
INDICE.....	I
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XIII
RESUM.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cultivo de los cítricos: origen e importancia económica.....	3
2. Mejora genética de los cítricos.....	4
3. Silenciamiento génico mediado por RNA.....	6
3.1. Antecedentes y funciones.....	6
3.2. Mecanismo del silenciamiento.....	7
3.3. Silenciamiento génico mediado por RNA en plantas.	11
3.3.1. Regulación de la expresión génica mediante micro RNAs.....	11
3.3.2. Heterocromatina y control de elementos transponibles.....	11
3.3.3. Defensa antiviral.....	12
3.4. Supresores del silenciamiento génico postranscripcional.....	13
3.4.1. Estrategias para la identificación de supresores	16
3.4.2. Mecanismos de acción de los supresores de silenciamiento.....	22
4. Vectores virales.....	25
4.1. Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS)...	25
4.2. Expresión de genes.....	28
5. Clones infecciosos de virus.....	31
6. Expresión génica de virus de RNA de cadena positiva...	33
6.1. Mecanismos de síntesis de sgRNAs.....	34
6.2. Promotores de sgRNAs.....	36
7. El virus del manchado foliar de los cítricos.....	39

7.1. Sintomatología, gama de huéspedes, transmisión e incidencia.....	39
7.2. Taxonomía, organización genómica y características moleculares.....	42
7.3. Diagnóstico de CLB.....	44
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	51
CAPÍTULO 1: Construcción y ensayos de infectividad de clones infecciosos de CLB en protoplastos.....	55
1.1. Introducción y objetivos.....	57
1.2. Resultados.....	58
1.2.1. Construcción de un clon de cDNA del genoma completo de CLB bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.....	58
1.2.2. Desarrollo de sistemas de inoculación de transcritos en protoplastos de <i>N. occidentalis</i> , <i>N. benthamiana</i> y cidro.....	59
1.2.2.1. Aislamiento de protoplastos de <i>N. occidentalis</i>	60
1.2.2.2. Aislamiento de protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	64
1.2.2.3. Aislamiento de protoplastos de cidro Etrog.....	67
1.2.2.4. Inoculación de protoplastos con transcritos de CLB.....	69
1.2.3. Inoculación directa de transcritos generados a partir del clon de CLB en plantas de <i>N. benthamiana</i> y cidro Etrog.....	72
1.3. Discusión.....	73

CAPÍTULO 2: Caracterización de los elementos implicados en el inicio y promoción de la síntesis del RNA subgenómico de la proteína de la cápsida de CLBV.....	81
2.1. Introducción y objetivos.....	83
2.2. Resultados.....	85
2.2.1. Desarrollo de un sistema genético basado en la agroinoculación de hojas de <i>N. benthamiana</i> con un clon de cDNA de CLBV.....	85
2.2.2. Determinación de la secuencia mínima promotora del sgRNA de la proteína de cápsida de CLBV.....	88
2.2.3. Efecto de la modificación del inicio de transcripción en la síntesis del sgRNA de la cápsida.....	97
2.3. Discusión.....	101
CAPÍTULO 3: Identificación y caracterización de la proteína supresora del silenciamiento génico postranscripcional de CLBV.....	107
3.1. Introducción y objetivos.....	109
3.2. Resultados.....	111
3.2.1. Clonación de los genes del virus en un vector binario.....	111
3.2.2. Identificación de la proteína supresora del silenciamiento de CLBV a nivel intracelular.....	113
3.2.3. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento célula-célula por la proteína	

supresora de CLBV.....	119
3.2.4. Estudio de la interferencia de la señal de silenciamiento a larga distancia por las proteínas de CLBV.....	122
3.2.5. Ensayo de la supresión de silenciamiento por las proteínas de CLBV expresadas directamente desde su genoma.....	128
3.3. Discusión.....	131
MATERIALES Y MÉTODOS.....	137
1. Material biológico.....	139
1.1. Plantas.....	139
1.2. Bacterias.....	140
1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	140
1.2.1.1. Obtención de células de la cepa DH5 α competentes para su transformación mediante choque térmico.....	140
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	141
1.2.2.1. Obtención de células de la cepa COR 308 competentes para su transformación mediante electroporación.....	141
2. Generación de construcciones de cDNA.....	141
2.1. Obtención de un clon infeccioso del genoma completo de CLBV bajo el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda.....	141
2.2. Obtención de mutantes del clon infeccioso IC-CLBV.....	145
2.2.1. Introducción de codones de parada en las proteínas de movimiento y cápsida de CLBV.....	145
2.2.2. Delecciones del promotor del sgRNA de la cápsida de CLBV.....	148
2.2.2.1. Delecciones de la región 5' del promotor	

del CP-sgRNA.....	148
2.2.2.2. Delecciones de la región 3' del promotor del CP-sgRNA.....	150
2.2.2.3. Delecciones de las regiones 5' y 3' del promotor del CP-sgRNA.....	152
2.2.3. Mutaciones del hexanucleótido GAAAAG presente en el inicio de transcripción del CP-sgRNA.....	152
2.3. Clonación de los ORFS de CLB.....	154
3. Aislamiento de protoplastos.....	156
3.1. Protoplastos de <i>N. occidentalis</i>	156
3.2. Protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	157
3.3. Protoplastos de cidro Etrog.....	157
4. Preparación de inóculos.....	158
4.1. Purificación de viriones.....	158
4.2. Transcripción <i>in vitro</i>	159
4.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	159
5. Inoculación de construcciones.....	160
5.1. Inoculación de protoplastos con viriones.....	160
5.2. Inoculación de protoplastos con transcritos.....	161
5.3. Inoculación de plantas con transcritos.....	161
5.4. Inoculación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	162
6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	163
6.1. Extracción de RNA total a partir de protoplastos.....	163
6.2. Extracción de RNA total a partir de tejido agroinfiltrado.....	163
6.3. Extracción de RNAs de pequeño tamaño (siRNAs)...	163
7. Detección de ácidos nucleicos.....	164
7.1. RT-PCR.....	164
7.1.1. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes.....	164

7.2. Detección mediante northern blot.....	165
7.2.1 Preparación de muestras.....	165
7.2.2. Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.....	165
7.2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	165
7.2.4. Electrotransferencia de los RNAs a membranas.....	166
7.2.5. Marcado de las ribosondas.....	166
7.2.6. Hibridación.....	167
8. Detección de GFP.....	168
CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA.....	177
AGRADECIMIENTOS.....	213