTTGCATAGTATATACGATATACCTGCCGACGAGTTCGGCGCGGCAC

NC_002692.1 TGCTGAGAAAGAATGTACATGTATGTTATGCCGCTTCCACTTTCCGAGAATTTACTTC
ToMV-Ara TGCTGAGAAAGAATGTACATGTATGTTATGCCGCTTCCACTTTCCGAGAATTTACTTC

NC_002692.1 TCGAAGATTCACACGTCACCTCGATGAGATCAATGCATGTTTCCAAAGAGATGGAGACA
ToMV-Ara TCGAAGATTCACACGTCACCTCGATGAGATCAATGCATGTTTCCAAAGAGATGGAGACA

NC_002692.1 GGTTGACTTTTCCCTTTCATCTGAGAGTACTCTTAATTATAGTCATAGTTATTCTAATA
ToMV-Ara GGTTGACTTTTCCCTTTCATCTGAGAGTACTCTTAATTATAGTCATAGTTATTCTAATA

NC_002692.1 TTCTTAAGTATGTTTGCAAAACCTTACTTCCAGCCTCTAATAGAGAGGTTTACATGAAGG
ToMV-Ara TTCTTAAGTATGTTTGCAAAACCTTACTTCCAGCCTCTAATAGAGAGGTTTACATGAAGG

NC_002692.1 AGTTTTAGTAAGTAGAGTTAATACCTGGTTTTGTAAATTTTCTAGAATAGATACTTTCT
ToMV-Ara AGTTTTAGTAAGTAGAGTTAATACCTGGTTTTGTAAATTTTCTAGAATAGATACTTTCT

NC_002692.1 TATTGTACAAAGGTGTAGCGCATAAAGGGTGTAGATAGTGAAGCAGTTTACAAGGCTATGG
ToMV-Ara TATTGTACAAAGGTGTAGCGCATAAAGGGTGTAGATAGTGAAGCAGTTTACAAGGCTATGG

NC_002692.1 AAGACGCATGGCACTACAAAAGACTCTTGCATGTGCAACAGTAAAAGAATCTTGTAG
ToMV-Ara AAGACGCATGGCACTACAAAAGACTCTTGCATGTGCAACAGTAAAAGAATCTTGTAG

NC_002692.1 AGGATTCATCAGTTAATTAAGTGGTTTTCCAAAATGAGGATATGGTGATAGTTCCAC
ToMV-Ara AGGATTCATCAGTTAATTAAGTGGTTTTCCAAAATGAGGATATGGTGATAGTTCCAC

NC_002692.1 TATTTGACATATCTCTCGAGACTAGTAAAAGAACACGCAAGAGGCTTTAGTTTCAAAGG
ToMV-Ara TATTTGACATATCTCTCGAGACTAGTAAAAGAACACGCAAGAGGCTTTAGTTTCAAAGG

NC_002692.1 ACTTTGTTTATACAGTGTAAATCACATTCGTACGTACCAGGCCAAAGCGCTTACTTACT
ToMV-Ara ACTTTGTTTATACAGTGTAAATCACATTCGTACGTACCAGGCCAAAGCGCTTACTTACT

NC_002692.1 CCAACGTGTTATCTTTCGTCGAATCAATTCGTTTCGAGAGTGATCATTAAACGGGGTACTG
ToMV-Ara CCAACGTGTTATCTTTCGTCGAATCAATTCGTTTCGAGAGTGATCATTAAACGGGGTACTG

NC_002692.1 CCAGGCTGAGTGGGATGTCGATAAATCATTATTACAGTCCCTTGTGATGACGTTCTTCC
ToMV-Ara CAGGCTGAGTGGGATGTCGATAAATCATTATTACAGTCCCTTGTGATGACGTTCTTCC
* AGGTTCTGAGTGGGATGTCGATAAATCATTATTACAGTCCCTTGTGATGACGTTCTTCC

NC_002692.1 TACATACCAAGCTTGCCGTTCTGAAAGACGATCTTTTGATTAGCAAGTTTGCCTTGGAC
ToMV-Ara TACATACCAAGCTTGCCGTTCTGAAAGACGATCTTTTGATTAGCAAGTTTGCCTTGGAC

NC_002692.1 CAAAACGTCTCACAAATGTGTGGGATGAGATTTCCCTAGCTTTCCGCAATGCTTTCC
ToMV-Ara CAAAACGTCTCACAAATGTGTGGGATGAGATTTCCCTAGCTTTCCGCAATGCTTTCC

NC_002692.1 CATCGATCAAGGAAAGATTGATAAACCAGAACTGATCAAAATTACGGAGAATGCGTTAG
ToMV-Ara CATCGATCAAGGAAAGATTGATAAACCAGAACTGATCAAAATTACGGAGAATGCGTTAG

NC_002692.1 AGATCAGGGTGCCGATCTTATGTCACTTTCCATGATAGGTTAGTTTCTGAGTACAAA
ToMV-Ara AGATCAGGGTGCCGATCTTATGTCACTTTCCATGATAGGTTAGTTTCTGAGTACAAA

NC_002692.1 TGTCAGTGACATGCCGGTGTAGACATAGGAAAAGATGGAAGAACTGAGGAAATGT
ToMV-Ara TGTCAGTGACATGCCGGTGTAGACATAGGAAAAGATGGAAGAACTGAGGAAATGT

NC_002692.1 ACAATGCACTGTCCGAACGTCTGTACTTAAAAATTCAGACAAGTTCGATGTTGATGTTT
ToMV-Ara ACAATGCACTGTCCGAACGTCTGTACTTAAAAATTCAGACAAGTTCGATGTTGATGTTT

NC_002692.1 TTTCCCAGATGTGCCAATCTTTAGAAGTTGATCCAATGACTGCAGCAAAGGTAATAGTAG
 ToMV-Ara TTTCCCAGATGTGCCAATCTTTAGAAGTGGATCCAATGACTGCAGCAAAGGTAATAGTAG

NC_002692.1 CAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGAACAGCCCACCGAAGCTAATG
 ToMV-Ara CAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGAACAGCCCACCGAAGCTAATG

NC_002692.1 TTGCGCTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGGGGCGTTGGTAGTTACCTCAA
 ToMV-Ara TTGCGCTAGCATTGCAAGATTCTGAAAAGGCTTCTGATGGGGCGTTGGTAGTTACCTCAA

NC_002692.1 GAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAGGGTTCGATGGCCCGTGGTGAGTTACAATTGGCCG
 ToMV-Ara GAGATGTTGAGGAACCGTCCATAAAGGGTTCGATGGCCCGTGGTGAGTTACAATTGGCCG

NC_002692.1 GATTATCTGGCGACGTTCTGAACTTTCATACACTAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTCTCG
 ToMV-Ara GATTATCTGGCGACGTTCTGAACTTTCATACACTAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTCTCG

NC_002692.1 AGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAAGCAGATGTGTTTCGATCGTGT
 ToMV-Ara AGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCGTTAATTCATAAGCAGATGTGTTTCGATCGTGT

NC_002692.1 ACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTATAGACAGCCTGGTAGCCTCGC
 ToMV-Ara ACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACTTTATAGACAGCCTGGTAGCCTCGC

NC_002692.1 TCTCTGCTGCGGTGTCGAATCTAGTGAAGATCCATAAAGATACAGCCCGATTGACCTTG
 ToMV-Ara TCTCTGCTGCGGTGTCGAATCTAGTGAAGATCCATAAAGATACAGCCCGATTGACCTTG

NC_002692.1 AAACCTCGTCAAAGTTCCGGAGTTCTGGATGTTGCTTCGAAAAGGTGGCTAGTTAAACCAT
 ToMV-Ara AAACCTCGTCAAAGTTCCGGAGTTCTGGATGTTGCTTCGAAAAGGTGGCTAGTTAAACCAT

NC_002692.1 CCGCAAAGAACCATGCATGGGGGTTGTTGAGACTCATGCGAGGAAATATCACGTCGCAT
 ToMV-Ara CCGCAAAGAACCATGCATGGGGGTTGTTGAGACTCATGCGAGGAAATATCACGTCGCAT

NC_002692.1 TACTGGAGCACGATGAATTTGGCATTATTACGTCGCATAACTGGCGACGGGTGGCTGTGA
 ToMV-Ara TACTGGAGCACGATGAATTTGGCATTATTACGTCGCATAACTGGCGACGGGTGGCTGTGA

NC_002692.1 GTTCTGAGTCGGTAGTATATTTCTGATATGGCTAAACTCAGGACTCTGAGAAGATTGCTCA
 ToMV-Ara GTTCTGAGTCGGTAGTATATTTCTGATATGGCTAAACTCAGGACTCTGAGAAGATTGCTCA

NC_002692.1 AAGATGGAGAACCACACGTTAGTTCAGCAAAGGTGGTTTTGGTGGATGGCGTTCAGGGT
 ToMV-Ara AAGATGGAGAACCACACGTTAGTTCAGCAAAGGTGGTTTTGGTGGATGGCGTTCAGGGT

NC_002692.1 GCGGGAAGACAAAGGAAATCTTTCGAGAGTTAATTCGAAGAAGATCTAATCTTGTCC
 ToMV-Ara GCGGGAAGACAAAGGAAATCTTTCGAGAGTTAATTCGAAGAAGATCTAATCTTGTCC

NC_002692.1 CTGGTCGTCGAGTCCGAGATGATCAGAAGAAGAGCTAATGCGTCGGGCATAAATAGTGG
 ToMV-Ara CTGGTCGTCGAGTCCGAGATGATCAGAAGAAGAGCTAATGCGTCGGGCATAAATAGTGG

NC_002692.1 CTACAAAGGATAATGTGCGCACCGTCGATTCATTTTTGATGAATTACGGGAAAGGGGCAC
 ToMV-Ara CTACAAAGGATAATGTGCGCACCGTCGATTCATTTTTGATGAATTACGGGAAAGGGGCAC

NC_002692.1 GCTGTCTGTTCAAAGATTGTTTCATAGACGAAGTTTGTGCTGCATACTGGTTGTGTGA
 ToMV-Ara GCTGTCTGTTCAAAGATTGTTTCATAGACGAAGTTTGTGCTGCATACTGGTTGTGTGA

NC_002692.1 ATTTCTTGGTTGAAATGTCTCTGTGCGATATTGCATATGTTTATGGAGACACCCAACAAA
 ToMV-Ara ATTTCTTGGTTGAAATGTCTCTGTGCGATATTGCATATGTTTATGGAGACACCCAACAAA

NC_002692.1 TTCCGTACATCAACAGAGTAACCTGGTTTCCCGTACCCTGCGCACTTTCGAAAATTGGAGG
 ToMV-Ara TTCCGTACATCAACAGAGTAACCTGGTTTCCCGTACCCTGCGCACTTTCGAAAATTGGAGG

NC_002692.1 TCGACGAAGTCGAAACAAGAAGAACTACTCTTCGCTGTCCGGCTGATGTCACACACTTCC
 ToMV-Ara TCGACGAAGTCGAAACAAGAAGAACTACTCTTCGCTGTCCGGCTGATGTCACACACTTCC

NC_002692.1 TAAATCAAAGGTATGAAGGACACGTAATGTGCACGCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCC
 ToMV-Ara TAAATCAAAGGTATGAAGGACACGTAATGTGCACGCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCC

NC_002692.1 AGGAAATGGTTAGTGGGGCTGCGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGAAAAA
 ToMV-Ara AGGAAATGGTTAGTGGGGCTGCGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGAAAAA

NC_002692.1 TTTTGACTTTCACACAGTCTGACAAGGAGGCCCTTCTCTCAAGGGGTACGCAGATGTCC
 ToMV-Ara TTTTGACTTTCACACAGTCTGACAAGGAGGCCCTTCTCTCAAGGGGTACGCAGATGTCC

NC_002692.1 ATACTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCGTTAGTTCGACTAACAC
 ToMV-Ara ATACTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCGTTAGTTCGACTAACAC

NC_002692.1 CTACGCCCTGTATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGTTGTCAAGAC
 ToMV-Ara CTACGCCCTGTATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGTTGTCAAGAC

NC_002692.1 ACACAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAG
 ToMV-Ara ACACAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAG

NC_002692.1 ATTTAGAACGGTTAGTAGTTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTACTCAAT
 ToMV-Ara ATTTAGAACGGTTAGTAGTTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTACTCAAT

NC_002692.1 AGCAATTACAGGTCGACTCTGTGTTTAAAAATTTCAATCTTTTGTAGCAGCTCCAAAGA
 ToMV-Ara AGCAATTACAGGTCGACTCTGTGTTTAAAAATTTCAATCTTTTGTAGCAGCTCCAAAGA

NC_002692.1 CTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCTTCTCGGGAACAGCACGT
 ToMV-Ara CTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCTTCTCGGGAACAGCACGT

NC_002692.1 TGTGGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAAATGACTGACATTTCTCTGAATGTCAAAG
 ToMV-Ara TGTGGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAAATGACTGACATTTCTCTGAATGTCAAAG

NC_002692.1 ATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGATGTCAAACCACTTTAA
 ToMV-Ara ATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGATGTCAAACCACTTTAA

NC_002692.1 TACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGGAAAATCTAG
 ToMV-Ara TACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGGAAAATCTAG

NC_002692.1 TTGCGATGATTAAGAAGAAATTTAATTCACCAGAGTTGCCGAGTAGTTGATATTGAAA
 ToMV-Ara TTGCGATGATTAAGAAGAAATTTAATTCACCAGAGTTGCCGAGTAGTTGATATTGAAA

NC_002692.1 ATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGGAAAAAGAA
 ToMV-Ara ATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGGAAAAAGAA

NC_002692.1 AACCAACAAAAATTTTCACTGTTTAGTAGAGAGTCTCTCAATAGGTGGATAGCAAAGC
 ToMV-Ara AACCAACAAAAATTTTCACTGTTTAGTAGAGAGTCTCTCAATAGGTGGATAGCAAAGC

NC_002692.1 AAGAACAAGTACAATTTGGTCAGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATCTCCAGCCGTTG
 ToMV-Ara AAGAACAAGTACAATTTGGTCAGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATCTCCAGCCGTTG

NC_002692.1 ATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGAAGCAGAACTGGATCTGTCAATTCAGA
 ToMV-Ara ATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGAAGCAGAACTGGATCTGTCAATTCAGA

NC_002692.1 CAGAATATCCAGCGTTGCAAACGATTTGTGTATCATTCAAAGAAAATCAACGCAATATTTG
 ToMV-Ara CAGAATATCCAGCGTTGCAAACGATTTGTGTATCATTCAAAGAAAATCAACGCAATATTTG

NC_002692.1 GTCCTCTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTATTGACTCAAGCAGATTCT
 ToMV-Ara GTCCTCTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTATTGACTCAAGCAGATTCT

NC_002692.1 TGTCTTTACGAGAAAGACACCGGCTCAGATCGAAGATTTCTTCGGAGATCTAGACAGTC
 ToMV-Ara TGTCTTTACGAGAAAGACACCGGCTCAGATCGAAGATTTCTTCGGAGATCTAGACAGTC

NC_002692.1 ATGTCCTCAATGGACGTTACTTGTGATGTTTTCGAAAGTATGATAAGTCTCAAAACGAGT
 ToMV-Ara ATGTCCTCAATGGACGTTACTTGTGATGTTTTCGAAAGTATGATAAGTCTCAAAACGAGT

NC_002692.1 TTCATTGTGCTGTTGAGTACGAAATCTGGAGGAGACTGGGCTCGGAGATTCTTGGCAG
 ToMV-Ara TTCATTGTGCTGTTGAGTACGAAATCTGGAGGAGACTGGGCTCGGAGATTCTTGGCAG

NC_002692.1 AAGTGTGGAACAAGGGCATAGAAAACCACCCTGAAAGATTACACTGCTGGTATAAAAA
 ToMV-Ara AAGTGTGGAACAAGGGCATAGAAAACCACCCTGAAAGATTACACTGCTGGTATAAAAA

NC_002692.1 CGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTATGTTACAACCTTTTATCGGTAATACCGTCA
 ToMV-Ara CGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTATGTTACAACCTTTTATCGGTAATACCGTCA

NC_002692.1 TCATTGCTTCGTGCTTTCATCAATGCTCCCGATGGAAAAATTGATAAAGGAGCCTTCT
 ToMV-Ara TCATTGCTTCGTGCTTTCATCAATGCTCCCGATGGAAAAATTGATAAAGGAGCCTTCT

NC_002692.1 GCGGAGATGACAGTTTGTGTACTTCCCTAAGGTTGTGAGTATCCCGATATACAACAAG
 ToMV-Ara GCGGAGATGACAGTTTGTGTACTTCCCTAAGGTTGTGAGTATCCCGATATACAACAAG

NC_002692.1 CTGCCAATCTAATGTGGAATTTTGGAGCCAAACTGTTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCT
 ToMV-Ara CTGCCAATCTAATGTGGAATTTTGGAGCCAAACTGTTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCT

NC_002692.1 GCGGGAGGTACGTGATTCATCAGATAGAGGTTGCATAGTATACGACCCCTTTGAAGC
 ToMV-Ara GCGGGAGGTACGTGATTCATCAGATAGAGGTTGCATAGTATACGACCCCTTTGAAGC

NC_002692.1 TGATTTCGAAACTTGGTGTCAACACATCAAGGATTGGGATCATTTGGAGGAGTTCAGAA
 ToMV-Ara TGATTTCGAAACTTGGTGTCAACACATCAAGGATTGGGATCATTTGGAGGAGTTCAGAA

NC_002692.1 GATCCCTCTGTGATGTTGCTGAGTCGTTGAACAATTGCGCGTATTACACACAATTGGACG
 ToMV-Ara GATCCCTCTGTGATGTTGCTGAGTCGTTGAACAATTGCGCGTATTACACACAATTGGACG

NC_002692.1 ACGCTGTTGGGGAGGTTCAAAAACCGCCCCACCTGGTTCGTTTGTTTATAAGAGTTTAC
 ToMV-Ara ACGCTGTTGGGGAGGTTCAAAAACCGCCCCACCTGGTTCGTTTGTTTATAAGAGTTTAC

NC_002692.1 TTAAGTATTTGTGAGATAAAGTTTTGTTTGAAGTTTATTTCTTGATGGCTCTAGTTGTT
 ToMV-Ara TTAAGTATTTGTGAGATAAAGTTTTGTTTGAAGTTTATTTCTTGATGGCTCTAGTTGTT

NC_002692.1 AAAGGTAAGGTAATATTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTCTCCCG
 ToMV-Ara AAAGGTAAGGTAATATTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTCTCCCG

NC_002692.1 TCGATGTTACGCCTGTAAAGAGTGTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCAT
 ToMV-Ara TCGATGTTACGCCTGTAAAGAGTGTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCAT

NC_002692.1 GAAAAATGAATCATTTGCTGAAGTAAATCTTTAAAAGGTGTAAAACCTTATAGAAGGTGGG
 ToMV-Ara GAAAAATGAATCATTTGCTGAAGTAAATCTTTAAAAGGTGTAAAACCTTATAGAAGGTGGG

NC_002692.1 TATGTTTGCTTAGTGGTCTTGTGTGTCGGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAATTGCCGT
 ToMV-Ara TATGTTTGCTTAGTGGTCTTGTGTGTCGGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAATTGCCGT

NC_002692.1 GGTTGGTGTGAGTGTCTGCATGGTTGACAAGAGAATGAAAAGAGCGGACGAAGCCACACTG
 ToMV-Ara GGTTGGTGTGAGTGTCTGCATGGTTGACAAGAGAATGAAAAGAGCGGACGAAGCCACACTG

NC_002692.1 GGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAGCGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAATTC
 ToMV-Ara GGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAGCGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAATTC

NC_002692.1 GGTATTACAACAAGGATGCAGAAAAGACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAAT
 ToMV-Ara GGTATTACAACAAGGATGCAGAAAAGACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAAT

NC_002692.1 GTAAAAATGAGTGCAGGCTACTGCCCTTTGTCATTAGAATTTGTGCTGTGTATTGTT
 ToMV-Ara GTAAAAATGAGTGCAGGCTACTGCCCTTTGTCATTAGAATTTGTGCTGTGTATTGTT

NC_002692.1 TATAAAAATAATATAAATTTGGGTTTGGAGGAGAAAGTAAACGAGTGTGAACGATGGAGGA
 ToMV-Ara TATAAAAATAATATAAATTTGGGTTTGGAGGAGAAAGTAAACGAGTGTGAACGATGGAGGA

NC_002692.1 CCCATGGAACCTTTCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCGGTT
 ToMV-Ara CCCATGGAACCTTTCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCGGTT

NC_002692.1 AGACTCGCAAAGTTTCGAACCAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAATAATAAATTTA
 ToMV-Ara AGACTCGCAAAGTTTCGAACCAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAATAATAAATTTA

NC_002692.1 GGTAAGGGGCGTTTCAGGCGGAAGGCTAAACCAAAAAGTTTGTGATGAAGTTGAAAAGAG
 ToMV-Ara GGTAAGGGGCGTTTCAGGCGGAAGGCTAAACCAAAAAGTTTGTGATGAAGTTGAAAAGAG

NC_002692.1 TTTGATAATTTGATTGAAGATGAAGCCGAGACGTCGGTTCGCGGATCTGATTCGTATTAA
 ToMV-Ara TTTGATAATTTGATTGAAGATGAAGCCGAGACGTCGGTTCGCGGATCTGATTCGTATTAA

NC_002692.1 ATATGCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGTCATCTGTATGGGCTG
 ToMV-Ara ATATGCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGTCATCTGTATGGGCTG

NC_002692.1 ACCCTATAGAATTTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAAGTTTCAAACACAGC
 ToMV-Ara ACCCTATAGAATTTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAAGTTTCAAACACAGC

NC_002692.1 AAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTTACGCGAGGTGTGAAACCTTCCCTCAGAGCA
 ToMV-Ara AAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTTACGCGAGGTGTGAAACCTTCCCTCAGAGCA

NC_002692.1 CCGTCAGATTTCCCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTATAGATCCTC
 ToMV-Ara CCGTCAGATTTCCCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTATAGATCCTC

NC_002692.1 TAATTACTGCGTTGCTGGGGCTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACC
 ToMV-Ara TAATTACTGCGTTGCTGGGGCTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACC

NC_002692.1 AGCAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGAGGGTAGACGACGCTACGG
 ToMV-Ara AGCAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGAGGGTAGACGACGCTACGG

NC_002692.1 TTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTACTAGGAGGTTACTGGACTGT
 ToMV-Ara TTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTACTAGGAGGTTACTGGACTGT

NC_002692.1 ACAATCAGAATACTTTTGAAGTATGCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTT
 ToMV-Ara ACAATCAGAATACTTTTGAAGTATGCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTT

NC_002692.1 AAATGCATAGGTGCTGAAATATAAATTTGTGTTTCTAAAACACACGTTGACGTACGAT
 ToMV-Ara AAATGCATAGGTGCTGAAATATAAATTTGTGTTTCTAAAACACACGTTGACGTACGAT

NC_002692.1 AACGTACAGTGTTTTCCCTCCACTTAAATCGAA-GGGTAGTGTCTTGGAGCGCGCGGAG
 ToMV-Ara AACGTACAGTGTTTTCCCTCCACTTAAATCGAA-GGGTAGTGTCTTGGAGCGCGCGGAG

```

NC_002692.1      TAAACATATATGGTTCATATATGTCCGTAGGCACGTAAAAAAGCGAGGGATTTCGAATTCC
ToMV-Ara        TAAACATATATGGTTCATATATGTCCGTAGCACGTAAAAAAGCGAGGGATTTCGAATTCC
*****
NC_002692.1      CCCGGAACCCCGG-TTGGGGCCCA
ToMV-Ara        CCCGGAACCCCGGTTGGGGCCCA
*****

```

Figura 14. Alineamiento de la secuencia del de referencia ToMV en el GenBank (número de acceso NC_002692.1), frente al ToMV-Ara caracterizado en este trabajo.

Como se observa en la Figura 14, la variante de secuencia clonada se parece bastante a la variante de referencia, ya que se trata de un virus de la misma especie, aunque tiene 57 mutaciones. De ellas, 6 afectan a las regiones 5' o 3' no traducidas.

Con la secuencia del ToMV-Ara se realizó una búsqueda en el GenBank mediante el programa BLAST. Se identificó, como más parecida, la variante “Tomato mosaic virus strain ToMV1-2” (código de acceso DQ873692) con una similitud de 99,9%. La principal característica que presenta la cepa ToMV1-2 es que, al igual que nuestro aislado, esta cepa también supera genes de resistencia en plantas de tomate, concretamente es resistente frente a los genes *Tm-1* y *Tm-2* (Strasser and Pfitzner, 2007).

El alineamiento entre la variante ToMV1-2 (DQ873692.1) y ToMV-Ara se muestra en la Figura 15. Las diferencias se han resaltado sobre fondo verde.

```

DQ873692.1      GTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATT
ToMV-Ara        GTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATT
*****
DQ873692.1      CTACAACACTACAATGGCATAACACAAACAGCCACATCGTCCGCTTTGCTTGAGACCGTCC
ToMV-Ara        CTACAACACTACAATGGCATAACACAAACAGCCACATCGTCCGCTTTGCTTGAGACCGTCC
*****
DQ873692.1      GAGGTAACAATACCTTGGTCAACGATCTTGCAAAGCGGGCTCTATATGACACAGCGGTTCG
ToMV-Ara        GAGGTAACAATACCTTGGTCAACGATCTTGCAAAGCGGGCTCTATATGACACAGCGGTTCG
*****
DQ873692.1      ATGAATTTAATGCTAGGGACCGCAGGCCATAAGTCAATTTTCCAAAGTAGTAAGCGAAG
ToMV-Ara        ATGAATTTAATGCTAGGGACCGCAGGCCATAAGTCAATTTTCCAAAGTAGTAAGCGAAG
*****
DQ873692.1      AACAGACGCTTATTGCAACCAAAGCCTACCCAGAATTCCAAATTACATTCTACAACACGC
ToMV-Ara        AACAGACGCTTATTGCAACCAAAGCCTACCCAGAATTCCAAATTACATTCTACAACACGC
*****
DQ873692.1      AGAAGCTGTGCATTCCTTGCAGGCGGTCTCCGATCATTAGAATTGGAATATCTGATGA
ToMV-Ara        AGAAGCTGTGCATTCCTTGCAGGCGGTCTCCGATCATTAGAATTGGAATATCTGATGA
*****
DQ873692.1      TGCAAATTCCTTACGGATCATTGACATATGATATCGGAGGTAATTTGCATCTCATCTGT
ToMV-Ara        TGCAAATTCCTTACGGATCATTGACATATGATATCGGAGGTAATTTGCATCTCATCTGT
*****
DQ873692.1      TCAAAGGGCGAGCATAACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCTGGATGTCGCGGACATAATGC
ToMV-Ara        TCAAAGGGCGAGCATAACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCTGGATGTCGCGGACATAATGC
*****
DQ873692.1      GGCACGAGGGCCAAAAGGACAGTATTGAACTATACTTTCTAGGCTCGAGAGGGGCAACA
ToMV-Ara        GGCACGAGGGCCAAAAGGACAGTATTGAACTATACTTTCTAGGCTCGAGAGGGGCAACA
*****
DQ873692.1      AACATGTCCCAAACCTCCAAAAGGAAGCTTTCGACAGATACGCTGAAATGCCAAACGAAG
ToMV-Ara        AACATGTCCCAAACCTCCAAAAGGAAGCTTTCGACAGATACGCTGAAATGCCAAACGAAG
*****
DQ873692.1      TAGTCTGTACGATACTTTCCAAACGTGTAGGCATTCTCAAGAATGTTACACGGGAAGAG
ToMV-Ara        TAGTCTGTACGATACTTTCCAAACGTGTAGGCATTCTCAAGAATGTTACACGGGAAGAG
*****
DQ873692.1      TGTATGCTATTGCTTTGCATAGTATACGATATACCTGCCGACGAGTTCGGCGCGGCAC
ToMV-Ara        TGTATGCTATTGCTTTGCATAGTATACGATATACCTGCCGACGAGTTCGGCGCGGCAC
*****
DQ873692.1      TGCTGAGAAAGAATGTACATGTATGTTATGCCGCTTCCACTTTCCGAGAATTTACTTTC
ToMV-Ara        TGCTGAGAAAGAATGTACATGTATGTTATGCCGCTTCCACTTTCCGAGAATTTACTTTC
*****
DQ873692.1      TCGAAGATTACACGTCACCTCGATGAGATCAATGCATGTTTCCAAAGAGATGGAGACA
ToMV-Ara        TCGAAGATTACACGTCACCTCGATGAGATCAATGCATGTTTCCAAAGAGATGGAGACA
*****

```

DQ873692.1 ToMV-Ara GGTGACTTTTTCCTTTCATCTGAGAGTACTCTTAATTATAGTCATAGTTATTCTAATA
GGTTGACTTTTTCCTTTCATCTGAGAGTACTCTTAATTATAGTCATAGTTATTCTAATA

DQ873692.1 ToMV-Ara TTCTTAAGTATGTTTGCAAACTTACTTCCCAGCCTCTAATAGAGAGGTTATATGAAGG
TTCTTAAGTATGTTTGCAAACTTACTTCCCAGCCTCTAATAGAGAGGTTAATGATGAAGG

DQ873692.1 ToMV-Ara AGTTTTAGTAAC TAGAGTTAATACTGGTTTTGTAAATTTCTAGAATAGATACTTTCT
AGTTTTAGTAAC TAGAGTTAATACTGGTTTTGTAAATTTCTAGAATAGATACTTTCT

DQ873692.1 ToMV-Ara TATTGTACAAAGGTGTAGCGCATAAGGGTGTAGATAGTGAGCAGTTTACAAGGCATGG
TATTGTACAAAGGTGTAGCGCATAAGGGTGTAGATAGTGAGCAGTTTACAAGGCATGG

DQ873692.1 ToMV-Ara AAGACGCATGGCACTACAAAAGACTCTTGCATGTGCAACAGTGAAAGAACTTTGTTAG
AAGACGCATGGCACTACAAAAGACTCTTGCATGTGCAACAGTGAAAGAACTTTGTTAG

DQ873692.1 ToMV-Ara AGGATTTCTCATCAGTTAATTACTGGTTTCCAAAATGAGGGATATGGTGATAGTCCAC
AGGATTTCTCATCAGTTAATTACTGGTTTCCAAAATGAGGGATATGGTGATAGTCCAC

DQ873692.1 ToMV-Ara TATTGTACATATCTCTCGAGACTAGTAAAAGAACACGCAAGAGGCTTAGTTTCAAAGG
TATTGTACATATCTCTCGAGACTAGTAAAAGAACACGCAAGAGGCTTAGTTTCAAAGG

DQ873692.1 ToMV-Ara ACTTTGTTTATACAGTGTAAATCACATTCTGACGTACCAGGCCAAAGCGCTTACTTACT
ACTTTGTTTATACAGTGTAAATCACATTCTGACGTACCAGGCCAAAGCGCTTACTTACT

DQ873692.1 ToMV-Ara CCAACGTGTATCTTTTCGTCGAATCAATTTCGTCGAGAGTGATCATTACGGGGTTACTG
CCAACGTGTATCTTTTCGTCGAATCAATTTCGTCGAGAGTGATCATTACGGGGTTACTG

DQ873692.1 ToMV-Ara CCAGGTCTGAGTGGGATGTCGATAAATCATTATTACAGTCTTGTGATGACGTTCTTCC
CAGGTCTGAGTGGGATGTCGATAAATCATTATTACAGTCTTGTGATGACGTTCTTCC

DQ873692.1 ToMV-Ara TACATACCAAGCTTGCCGTTCTGAAAGACGATCTTTTGATTAGCAAGTTTGCACCTGGAC
TACATACCAAGCTTGCCGTTCTGAAAGACGATCTTTTGATTAGCAAGTTTGCACCTGGAC

DQ873692.1 ToMV-Ara CAAAACCTGTCTCACAACTGTGTGGGATGAGATTTCCCTAGCTTTCCGGCAATGCTTTCC
CAAAAACCTGTCTCACAACTGTGTGGGATGAGATTTCCCTAGCTTTCCGGCAATGCTTTCC

DQ873692.1 ToMV-Ara CATCGATCAAGGAAAGATTGATAAACCAGGAACTGATCAAATACGGGAAATGCGTTAG
CATCGATCAAGGAAAGATTGATAAACCAGGAACTGATCAAATACGGGAAATGCGTTAG

DQ873692.1 ToMV-Ara AGATCAGGGTGCCCGATCTTATGTCACCTTCCATGATAGGTTAGTTTCTGAGTACAAAA
AGATCAGGGTGCCCGATCTTATGTCACCTTCCATGATAGGTTAGTTTCTGAGTACAAAA

DQ873692.1 ToMV-Ara TGTCAGTGGACATGCCGTTCTGACATTTAGGAAAAGATGGAAGAACTGAGGAAATGT
TGTCAGTGGACATGCCGTTCTGACATTTAGGAAAAGATGGAAGAACTGAGGAAATGT

DQ873692.1 ToMV-Ara ACAATGCACGTGCCAAGTCTGTACTTAAAAATTCAGACAAGTTCGATGTTGATGTTT
ACAATGCACGTGCCAAGTCTGTACTTAAAAATTCAGACAAGTTCGATGTTGATGTTT

DQ873692.1 ToMV-Ara TTTCCAGATGTGCCAATCTTTAGAAGTCGATCCAATGACTGCAGCAAAGGTAATAGTAG
TTTCCAGATGTGCCAATCTTTAGAAGTCGATCCAATGACTGCAGCAAAGGTAATAGTAG

DQ873692.1 ToMV-Ara CAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGAACAGCCACCAGCTAATG
CAGTTATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGAACAGCCACCAGCTAATG

DQ873692.1 ToMV-Ara TTGCGCTAGCATTGCAAGATCTGAAAAGGCTTCTGATGGGGCGTTGGTAGTTACCTCAA
TTGCGCTAGCATTGCAAGATCTGAAAAGGCTTCTGATGGGGCGTTGGTAGTTACCTCAA

DQ873692.1 ToMV-Ara GAGATGTTGAGGAAACCGTCCATAAAGGGTTCGATGGCCCGTGGTGAATGAGCTTGGCCG
GAGATGTTGAGGAAACCGTCCATAAAGGGTTCGATGGCCCGTGGTGAATGAGCTTGGCCG

DQ873692.1 ToMV-Ara GATTATCTGGCGACGTTCCGTAATCTTACATACACTAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTCTCG
GATTATCTGGCGACGTTCCGTAATCTTACATACACTAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTCTCG

DQ873692.1 ToMV-Ara AGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCCGTTAATTCATAAGCAGATGTGTTCCGATCGTGT
AGCAGTTTCATATGGCAACAGCTAGTTCCGTTAATTCATAAGCAGATGTGTTCCGATCGTGT

DQ873692.1 ToMV-Ara ACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACCTTTATAGACAGCCTGGTAGCCTCGC
ACACGGGCCCTCTTAAAGTTCAACAAATGAAAACCTTTATAGACAGCCTGGTAGCCTCGC

DQ873692.1 ToMV-Ara TCTCTGCTGCGGTGTCGAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGATACAGCTGCGATTGACCTTG
TCTCTGCTGCGGTGTCGAATCTAGTGAAGATCCTAAAAGATACAGCTGCGATTGACCTTG

DQ873692.1 ToMV-Ara AAATCGTCAAAGTTCGGAGTTCGGATGTGCTTCGAAAAGGTGGCTAGTTAAACCAT
AAATCGTCAAAGTTCGGAGTTCGGATGTGCTTCGAAAAGGTGGCTAGTTAAACCAT

DQ873692.1 CCGCAAAGAACCATGCATGGGGGGTTGTTGAGACTCATGCGAGGAAATATCACGTCGCAT
ToMV-Ara CCGCAAAGAACCATGCATGGGGGGTTGTTGAGACTCATGCGAGGAAATATCACGTCGCAT

DQ873692.1 TACTGGAGCAGCATGAATTTGGCATTATTACGTGCGATAACTGGCGACGGGTGGCTGTGA
ToMV-Ara TACTGGAGCAGCATGAATTTGGCATTATTACGTGCGATAACTGGCGACGGGTGGCTGTGA

DQ873692.1 GTTCTGAGTCGGTAGTATATTTCTGATATGGCTAAACTCAGGACTCTGAGAAGATTGCTTA
ToMV-Ara GTTCTGAGTCGGTAGTATATTTCTGATATGGCTAAACTCAGGACTCTGAGAAGATTGCTTA

DQ873692.1 AAGATGGAGAACCACACGTTAGTTCAGCAAAGGTGGTTTTGGTGGATGGCGTCCAGGGT
ToMV-Ara AAGATGGAGAACCACACGTTAGTTCAGCAAAGGTGGTTTTGGTGGATGGCGTCCAGGGT

DQ873692.1 GCGGGAACAAAAGAAATCTTTTCGAGAGTTAATTTGAAGAAGATCTAATCTTGTCC
ToMV-Ara GCGGGAACAAAAGAAATCTTTTCGAGAGTTAATTTGAAGAAGATCTAATCTTGTCC

DQ873692.1 CTGGTCGTCAAGCTGCCGAGATGATCAGAAGAAGAGCTAATGCGTCGGGCATAATAGTGG
ToMV-Ara CTGGTCGTCAAGCTGCCGAGATGATCAGAAGAAGAGCTAATGCGTCGGGCATAATAGTGG

DQ873692.1 CTACAAAGGATAAATGTGCGCACCGTCGATTCATTTTGTGATGAATACGGGAAAGGGGCAC
ToMV-Ara CTACAAAGGATAAATGTGCGCACCGTCGATTCATTTTGTGATGAATACGGGAAAGGGGCAC

DQ873692.1 GCTGTCAGTTCAAAAGATTGTTTCATAGACGAAGGTTTGTGCTGCATACCTGGTTGTGTGA
ToMV-Ara GCTGTCAGTTCAAAAGATTGTTTCATAGACGAAGGTTTGTGCTGCATACCTGGTTGTGTGA

DQ873692.1 ATTTCTTGGTTGAAATGTCTCTGTGCGATATGCATATGTTTATGGAGACCCCAACAAA
ToMV-Ara ATTTCTTGGTTGAAATGTCTCTGTGCGATATGCATATGTTTATGGAGACCCCAACAAA

DQ873692.1 TTCCGTACATCAACAGAGTAAGTGGTTTCCCGTACCCTGCACACTTTCGAAAATTGGAGG
ToMV-Ara TTCCGTACATCAACAGAGTAAGTGGTTTCCCGTACCCTGCACACTTTCGAAAATTGGAGG

DQ873692.1 TCGACGAAGTCGAAACAAGAAGAACTACTCTCGTTGTCCGGCTGATGTACACACTTCC
ToMV-Ara TCGACGAAGTCGAAACAAGAAGAACTACTCTCGTTGTCCGGCTGATGTACACACTTCC

DQ873692.1 TAAATCAAAGGTATGAAGGACACGTAATGTGCACGCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCC
ToMV-Ara TAAATCAAAGGTATGAAGGACACGTAATGTGCACGCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCC

DQ873692.1 AGGAAATGGTTAGTGGGGCTGCGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGGAAAA
ToMV-Ara AGGAAATGGTTAGTGGGGCTGCGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGGAAAA

DQ873692.1 TTTTGACTTTCACACAGTCTGACAAGGAGGCCCTTCTCTCAAGGGGCTATGCAGATGTCC
ToMV-Ara TTTTGACTTTCACACAGTCTGACAAGGAGGCCCTTCTCTCAAGGGGCTATGCAGATGTCC

DQ873692.1 ATACTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCGTTAGTTCGACTAACAC
ToMV-Ara ATACTGTACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCGTTAGTTCGACTAACAC

DQ873692.1 CTACGCCTGTATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGTTGTCAAGAC
ToMV-Ara CTACGCCTGTATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGTTGTCAAGAC

DQ873692.1 ACACAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAG
ToMV-Ara ACACAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAG

DQ873692.1 TTTTAGAACAGGTTAGTAGTTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTACTCAAT
ToMV-Ara TTTTAGAACAGGTTAGTAGTTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTACTCAAT

DQ873692.1 AGCAATTACAGGTCGACTCTGTGTTAAAAATTTCAATCTTTTGTAGCAGCTCCAAGA
ToMV-Ara AGCAATTACAGGTCGACTCTGTGTTAAAAATTTCAATCTTTTGTAGCAGCTCCAAGA

DQ873692.1 CTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCTTCTGGGAACAGCACGT
ToMV-Ara CTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCTTCTGGGAACAGCACGT

DQ873692.1 TGTTGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAAATTGACTGACATTTCTCTGAATGTCAAAG
ToMV-Ara TGTTGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAAATTGACTGACATTTCTCTGAATGTCAAAG

DQ873692.1 ATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGATGTCAAACCAACTTTAA
ToMV-Ara ATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGATGTCAAACCAACTTTAA

DQ873692.1 TACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGGAAAATCTAG
ToMV-Ara TACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGGAAAATCTAG

DQ873692.1 TTGCGATGATTAAGAAGAAATTTAATTCACCAGAGTTGTCCGGAGTAGTTGATATTGAAA
ToMV-Ara TTGCGATGATTAAGAAGAAATTTAATTCACCAGAGTTGTCCGGAGTAGTTGATATTGAAA

DQ873692.1 ATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGGAAAAAGAA
ToMV-Ara ATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGGAAAAAGAA

DQ873692.1 ToMV-Ara AACCAAACAAAAATTTTCTACTGTTAGTAGAGAGTCTCTCAATAGGTGGATAGCAAAGC
AACCAAACAAAAATTTTCTACTGTTAGTAGAGAGTCTCTC[red]ATAGGTGGATAGCAAAGC

DQ873692.1 ToMV-Ara AAGAACAAGTCACAATTGGTCAGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATCTTCCAGCCGTTG
AAGAACAAGTCACAATTGGTCAGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATCTTCCAGCCGTTG

DQ873692.1 ToMV-Ara ATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGAAGCAGAACTGGATCTGTCAATTCAGA
ATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGAAGCAGAACTGGATCTGTCAATTCAGA

DQ873692.1 ToMV-Ara CAGAATATCCAGCGTTGCAAAACGATTGTGTATCATTCAAAGAAAAATCAACGCAATATTTG
CAGAATATCCAGCGTTGCAAAACGATTGTGTATCATTCAAAGAAAAATCAACGCAATATTTG

DQ873692.1 ToMV-Ara GTCCTCTTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTATTGACTCAAGCAGATTCT
GTCCTCTTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTATTGACTCAAGCAGATTCT

DQ873692.1 ToMV-Ara TGTCTTTTACGAGAAAGACACCGGCTCAGATCGAAGATTTCTTCGGAGATCTAGACAGTC
TGTCTTTTACGAGAAAGACACCGGCTCAGATCGAAGATTTCTTCGGAGATCTAGACAGTC

DQ873692.1 ToMV-Ara ATGTCCCAATGGACGTACTTGAGTTGGATTTTCGAAGTATGATAAGTCTCAAACGAGT
ATGTCCCAATGGACGTACTTGAGTTGGATTTTCGAAGTATGATAAGTCTCAAACGAGT

DQ873692.1 ToMV-Ara TTCATTGTGCTGTTGAGTACGAAATCTGGAGGAGACTGGGCTCGGAGGATTTCTTGGCAG
TTCATTGTGCTGTTGAGTACGAAATCTGGAGGAGACTGGGCTCGGAGGATTTCTTGGCAG

DQ873692.1 ToMV-Ara AAGTGTGGAACAAGGGCATAGAAAACACTCTGAAAGATTACTGCTGGTATAAAAA
AAGTGTGGAACAAGGGCATAGAAAACACTCTGAAAGATTACTGCTGGTATAAAAA

DQ873692.1 ToMV-Ara CGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTATGTTACAACCTTTTATCGGTAATACCGTCA
CGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTATGTTACAACCTTTTATCGGTAATACCGTCA

DQ873692.1 ToMV-Ara TCATTGCTTCGTGCTTGCATCAATGCTCCCGATGGAAAAATTGATAAAAGGAGCCTCT
TCATTGCTTCGTGCTTGCATCAATGCTCCCGATGGAAAAATTGATAAAAGGAGCCTCT

DQ873692.1 ToMV-Ara GCGGAGATGACAGTTTGTGTACTTCCTAAGGGTTGTGAGTATCCCGATATACAACAAG
GCGGAGATGACAGTTTGTGTACTTCCTAAGGGTTGTGAGTATCCCGATATACAACAAG

DQ873692.1 ToMV-Ara CTGCTAATCTAATGTGGAATTTTGAGGCCAACTATTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCT
CTGCTAATCTAATGTGGAATTTTGAGGCCAACTATTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCT

DQ873692.1 ToMV-Ara GCGGGAGGTACGTGATTCATCAGATAGAGTTGCATAGTATACTACGACCCCTTGAAGC
GCGGGAGGTACGTGATTCATCAGATAGAGTTGCATAGTATACTACGACCCCTTGAAGC

DQ873692.1 ToMV-Ara TGATTTCGAAACTTGGTGTAAACACATCAAGGATGCGGATCATTGAGGAGTTTCAAGAA
TGATTTCGAAACTTGGTGTAAACACATCAAGGATGCGGATCATTGAGGAGTTTCAAGAA

DQ873692.1 ToMV-Ara GATCCCTCTGTGATGTTGCTGAGTCGTTGAACAATTGCGCGTATTACACACAATTGGACG
GATCCCTCTGTGATGTTGCTGAGTCGTTGAACAATTGCGCGTATTACACACAATTGGACG

DQ873692.1 ToMV-Ara ACGCTGTTGGGAGGTTTATAAAACCGCCACCTGGTTTCGTTTATAAGAGTTTGG
ACGCTGTTGGGAGGTTTATAAAACCGCCACCTGGTTTCGTTTATAAGAGTTTGG

DQ873692.1 ToMV-Ara TTAAGTATTTGTCAGATAAAGTTTGTGTTAGAAGTTATTTCTTGATGGCTCTAGTTGTT
TTAAGTATTTGTCAGATAAAGTTTGTGTTAGAAGTTATTTCTTGATGGCTCTAGTTGTT

DQ873692.1 ToMV-Ara AAAGGTAAGGTAATATTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTCTCCC
AAAGGTAAGGTAATATTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTCTCCC

DQ873692.1 ToMV-Ara TCGATGTTACGCCTGTAAGAGTGTATGGTTTCAAAGTTGATAAGATTATGGTCCAT
TCGATGTTACGCCTGTAAGAGTGTATGGTTTCAAAGTTGATAAGATTATGGTCCAT

DQ873692.1 ToMV-Ara GAAATGAATCATTGTCTAAAGTAAATCTCTTAAAAGGTGTAAGAACTTATAAGAGTTGG
GAAATGAATCATTGTCTAAAGTAAATCTCTTAAAAGGTGTAAGAACTTATAAGAGTTGG

DQ873692.1 ToMV-Ara TATGTTTGCTTAGTTGGTCTTGTGTTGTCGGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAATTGCCGT
TATGTTTGCTTAGTTGGTCTTGTGTTGTCGGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAATTGCCGT

DQ873692.1 ToMV-Ara GGTGGTGTGAGTGTCTGCATGGTTGACAAGAGAAATGGAAGAGCGGACGCAAGCCACTG
GGTGGTGTGAGTGTCTGCATGGTTGACAAGAGAAATGGAAGAGCGGACGCAAGCCACTG

DQ873692.1 ToMV-Ara GGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAGCGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAATTAC
GGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAGCGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAATTAC

DQ873692.1 ToMV-Ara GGTATTACAACAAAGGATGCAAAAAGAACAATATGGCAGGCTTAGTAAATATTAATAA
GGTATTACAACAAAGGATGCAAAAAGAACAATATGGCAGGCTTAGTAAATATTAATAA

```

DQ873692.1      GTAAAAATGAGTGCGGGCTACTGCCCTTTGTCATTAGAATTTGTGTCTGTGTATTGTT
ToMV-Ara      GTAAAAATGAGTGCGGGCTACTGCCCTTTGTCATTAGAATTTGTGTCTGTGTATTGTT
*****
DQ873692.1      TATAAAAATAATATAAAAATTGGGTTTGGAGGAGAAAGTAACGAGTGTGAACGATGGAGGA
ToMV-Ara      TATAAAAATAATATAAAAATTGGGTTTGGAGGAGAAAGTAACGAGTGTGAACGATGGAGGA
*****
DQ873692.1      CCCATGGAACCTTTCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCGGTT
ToMV-Ara      CCCATGGAACCTTTCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCGGTT
*****
DQ873692.1      AGACTCGCAAAGTTTCGAACCAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAAATAATAATAATTTA
ToMV-Ara      AGACTCGCAAAGTTTCGAACCAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAAATAATAATAATTTA
*****
DQ873692.1      GGTAAAGGGGCGTTCAGGCGGAAGGCCATAACCAAAAAGTTTGTGATGAAGTTGAAAAGAG
ToMV-Ara      GGTAAAGGGGCGTTCAGGCGGAAGGCCATAACCAAAAAGTTTGTGATGAAGTTGAAAAGAG
*****
DQ873692.1      TTTGATAATTTGATGAAGATGAAGCCGAGACGTCGGTCGCGGATCTGTATTCTGATTAA
ToMV-Ara      TTTGATAATTTGATGAAGATGAAGCCGAGACGTCGGTCGCGGATCTGTATTCTGATTAA
*****
DQ873692.1      ATATGTCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGTCATCTGTATGGGCTG
ToMV-Ara      ATATGTCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGTCATCTGTATGGGCTG
*****
DQ873692.1      ACCCTGTAGAATTTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCGATTTCAAACACAGC
ToMV-Ara      ACCCTGTAGAATTTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCGATTTCAAACACAGC
*****
DQ873692.1      AAGCAAGAAGTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCTTTCCCTCAGAGCA
ToMV-Ara      AAGCAAGAAGTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCTTTCCCTCAGAGCA
*****
DQ873692.1      CCGTCAGATTTCCCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCCTC
ToMV-Ara      CCGTCAGATTTCCCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATGCAGTTTTAGATCCCTC
*****
DQ873692.1      TAATTAAGTGTGCTGGGGTCTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACC
ToMV-Ara      TAATTAAGTGTGCTGGGGTCTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACC
*****
DQ873692.1      AGCAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGAGGTTAGACGACGCTACGG
ToMV-Ara      AGCAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCGAGGTTAGACGACGCTACGG
*****
DQ873692.1      TTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTACTGAGGTTACTGGACTGT
ToMV-Ara      TTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTACTGAGGTTACTGGACTGT
*****
DQ873692.1      ACAATCAAAATACTTTTGAAGTATGCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTT
ToMV-Ara      ACAATCAAAATACTTTTGAAGTATGCTGGGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTT
*****
DQ873692.1      AAATGCATAGGTGCTGAAATATAAAGTTTGTGTTTCTAAAACACACGTTGTTACGTACGAT
ToMV-Ara      AAATGCATAGGTGCTGAAATATAAAGTTTGTGTTTCTAAAACACACGTTGTTACGTACGAT
*****
DQ873692.1      AACGTACAGTGTTTTCCCTCCACTTAAATCGAA-GGGTAGTGTCTTGGAGCGCGGGAG
ToMV-Ara      AACGTACAGTGTTTTCCCTCCACTTAAATCGAA-GGGTAGTGTCTTGGAGCGCGGGAG
*****
DQ873692.1      TAAACATATATGGTTCATATATGTCGGTAGGCACGTAAGGAGGATTCGAATTC
ToMV-Ara      TAAACATATATGGTTCATATATGTCGGTAGGCACGTAAGGAGGATTCGAATTC
*****
DQ873692.1      CCCCGAACCCCGG-TTGGGGCCCA
ToMV-Ara      CCCCGAACCCCGG-TTGGGGCCCA
*****

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia “Tomato mosaic virus strain ToMV1-2” del Gen Bank (número de acceso DQ873692.1) frente al ToMV-Ara determinado en este trabajo.

Las secuencias son muy parecidas pero hay ciertos cambios. Concretamente se identificaron 46 de las cuales 6 afectan a regiones no traducidas.

4.3. Inoculación de diferentes variedades de tomate con ToMV-Ara y análisis de la infectividad y los síntomas

A continuación se analizó la infectividad del aislado ToMV-Ara en distintas variedades comerciales de tomate. En este análisis se incluyó como control una cepa de ToMV que no rompe la resistencia a los genes de resistencia que habitualmente contienen las variedades comerciales de tomate. A esta cepa se la denominó ToMV-0.

La variedades analizadas fueron: Enate, con el gen de resistencia en homocigosis; Palamós, la cual presenta el gen de resistencia *Tm-2²* en heterocigosis; Marglobe y Fimande, las cuales no presentan genes de resistencia al ToMV. Las plantas inoculadas se crecieron en un fitotrón a 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Las Figuras 16 a 23 muestran hojas sistémicas (no inoculadas) de las distintas plantas inoculadas. Las hojas se recolectaron 19 días tras la inoculación.



Figura 16. Hojas de la variedad de tomate Enate inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara. Se incluye un control de planta no inoculada.



Figura 17. Hojas de tomate Enate inoculadas con ToMV-Ara (izquierda) y sin inoculación (derecha).

En la variedad Enate, que posee el gen *Tm-2²* de resistencia al ToMV en homocigosis, no se observan síntomas en aquellas plantas que han sido inoculadas con la cepa Aramburu del virus, lo cual sugiere que el gen *Tm-2²* en homocigosis induce resistencia frente a dicha cepa.

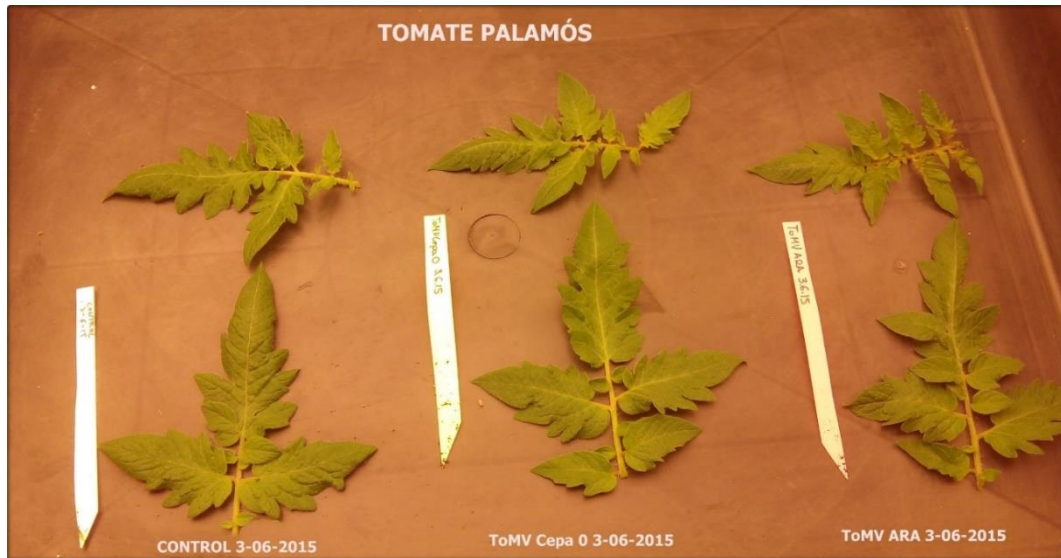


Figura 18. Hojas de variedad de tomate Palamós inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara. Se incluye un control no inoculado.



Figura 19. Hojas de tomate Palamós inoculadas con ToMV-Ara (izquierda) y sin inoculación (derecha).

Como se puede observar en las imágenes de las Figura 18 y 19, tampoco hay diferencias en las hojas de las plantas inoculadas con los dos virus y el control no inoculado en la variedad Palamós. Por tanto, ToMV-Ara tampoco parece capaz de romper la resistencia del gen *Tm2²*, ni siquiera en heterocigosis, como contiene la variedad Palamós.



Figura 20. Hojas de variedad de tomate Marglobe inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara. Se incluye un control no inoculado.



Figura 21. Hojas de tomate Marglobe inoculadas con ToMV-Ara (izquierda) y sin inoculación (derecha).

Sin embargo, en la variedad Marglobe si se pudieron observar diferencias entre el control, en el cual no se inoculó ningún virus, y las plantas inoculadas con cualquier de los dos aislados (inoculación de ToMV-0 y ToMV-Ara) (Figuras 20 y 21). Se observó una disminución en el tamaño de las hojas de las plantas inoculadas (Figuras 20 y 21). También se apreció la aparición del conocido mosaico en las hojas, así como un tejido foliar más arrugado (Figuras 20 y 21). En la Figura 20 se observa como los síntomas fueron más intensos en las plantas que fueron inoculadas con el ToMV-Ara.

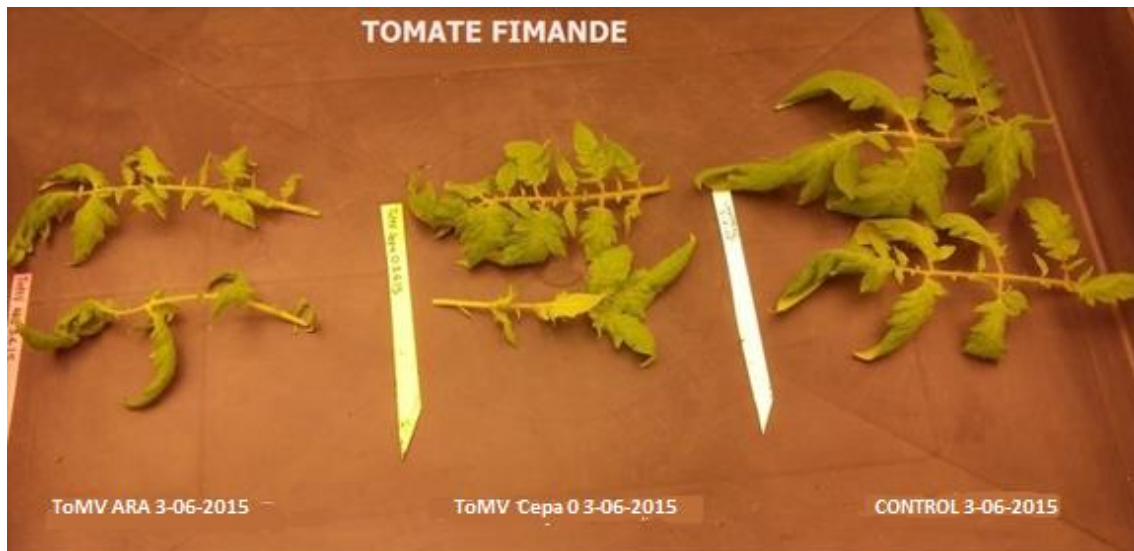


Figura 22. Hojas de variedad de tomate Fimande inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara, así como de un control no inoculado.



Figura 23. Hojas de tomate Fimande inoculadas con ToMV-Ara (izquierda) y sin inoculación (derecha).

En la variedad Fimande, que tampoco contiene el gen de resistencia *Tm-2²*, también se pudieron observar los síntomas causados por la infección. Además, en esta variedad los síntomas son aún más claros y las diferencias muy notables (Figuras 22 y 23). Se observó un retraso en el crecimiento de las hojas de la planta infectada con el ToMV-Ara en comparación con el control. También se observó un amarilleamiento de las hojas, síntoma característico de la infección, así como la aparición de tejido foliar más arrugado. En esta variedad de tomate, el virus ToMV-0 también causó algunos síntomas, aunque no tan intensos como ToMV-Ara (Figura 22).

4.4. Análisis por ELISA de las plantas inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara

A los 19 días postinoculación se tomó tejido sistémico de algunas de las plantas inoculadas y se determinó la presencia del ToMV mediante análisis ELISA. Los resultados se muestran en las Tablas 6, 7, 8 y 9.

Tabla 6. Resultados del análisis ELISA de plantas de la variedad Enate.

Enate			
Controles	Sin virus	ToMV-0	ToMV-Ara
0	-0,002	0	0,002
-0,002	-0,004	0,004	0,005
0,603	0,023	0,024	0,02
	0,015	0,002	-0,004
	0,006	0,008	0,003
	0,002	0,009	0,003

En la Tabla 6, las celdas en rojo, corresponden a controles negativos de las placas de ELISA, el control restante es un control positivo de la planta infectada. El resto de las columnas de la Tabla corresponden a plantas no inoculadas e inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara. Todas las muestras fueron negativas, lo cual se explica porque la variedad Enate posee el gen *Tm-2²* en homocigosis. Este resultado confirma las observaciones anteriores, respecto de la sintomatología, indicando que ToMV-Ara no es capaz de romper la resistencia de *Tm-2²* cuando está en homocigosis.

Tabla 7. Resultados del análisis ELISA de plantas de la variedad Palamós.

Palamós			
Controles	Sin virus	ToMV-0	ToMV-Ara
0	0,019	1,594	0,007
-0,004	-0,008	0,517	-0,004
1,49	-0,011	0,007	0,003
	0,012	0,022	0,026
	-0,01	-0,004	0,003
	0,007	0,032	0,03

La Tabla 7 corresponde a plantas de la variedad Palamós, siendo las celdas en rojo controles negativos de las placas de ELISA. El otro control corresponde a un extracto de planta infectada. En las plantas de tomate Palamós, todas las muestra dieron negativo, salvo dos plantas inoculadas con ToMV-0. Este resultado sugiere que ToMV-0 puede infectar algunas plantas cuando *Tm-2²* se encuentra en heterocigosis, como es el caso de Palamós. Sin embargo, ninguna planta inoculada con ToMV-Ara resultó infectada.

No se debería descartar la posibilidad de que haya habido una confusión con las muestras y las dos plantas infectadas hubieran sido inoculadas con ToMV-Ara. Como se ha mostrado anteriormente en tomate Marglobe y Fimande ToMV-Ara es más sintomático que ToMV-0

(Figuras 20 y 22). Además, como se verá a continuación, en la variedad Marglobe ToMV-Ara alcanza títulos más altos que ToMV-0.

Tabla 8. Resultados del análisis ELISA de plantas de la variedad Marglobe.

Marglobe			
Controles	Sin virus	ToMV-0	ToMV-Ara
0	0,074	0,252	0,591
-0,004	0,045	0,218	0,297
0,578	0,098	0,244	0,585
	0,058	0,32	0,498
	0,181	0,18	0,698
	0,062	0,246	0,448

La Tabla 8 corresponde a plantas de la variedad Marglobe siendo las muestras en rojo controles negativos de la placa de ELISA y el control restante un control positivo de planta infectada. Las plantas control dieron valores bajos de absorbancia, compatibles con ausencia de infección viral. El resto de plantas dieron valores de absorbancia consistentes con la infección. Es de destacar que las plantas infetadas con ToMV-Ara dieron valores de absorbancia significativamente más altos que las infectadas con ToMV-0, lo que sugiere una mayor carga viral de este aislado en esta variedad de tomate.

Tabla 9. Resultados del análisis ELISA de plantas de la variedad Fimande.

Fimande			
Controles	Sin virus	ToMV-0	ToMV-Ara
0	0,008	0,154	0,244
-0,002	0,033	0,091	0,128
0,584	0,022	0,3	0,173
	0,115	0,292	0,173
	0,019	0,154	0,093
	0,007	0,146	0,142

La Tabla 9 corresponde a plantas de la variedad Fimande. Como en los otros casos, la columna de los controles contiene dos negativos (fondo rojo) y un positivo. Todas las plantas no inoculadas dieron un valor bajo de absorbancia. Sin embargo, la mayoría de las plantas inoculadas con ToMV-0 y ToMV-Ara dieron valores de absorbancia claramente menores que el control positivo, pero significativamente mayores que los controles no inoculados. Estos resultados sugieren que ambos aislados virales son capaces de infectar la variedad Fimande, aunque su acumulación en los tejidos infectados es baja.

5. Conclusiones

1. Se ha construido un clon infeccioso del aislado Aramburu del ToMV.
2. La secuencia del clon ToMV-Ara se parece a la variante de secuencia DQ873692.1 del ToMV, previamente descrita como que supera la resistencia de *Tm-2*².
3. ToMV-Ara contiene 57 cambios con respecto a la secuencia de ToMV de referencia del GenBank (número de acceso NC_002692.1). La variante de secuencia del ToMV a la que más se parece ToMV-Ara es "Tomato mosaic virus strain ToMV1-2" (número de acceso DQ873692.1). Sin embargo, todavía tiene 46 diferencias.
4. A pesar de las observaciones iniciales realizadas en campo, nuestros experimentos de laboratorio con una variante de secuencia clonada muestran que ToMV-Ara es incapaz de superar la resistencia de *Tm-2*² en heterocigosis u homocigosis.

6. Bibliografía

Arden T. Sherf and Alan A. MacNab, John Wiley and Sons. (1986). Vegetable Diseases and their Control ISBN: 978-0-471-05860-1.

Barry J. and Miller, W. (2002). A 21 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99: 11133-11138.

Citovsky V., Wong M.L., Shaw A.L., Ventakataran Prasad B.V. and Zambryski P. (1992). Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell*, 4: 397-411.

Dax E., Livneh O., Aliskevicius E., Edelbaum O., Kedar N., Gavish N., Milo J., Geffen F., Blumenthal A., Rabinowich H., Sela I. (1998). A Scar marker to the ToMV resistance gene, Tm2², in tomato. *Euphytica*, 101: 73-77.

Dilip R., Brown A., Yousef G. (2013). Novel molecular marker associated with Tm2a gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. *Plant Breeding*, 132: 4

Fraser RSS. (1990) .The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review Phytopathology* 28: 179–200.

Fernández V. (1969). *Introducción a la fitopatología-VIRUS*. Buenos Aires: I.N.T.A , 3 ed.

Gibbs A. (1999). *Evolution and origins of tobamoviruses*. The Royal Society, 354.

He M., He CQ., Ding NZ. (2012). Natural recombination between tobacco and tomato mosaic viruses. *Virus Research*, 163: 374–379.

Khush G., Rick C., Robinson R. (1964). Genetic activity in a heterochromatic chromosome segment of the tomato. *Science*, 145: 1432-1434.

Knorr D.A. and Dawson W.O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana glauca*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 85: 170-174.

Lartey R.T., Voss T.C. and Melcher U. (1996). Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biology Evolution*, 13: 1327-1338.

Aguado A., Fernández S., Cambra M., Escriu F., Luis M. (2014). El virus del mosaico del tomate. *Centro de sanidad y certificación vegetal*.

http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/AgriculturaGanaderia/Areas/03_Sanidad_Vegetal/01_Proteccion_Vegetal/cpv_ana_documentos/ToMv_1_1.pdf

Motoyoshi F. and Oshima N. (1977). Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts. *Journal of General Virology*, 34: 499-506.

Olusegun S., Balogun, Leixin Xu, Tohru Teraoka and Daijiro Hosokawa. (2002). Effects of single and double infections with Potato virus X and Tobacco mosaic virus on disease development, plant growth, and virus accumulation in tomato. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 241-248.

Patricia Gilardi. (2003). Análisis de los Inductores virales de la Resistencia frente a Tobamovirus en el género *Capsicum*. Tesis doctoral, universidad complutense de Madrid.

Pfleger F., Zeyen G. (1991). Tomato-Tobacco mosaic virus. *Plant Pathology*, FS-01168.

Rodríguez R., Tabares J., Medina J. (1997). Cultivo moderno del Tomate Madrid-España. ISBN 9788471146403.

Stange C. (2006). Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33: 3-21.

Thole V., Worland B., Snape J. W., Vain P. (2007). The pCLEAN dual binary vector system for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Physiology*, 145: 1211–1219.

Valiente J. (2003). Virosis en cultivo hortícola. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación experimental Concepción del Paraguay, N° 77.

Watanabe T., Kishibayashi N., Motoyoshi F., Okada Y. (1987). Characterization of Tm-1 gene action on replication of common isolates and a resistance-breaking isolate of TMV. *Virology* 161: 527–532

Weber H., Pfitzner AJ. (1998). Tm-2(2) resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *American Physical Society Journal*, 11: 498-503.

Páginas web

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

http://en.wikipedia.org/wiki/Baltimore_classification#/media/File:VirusBaltimoreClassification.svg

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/592/1/T-ESPE-025145.pdf>

<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=54063>

<http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>