



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal  
Trabajo de Fin de Máster

# Estudio de la posible actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b en *Ilarvirus* del subgrupo 2

Presentado por:  
Claudia Miranda Cekalovic

Dirigido por:  
Carmelo López del Rincón  
Frederic Aparicio Herrero

VALENCIA, Septiembre 2017



# Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis tutores, Carmelo López y Frederic Apararicio, por abrirme las puertas de sus laboratorios y guiarme en el desarrollo de este proyecto de investigación. Valoro muchísimo su gran calidad humana y generosidad, pues nunca han duda en facilitarme las cosas y en resolver incansablemente mis dudas, además de tener la paciencia y buen humor con los errores que cometí en el laboratorio.

Agradezco también a Alicia y Cristina por su colaboración en los experimentos de laboratorio. Y en particular a Neiva y a Ramsés, quienes siempre han estado para tenderme una mano cuando lo necesité.

A mi familia y en particular a mi hija Rebeca por la paciencia que ha tenido en estos dos años, y a su padre, Juan Francisco, por facilitarme la vida.

Muchas gracias a todos.

# INDICE

# INDICE

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. INTRODUCCION.....	9
1.1. Tomate: Importancia económica.....	9
1.2. Virosis en tomate.....	10
1.3. Familia <i>Bromoviridae</i> .....	11
1.4. Género <i>Ilarvirus</i> .....	12
1.5. Virus del moteado de la parietaria.....	14
1.6. Silenciamiento génico en plantas.....	16
1.7. Supresión viral del silenciamiento.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIALES. ....	23
3.1.1. Material vegetal.....	23
3.1.2. Cepas bacterianas.....	23
3.1.3. Vectores de clonación (plásmidos) .....	24
3.1.3.1. pJET 1.2/Blunt.....	24
3.1.3.2. pSK.....	25
3.1.3.3. pMOG.....	25
3.2. MÉTODOS. ....	26
3.2.1. Reacción de ligación de ADN.....	26
3.2.2. Transformación por electroporación.....	26
3.2.3. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias.....	28
3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	28
3.2.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa o procedentes de bacterias.....	29
3.2.6. Reacción de digestión de ADN.....	30
3.2.7. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	31
3.2.8. Análisis informático.....	31
3.2.9. Expresión transitoria de hojas de <i>N. benthamiana</i> 16c, por transformación De <i>A. tumefaciens</i> cepa C58C1.....	31
3.2.9.1. Análisis de proteínas a partir de hojas agroinfiltradas de <i>N. benthamiana</i> .....	32
3.2.9.1.1. Muestra vegetal.....	32
3.2.9.1.2. Western – blot.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
4.1. Obtención, clonación y comprobación de la secuencia nucleotídica de Proteína putativa 2b de AV2 y SpLV.....	36
4.1.1. Obtención de la secuencia de partida.....	36
4.1.2. Subclonación en pJET1.2/Blunt.....	39

4.1.3. Subclonación del gen 2b en el vector pSK entre el promotor 2x35S y el terminador <i>PoPit</i> .....	41
4.1.4. Subclonación de la construcción 35S:gen2b: <i>PoPit</i> , en pMOG800.....	45
4.2. Agroinfiltración del plásmido pMOG recombinante en plantas de <i>N. benthamiana</i> 16c y comprobación de la expresión de la proteína.....	45
4.3. Análisis tipo Western blot.....	47
5. CONCLUSIÓN.....	49
6. BIBLOGRAFIA.....	51
7. ANEXOS.....	52
ANEXO 1. Resultados del análisis de restricción con el programa informático <i>Restriction Map</i> , del gen 2b de AV2.....	53
ANEXO 2. Sitio y número de repeticiones de los sitios de restricción del gen 2b de AV2, según el programa informático <i>Restriction Map</i> .....	55
ANEXO 3. Resultados del análisis de restricción con el programa informático <i>Restriction Map</i> , del gen 2b de SpLV.....	56
ANEXO 4. Sitio y número de repeticiones de los sitios de restricción del gen 2b de AV2, según el programa informático <i>Restriction Map</i> .....	58
ANEXO 5. Alineamiento con programa de la secuencia solicitada de síntesis química del gen de la proteína putativa 2b de AV2 (GenBank: AB745636.1) en relación a la secuenciación del ADN plasmídico purificado del clon 20 de AV2-2b, obtenida posterior a la clonación en el plásmido pJET1.2/Blunt.....	59
ANEXO 6. Alineamiento de la secuencia solicitada de síntesis química del gen de la proteína putativa 2b de SpLV (GenBank: NC_003809.1) en relación a la secuenciación del ADN plasmídico purificado del clon 33 de SpLV-2b, obtenida posterior a la clonación en el plásmido pJET1.2/Blunt.....	60

# RESUMEN

## Estudio de la posible actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b en Ilarvirus del subgrupo 2

Los virus vegetales son parásitos intracelulares obligados que necesitan células hospedadoras vivas para completar su ciclo. Las plantas presentan una serie de mecanismos de defensa, entre ellos el del silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS (*posttranscriptional gene silencing*). Como respuesta los virus han desarrollado una serie de estrategias en las que usan proteínas propias supresoras del silenciamiento. Estas proteínas inhiben la respuesta antiviral del huésped por medio de la interacción con factores clave de la maquinaria de silenciamiento implicados en el reconocimiento de RNA viral, el procesamiento de dsRNAs, el ensamblaje del complejo RISC y la amplificación de señal. Se han identificado virus que codifican en su genoma varias proteínas con actividad supresora del silenciamiento de forma que cada una puede afectar a etapas diferentes de la ruta. En el subgrupo 2 de los Ilarvirus se desconoce si codifican proteínas con dicha actividad. En el caso del Cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) se ha comprobado que la proteína 2b interviene en el movimiento sistémico a larga distancia del virus y actúa como supresor del PTGS. Por homología se ha propuesto que esa misma proteína 2b en los miembros del subgrupo 2 de los Ilarvirus, debería tener funciones similares. Por tanto, el objetivo general de este Trabajo Final de Máster consiste en determinar la posible función de la proteína 2b del virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV) y del virus 2 del espárrago (*Asparagus virus 2*, AV2) como supresora del PTGS a nivel local. Para ello, las ORFs de ambas proteínas se clonaron en plásmidos binarios bajo la expresión del promotor 35S para su expresión transitoria mediante agro-infiltración. Ambas construcciones fueron expresadas en plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c las cuales expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Los resultados obtenidos sugieren que ninguna de estas proteínas tendría actividad de supresión del PTGS, de modo que al contrario que la proteína 2b del CMV, la de los Ilarvirus no presentaría actividad de silenciamiento del PTGS a nivel local.

# ABSTRACT

Plant viruses are obligate intracellular parasites that require living host cells to complete their life cycle. Plants present several defense mechanisms, including posttranscriptional gene silencing (PTGS). In response, viruses have developed several strategies in which they use own suppressor proteins of the silencing. These proteins inhibit host antiviral response by interacting with key silencing machinery factors involved in viral RNA recognition, dsRNA processing, RISC complex assembly, and signal amplification. There are some identified viruses encoding in their genome several proteins with suppressor silencing activity therefore each one can affect different stages of the path. In subgroup 2 of the Ilarvirus, the activity of 2b protein is unknown. In the case of cucumber mosaic virus (CMV), protein 2b is involved in systemic long-distance movement of the virus and acts as a suppressor of PTGS. In subgroup 2 members of Ilarvirus, by homology, it has been proposed a similar function for putative 2b protein. Therefore, the general objective of this Final Master's Work is to determine the possible function of putative 2b protein as suppressor of the PTGS at local level in Spinach latent virus (SpLV) and Asparagus virus 2 (AV2). ORFs of both putative 2b proteins were cloned in binary plasmids to allow their transient expression by agroinfiltration. Both cassettes were expressed in plants of *Nicotiana benthamiana* 16c which constitutively express the green fluorescent protein (GFP). Results suggest that none of these putative 2b proteins would have PTGS suppression activity, so that unlike the CMV 2b protein, that of the Ilarvirus would not exhibit PTGS silencing activity at the local level.



# 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Tomate: Importancia económica

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es el cultivo hortícola de mayor valor económico e importancia global, superando los 170 millones de toneladas durante el año 2014 según la FAO. En la Figura 1, se aprecia el ascenso continuo de la producción, debido principalmente al aumento en rendimiento y en menor cuantía a la superficie cultivada. El líder mundial en producción de tomate es China, seguido muy de lejos por India y EE.UU, en tanto, en Europa los principales productores son España e Italia. La superficie total de tomate en España es de 58.134 ha con una producción de 4.832.700 t, destinando un 80% de la superficie para tomate fresco y un 20% para tomate industrial (MAPAMA, 2017).

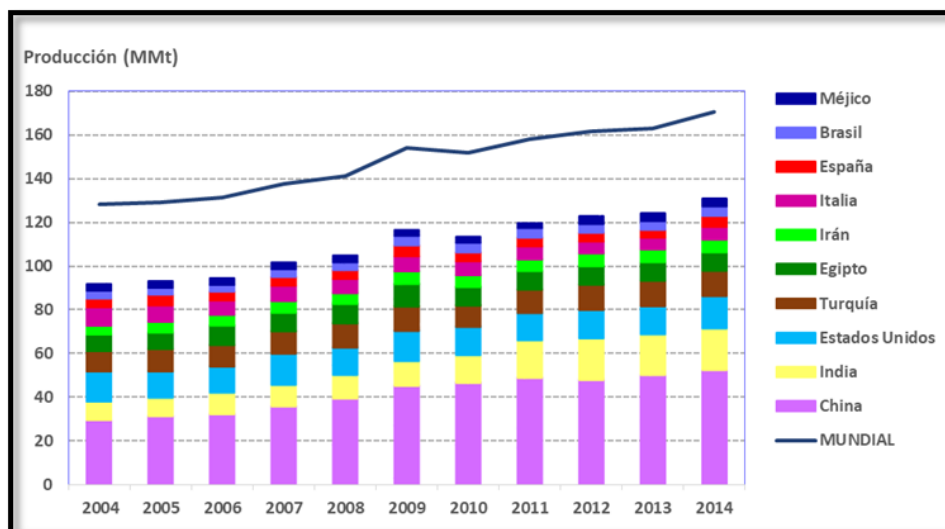


Figura 1. Producción mundial de tomate total y los diez países con mayor producción según la FAO.

El cultivo del tomate está expuesto a diversas plagas y enfermedades. Entre ellas, las enfermedades mediadas por virus son un grave problema al mermar el rendimiento y calidad de la cosecha, pudiendo ser devastadoras. La manera de abordar esta situación es esencialmente preventivo, aunque la resistencia de la planta es la piedra angular del control sostenible de las principales enfermedades. Por lo tanto, es de gran importancia comprender como interaccionan estos patógenos con las plantas, y de este modo diseñar estrategias para evitar su avance en el hospedante. Dentro de este marco se estudiará el posible mecanismo de silenciamiento de la proteína 2b de dos virus del género *Ilarvirus*.

## 1.2. Virosis en tomate

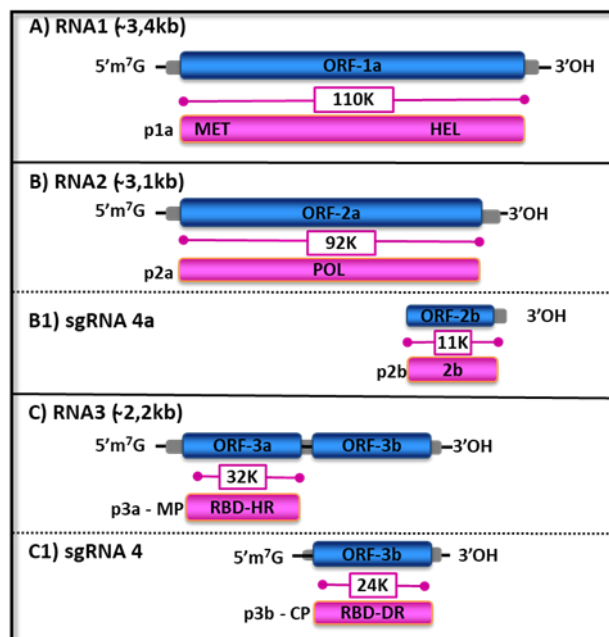
El tomate está afectado por un vasto número de patógenos y los virus son los segundos en importancia después de los hongos (SEF, 2016). Esto se explica en parte por la alta sensibilidad a miembros del género *Begomovirus* que alberga gran variedad de especies que pueden llegar a causar pérdidas ostensibles; y además, por la intensificación del monocultivo tanto al aire libre como protegido (Hanssen *et al.*, 2010; Petrov, 2014). Entre los virus de mayor relevancia que afectan al tomate están los que causan amarilleo, como son el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) (Fauquet y Stanley, 2005), *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), y el virus de la clorosis del tomate (*Tomato chlorosis virus, ToCV*), *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*), ambos transmitido por mosca blanca. Otro caso, es el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*), *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*) que se transmite por trips. Este virus puede causar la pérdida total del cultivo debido a su amplio rango de hospedantes y a que es cosmopolita; además, continuamente aparecen razas capaces de sobrepasar la resistencia (Adkins, 2000; Aramburu *et al.*, 2010). En tanto, el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino Mosaic Virus, PepMV*), *Potexvirus* (familia *Flexiviridae*) se transmite tanto mecánicamente (King *et al.*, 2012), como por vectores (Shipp *et al.*, 2008; Noël *et al.*, 2014) y por semilla (Hanssen *et al.*, 2010). *PepMV* no presenta fuentes de resistencia (Jutglá, 2009; Navas *et al.*, 2011; Petrov, 2014), sin embargo, varias empresas dentro y fuera de España, están desarrollando y aplicando vacunas con cepas atenuadas, aprovechando la protección cruzada. Otros virus de importancia son el virus X de la patata (*Potato virus X, PVX*) y el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus, ToMV*), ambos de transmisión *mecánica* y este último, además por semilla, aunque en este caso, existen fuentes de resistencia.

Entre los integrantes de la familia *Bromoviridae*, en el género *Cucumovirus* se encuentra el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus, CMV*), y en el género *Ilarvirus* está el virus del moteado de la parietaria (*PMoV*). *CMV* es el más cosmopolita de todos los virus conocidos, se propaga fácilmente causando graves daños al hospedante. En tanto, *PMoV* es un virus que se ha logrado controlar gracias a prácticas agrícolas y que actualmente incide levemente en la zona de Cataluña en España. Tanto el virus 2 del espárrago (*Asparagus virus 2, AV2*), como el virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus, SpLV*) pertenecen al género *Ilarvirus* y son en los que se estudiará la función de la proteína 2b.

### 1.3. Familia *Bromoviridae*

El 9º Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) (King *et al.*, 2012) indica que la familia *Bromoviridae* incluye seis géneros: *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus* y *Oleavirus*. Tiene un genoma tripartito de RNA lineal de cadena simple y polaridad positiva (ssRNA+) de ~8 kb de longitud total. Además, los 3 RNAs poseen un extremo 5' terminal con estructura *Cap* (m7G5ppp) de función de protección (Fig. 2). Los extremos terminales 3' no están poliadenilados, pero generalmente son regiones altamente conservadas dentro de la familia y forman estructuras secundarias fuertes.

El ARN 1 (Fig. 2A) tiene ~3400 nucleótidos (nt), es monocistrónico con un marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica la proteína 1a. El RNA 2 (Fig. 2B) tiene ~3100 nt, puede ser mono o bicistrónico dependiendo del género, y codifica las proteínas 2a y 2b según el caso. El ARN 3 (Fig. 2C-C1), tiene ~2200 nt, es bicistrónico y codifica la proteína de movimiento (*3a*, MP) (*ORF proximal*) y la proteína de la cubierta o cápside (*3b*, CP) (*ORF distal*) (Fig. 2C).



**Figura 2.** Organización genómica de los virus de la familia *Bromoviridae*. En azul las regiones de codificación libre, en rosa las proteínas codificadas y, en gris las regiones genómicas no traducidas. Los 3 RNAs tienen una estructura tipo CAP (5'm7G). En las proteínas se señalan los diferentes dominios conservados: Metiltransferasa (MET), Helicasa (HEL), RNA-polimerasa dependiente de RNA (POL), Dominio de Unión al RNA (RBD), Región Hidrofóbica (HR), y la Región de Dimerización (DR). **(A)** RNA1 monocistrónico, codifica la proteína 1a. **(B)** RNA2 monocistrónico, codifica la proteína 2a. Las p1a y p2a son parte de la replicasa viral. **(B1)** RNA subgenómico que codifica la proteína 2b, está presente en los géneros *Cucumovirus* e *Ilarvirus* subgrupos 1 y 2. **(C)** RNA3 bicistrónico, el ORF-3a codifica una proteína de movimiento (MP) y el ORF-3b expresa una proteína de la cápside (CP). **(C1)** ORF-3b traducido a partir de un RNA subgenómico.

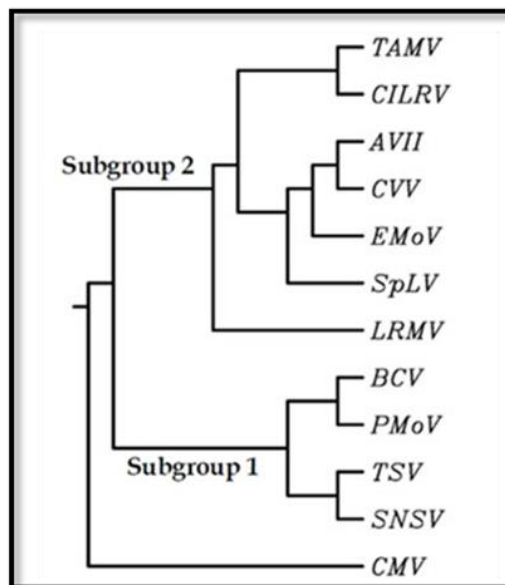
#### 1.4. Género *Ilarvirus*

El nombre *Ilarvirus* se acuñó como una sigla en atención a que son partículas isométricas y lábiles (*isometric labile particles*). Este género está compuesto por 19 especies, organizadas en 4 subgrupos, según la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2013) (Tabla 1). Los viriones son cuasi-esféricos de 26 - 36 nm de diámetro y ocasionalmente baciliformes como en el caso del *SpLV* y tienen genoma ssRNA+ dividido en tres segmentos (King *et al.*, 2012) (Fig. 2). Estos virus son extremadamente lábiles, probablemente debido a que sus partículas están permeadas por numerosos poros según se observó por criomicroscopía electrónica en el virus del rayado del tabaco (*Tobacco streak, TSV*), que es la especie tipo de este género (Almeida *et al.*, 2005). Su labilidad, unida al amplio rango de especies leñosas hospedantes, los convertía en un género recalcitrante, de difícil purificación, manipulación y transmisión mecánica en plantas herbáceas experimentales, entorpeciendo los estudios dirigidos a conocer sus propiedades estructurales y funcionales (Pallás *et al.*, 2013). Sin embargo, *PMoV*, *SpLV* y *AV2*, son *Ilarvirus* con huéspedes herbáceos (Caciagli *et al.*, 1989; Ge *et al.*, 1997; Rafael y Rivera, 1999; Parrella, 2002). A pesar de la dificultad para obtener antisueros, el primer criterio para agrupar los *Ilarvirus* en subgrupos se basó en las relaciones serológicas. Gracias a las técnicas de secuenciación genómica desarrolladas en los últimos años, se ha podido respaldar algunos agrupamientos por homología, y también se han indicado otros menos adecuados (Pallás *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Clasificación del género *Ilarvirus*, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (2012). Con asterisco (\*) las especies incluidas dentro del género en 2014 que aún no se les ha asignado un grupo.

Subgrupo 1	Acronimo	Nombre vernacular
<i>Blackberry chlorotic ringspot virus</i>	BCRV	Virus de la mancha clorótica anular de zarzamora
<i>Parietaria mottle virus</i>	PMoV	Virus del moteado de la parietaria
<i>Strawberry necrotic shock virus</i>	SNSV	Virus shock necrótico de la fresa
<i>Tobacco streak virus</i>	TSV	Virus del estriado del tabaco
<b>Miembros potenciales</b>		
<i>Bacopa chlorosis virus</i>	BaCV	
<i>Tomato necrotic spot virus</i>	TSWV	
<b>Subgrupo 2</b>		
<i>Asparagus virus 2</i>	AV2	Virus 2 del espárrago
<i>Citrus leaf rugose virus</i>	CLRV	Virus del arrugamiento de la hoja de los cítricos
<i>Citrus variegation virus</i>	CVV	Virus del variegado de los cítricos
<i>Elm mottle virus</i>	EMoV	Virus del moteado del olmo
<i>Lilac ring mottle virus</i>	LRMV	Virus de la mancha anular de la lila
<i>Spinach latent virus</i>	SpLV	Virus latente de la espinaca
<i>Tulare Apple mosaic virus</i>	TAMV	Virus del mosaico de la manzana tulare
<b>Subgrupo 3</b>		
<i>Apple mosaic virus</i>	ApMV	Virus del mosaico de la manzana
<i>Blueberry shock virus</i>	BISHV	Virus del shock del arándano
<i>Lilac leaf chlorosis virus</i>	LLCV	Virus de las hojas cloróticas de la lila
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	PNRSV	Virus de los anillos necróticos de Prunus
<b>Subgrupo 4</b>		
<i>Fragaria chiloensis latent virus</i>	FCILV	Virus latente de <i>Fragaria chiloensis</i>
<i>Prune dwarf virus</i>	PVD	Virus del enanismo del ciruelo
<b>Miembros potenciales</b>		
<i>Viola white distortion virus</i>		
<b>Virus incluidos en el 2013</b>		
<i>Humulus japonicus latent virus</i> *	HJLV	Virus latente de <i>Humulus japonicus</i> *
<i>American plum line pattern virus</i> *	APLPV	Virus de los arabescos del ciruelo*

El ARN 1 (Fig. 2A) es monocistrónico y codifica una subunidad de la replicasa viral que tiene un dominio conservado de la RNA-polimerasa dependiente de RNA (POL). El ARN 2 (Fig. 2B) es monocistrónico, excepto en los subgrupos 1, 2 y 4 (Tabla 1) donde es bicistrónico, igual que en el género *Cucumovirus*. Todos los *Ilarvirus* tienen un *ORF* 5'-proximal que codifica una subunidad de la polimerasa viral. Dentro de las especies bicistrónicas, las de los subgrupos 1 y 2, además tienen un *ORF* distal pequeño (~1 kb) (Fig. 2B1) conocido como RNA subgenómico (sgRNA) 4a, que expresa la proteína 2b, y solapa con el extremo 3' terminal del *ORF*-2a (Xin *et al.*, 1998). La proteína 2b se ha detectado en plantas infectadas con *PMoV* y con *SpLV* e incluso se ha podido sintetizar *in vitro* (Xin *et al.*, 1998; door Peeters, 2009). En el *CMV* del género *Cucumovirus* se ha demostrado que la función de la proteína 2b interviene en el movimiento sistémico del virus y actúa como supresor del silenciamiento génico postranscripcional (*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS) (Ding *et al.*, 1995; Brigneti *et al.*, 1998; Mayers *et al.*, 2000). En *Ilarvirus* se desconoce su función, pero se infiere una actividad similar a la de *CMV*-2b por homología de secuencia (Xin *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 2000). Shimura *et al.* (2013), han indicado que la proteína 2b de AV2, tiene acción supresora del silenciamiento génico a nivel sistémico, pero no a nivel local. Dentro del subgrupo 4 de *Ilarvirus*, el virus latente de la frutilla chilena (*Fragaria chiloensis latent virus*, *FCILV*) y el virus del enanismo del ciruelo (*Prune dwarf virus*, *PDV*) (Tabla 1), también presentan un segundo *ORF* en el RNA 2, pero no es homóloga a la de *CMV* ni a la de los miembros de los subgrupos 1 y 2 de *Ilarvirus* (Tzanetakis y Martin, 2005). En la Figura 3 se puede ver la relación filogenética de los subgrupos 1 y 2 del género *Ilarvirus* y de *CMV* basada en la secuencia aminoacídica.



**Figura 3.** Árbol filogenético de los subgrupos 1 y 2 del género *Ilarvirus* según la secuencia de aminoácidos de la proteína 2b.

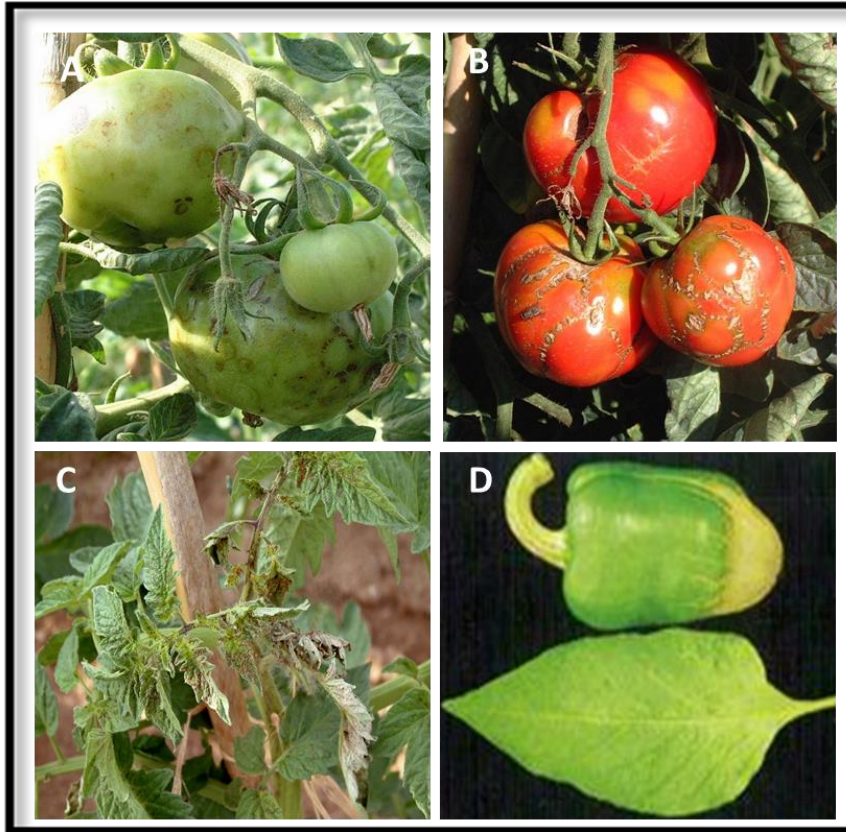
El RNA 3 (Fig. 2C-C1) es bicistrónico, aunque en *FCILV* (Tabla 1), se ha identificado un tercer *ORF* (Tzanetakis y Martin, 2005). El *ORF* proximal (*ORF-3a*) expresa una proteína de movimiento (MP) que presenta los dominios conservados de unión al RNA (*RNA Binding Domain*, RBD) y la región hidrofóbica (*Hydrophobic Region*, HR) (Fig. 2C). El *ORF* distal (*ORF-3b*), también llamado sgRNA 4 expresa una CP (King *et al.*, 2012) que tiene los dominios conservados de unión al RNA (*RNA Binding Domain*, RBD) y de la región de dimerización (*Dimerization Region*, DR) (Fig. 2C1). El gen 3b se transcribe a partir de un promotor que está dentro de la región no codificante del ARN 3 que separa los dos *ORFs*. La CP es una proteína multifuncional implicada en la replicación, traducción, formación del virión y movimiento sistémico. En *Ilarvirus* es esencial para establecer la infección, fenómeno conocido como ‘activación del genoma’ que implica la unión de la CP en sitios específicos de las regiones no traducidas 3’ terminales de los ARNs víricos (Bol, 2005; Pallás *et al.*, 2013), y es un mecanismo regulador de su ciclo vital (Olsthoorn *et al.*, 1999; Aparicio *et al.*, 2001).

### 1.5. Virus del moteado de la parietaria

El *PMoV* pertenece al subgrupo 1 del género *Ilarvirus* y se describió por primera vez en Italia, en la especie arvense *Parietaria officinalis* (Caciagli *et al.*, 1989) causando síntomas de mosaico y moteado, por lo que se le denominó virus del moteado de la parietaria. Luego se distribuyó por el resto de Europa (Marchoux *et al.*, 1999; Roggero *et al.*, 2000; Aramburu, 2001) donde se encontraron distintas cepas en tomate (Aramburu, 2001), pimiento (Janssen *et al.*, 2005) y *Mirabilis jalapa* (Parrella, 2002). *PMoV* se puede transmitir de forma mecánica a un amplio rango de hospedantes de diversas familias (Caciagli *et al.*, 1989, Roggero *et al.*, 2000, Galipienso *et al.*, 2005, Marchoux *et al.*, 2008), aunque también se transmite por semillas y polen a través de vectores como trips y míridos causando infecciones locales o sistémicas (Aramburu *et al.*, 2010).

En el caso de pimiento y tomate, especies hortícolas de importancia económica, la infección solía comenzar en las plantas próximas a la entrada de invernaderos que a su vez estaban cercanos a plantas de *P. officinalis* (Ramasso *et al.*, 1997), explicando así, el flujo de la enfermedad desde esta arvense hacia el cultivo comercial, probablemente a partir de polen infectado transportado por insectos vectores (Aramburu *et al.*, 2010). Los síntomas característicos de *PMoV* en tomate y pimiento incluyen moteado y necrosis foliar, en tanto en frutos induce la formación de anillos corchosos y manchas marrones necrosantes, lo que hace imposible su comercialización (Galipienso *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2005) (Fig. 4). Aunque *PMoV*, también afecta especies arvenses y ornamentales (Lisa *et al.*, 1998; Parrella, 2002). Los síntomas de *PMoV* (Fig. 4) en estos últimos

hospedantes incluyen mosaico amarillo o moteado en *P. officinalis* (Lisa *et al.*, 1998), y mosaico leve, malformaciones foliares de las hojas superiores, y patrones de líneas necróticas en hojas basales en *M. jalapa* (Parrella, 2002).



**Figura 4.** Síntomas de *Parietaria mottle virus* en tomate y en pimiento. **(A y B)** Frutos de tomate con manchas marrones y anillos corchosos. **(C)** Mosaico necrótico en ápice foliar de tomate. **(D)** fruto de pimiento con necrosis avanzada y hoja con moteado claro.

En cuanto a la caracterización molecular de *PMoV*, sólo se han secuenciado tres genomas completos, en el aislado Pe1 en *P. officinalis* (Ge y Scott, 1996; Scott, *et al.*, 2006) y, en los aislados CR8 y T32 en tomate (Galipienso *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2015).

Para la detección de *PMoV*, inicialmente se utilizaron métodos moleculares con resultados inconsistentes (Galipienso *et al.*, 2005). Luego, se desarrollaron procedimientos más efectivos, con enfoques biológicos y moleculares (Galipienso *et al.*, 2005; Galipienso *et al.*, 2008; Aparicio *et al.*, 2009a; Aparicio *et al.*, 2009b), siendo éstos últimos los más robustos y fiables para la detección específica del virus (Aparicio *et al.*, 2016).

Respecto al control de *PMoV*, el método más efectivo y sostenible es la creación de variedades resistentes. Alternativa que no se ha impulsado debido a la efectividad que han tenido las prácticas culturales, al eliminar las plantas de *P. officinalis* que rodeaban los cultivos comerciales (Aramburu



*et al.*, 2010). Sin embargo, en España aún hay registros del virus en la zona de Cataluña, además que existen arvenses asintomáticas, y considerando las altas tasas de mutación de los virus de ARN no se puede descartar la aparición de aislados peligrosos para cultivos hortícolas. Por lo tanto es necesario un conocimiento más profundo de la biología molecular y la evolución del virus para desarrollar estrategias de control duraderas (Aparicio *et al.*, 2016).

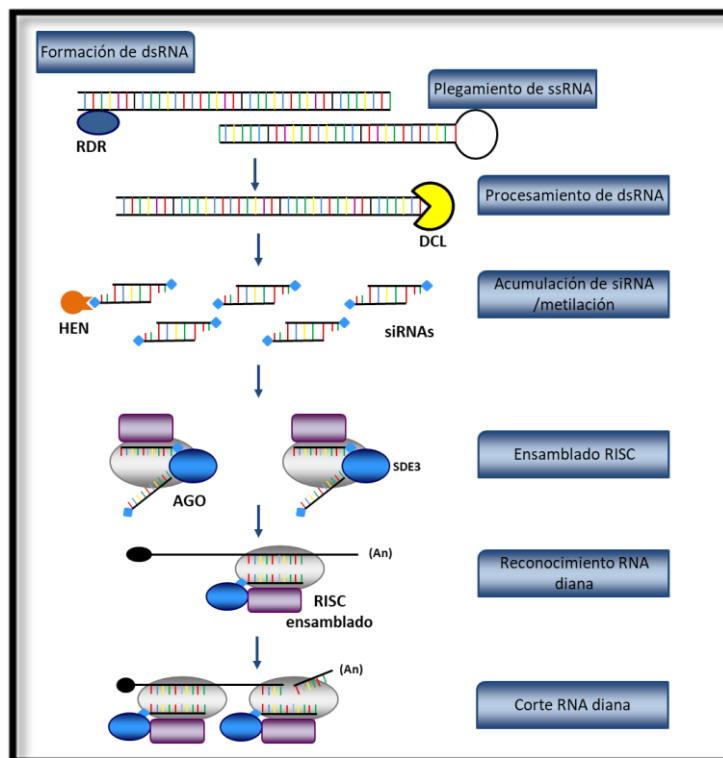
### **1.6. Silenciamiento génico en plantas**

El silenciamiento génico es un sistema de regulación génica complejo, que está dirigido por pequeñas moléculas de RNA (*small interfering RNAs*, siRNA) de 21 a 25 nucleótidos y se ha conservado evolutivamente en organismos eucariota de los distintos reinos (Baulcombe, 2004; Meister y Tuschl, 2004). Este mecanismo cumple distintas funciones a través de diferentes rutas. La primera función biológica conocida fue el mecanismo de defensa antiviral en plantas (Ratcliff *et al.*, 1997; Li y Ding, 2006). Otras funciones incluyen la defensa contra elementos de DNA transponibles a nivel transcripcional y postranscripcional, la regulación de la estabilidad de la cromatina o el control del desarrollo y de la expresión de genes (Lippman y Martienssen, 2004; Malone y Hannon, 2009). En plantas, actúa como sistema inmune protegiendo sus genomas frente al daño de ácidos nucleicos invasores como elementos móviles de DNA, transposones y centrómeros, así como transgenes y virus (Wu-Scharf *et al.*, 2000; Voinnet, 2001). Además, controla procesos de crecimiento y desarrollo, estabilidad genómica y adaptación a condiciones de estrés (Chapman *et al.*, 2004; Brodersen y Voinnet, 2006).

Se pueden dar dos tipos de silenciamiento, por supresión de la transcripción (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) en que se suprime el RNAm a nivel nuclear; o por la activación de un proceso de degradación de RNA específico de secuencia a nivel citoplasmático, en el que los RNAm sintetizados en el núcleo o foráneos son rápidamente degradados (*Post-Transcriptional Gene Silencing / RNA interference*, PTGS / RNAi) (Baulcombe, 2004). En plantas, es una respuesta de defensa vegetal dirigida a limitar las infecciones víricas y la severidad de sus síntomas (Guo y Ding, 2002).

El silenciamiento génico se activa en respuesta a RNAs de doble cadena (dsRNAs) o de RNAs de cadena simple (ssRNAs) con una estructura secundaria compleja (Fig. 5). El dsRNA que se forma por la unión del RNA mensajero (mRNA) y de su RNA complementario es reconocido por ribonucleasas específicas de dsRNA (RNAsa de tipo III) denominada Dicer (DCL) que lo trocea en pequeños fragmentos de RNA, de 21-25 pb que son estabilizados por la metilación en sus extremos 3' hidroxilos por la metiltransferasa Hua enhancer (HEN1) (Bologna y Voinnet, 2014). Las proteínas DICER tienen en sus extremos sitios de unión de ARN y de proteínas argonautas (AGO), por lo que

estos pequeños fragmentos de RNA, los siRNA, se asocian con los complejos efectores de silenciamiento a través de las AGO (Li y Ding, 2006). Luego las AGO se acoplan al complejo inductor de silenciamiento por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), que actúa a nivel citoplasmático, y sirven de guía por complementariedad de secuencia para la degradación del mRNA (Vaucheret, 2008) (Fig. 5). Los siRNA actúan además como elementos móviles de silenciamiento desplazándose entre células adyacentes a través de los plasmodesmos o a larga distancia usando los haces vasculares del floema (Melnik *et al.*, 2011; Molnar *et al.*, 2011). Algunos miRNAs y siRNAs de 21 nts pueden promover la degradación de mRNAs dianas en tejidos distantes (Pant *et al.*, 2008; Carlsbecker *et al.*, 2010; Chitwood *et al.*, 2009) mientras que los siRNAs de 24 nts activan mecanismos de metilación del DNA (Molnar *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Esquema del mecanismo de silenciamiento post-transcripcional en plantas. **(RDR)**, Enzima con actividad RNA polimerasa dirigida por RNA. **(DCL)**, Proteínas Dicer, son ribonucleasas de clase III que procesan secuencialmente los extremos del dsRNA para producir sRNAs maduros de 20-28 nt. **(HEN)**, metiltransferasa (*Hua enhancer methyltransferase*); **(siRNAs)**, pequeño RNA interferente (*small interfering RNA*); **(AGO)**, proteína argonauta que es parte del complejo multienzimático donde los sRNAs actúan como determinantes de especificidad; **(SDE3)**, RNA helicasa; **RISC**, Complejo inductor de silenciamiento por RNA (*RNA-induced silencing complex*).

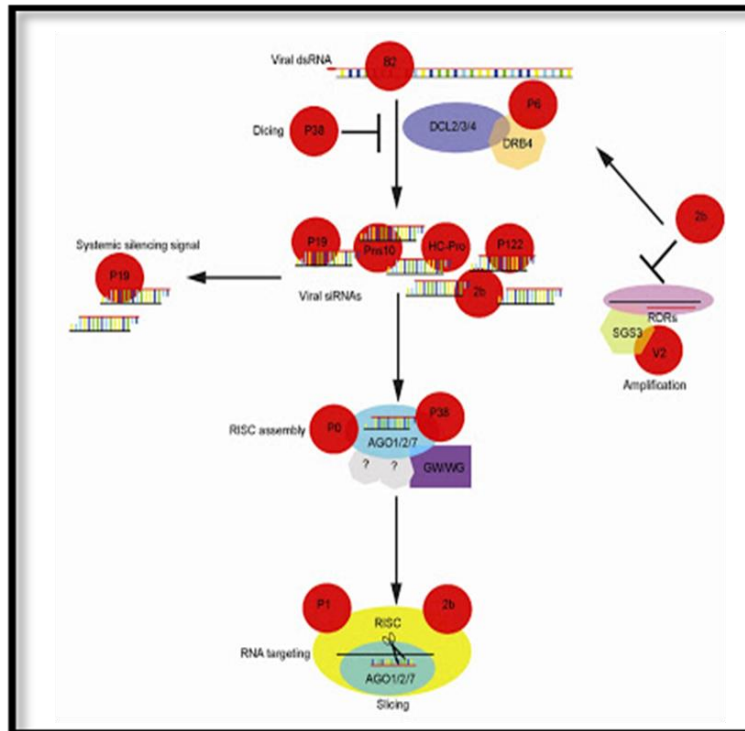
Cabe señalar, que en el ciclo vital de los virus de plantas siempre se forma dsRNA en los pasos intermedios de la replicación del genoma, por lo que son potentes inductores del silenciamiento de RNA (Llave, 2010; Ding, 2010).

### 1.7. Supresión viral del silenciamiento

Los virus han desarrollado estrategias contra-defensivas para inhibir el silenciamiento génico de RNA, que consiste en bloquear algún paso del mecanismo de silenciamiento de la planta. Para ello, codifican proteínas específicas de supresión del silenciamiento por RNA (*viral suppressor of RNA silencing*, VSRs) (Pumplin y Voinnet, 2013; Wicczorek y Obrępalska, 2014; Csorba *et al.*, 2015). Entre los mecanismos de acción de los VSRs se encuentran: inactivar o bloquear la actividad de los complejos efectores de silenciamiento, interferir con la producción y/o estabilidad de siRNAs, bloquear la señal de amplificación del silenciamiento génico e inhibir la ruta de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) (Burguán y Havelda, 2011). Algunos VSRs tienen funciones relacionadas con la replicación, el movimiento y la encapsidación, o actúan como componentes auxiliares de la transmisión viral, como proteasas o como reguladores de la transcripción (Díaz-Pendón y Ding, 2008).

La mayoría de los virus tienen VSRs, pudiendo ser varias, con las que afectan distintas etapas de la ruta de silenciamiento (Ding y Voinnet, 2007; Jiang *et al.*, 2012; Csorba *et al.*, 2015) (Fig. 6). Generalmente, actúan como proteínas de cubierta, replicasas, proteínas de movimiento, factores implicados en la transmisión, proteasas o reguladores transcripcionales (Roth *et al.*, 2004; Burguán y Havelda, 2011; Wang *et al.*, 2012). Los VSRs se relacionan con la patogenicidad y virulencia por estar asociados con la aparición de síntomas durante la infección viral (García y Pallás, 2015); así también, con alteraciones en la expresión de siRNAs endógenos desregulando la expresión de genes celulares (Bazzini *et al.*, 2007; Shimura y Pantaleo, 2011). El primer VSR descrito fue la proteína HCPro (*Helper-component protease*) de potyvirus (Anandalakshmi *et al.*, 1998), aunque actualmente hay un número elevado (Li *et al.*, 1999; Cañizares *et al.*, 2008; Guilley *et al.*, 2009; Andika *et al.*, 2012; Chiba *et al.*, 2013), siendo la proteína 2b de CMV una de las más estudiadas.

El mecanismo de supresión de silenciamiento génico de los virus se utiliza en investigación para favorecer, en *N. benthamiana*, la expresión de una proteína de interés. En el caso de este estudio, se utilizará para la expresión transitoria de proteínas mediada por la infiltración con *Agrobacterium*.



**Figura 6.** Esquema que ilustra la supresión de silenciamiento en plantas mediada por VSRs. En rojo los inhibidores de silenciamiento virales identificados. Los dsRNAs o ARNs de tipo horquilla son detectados y cortados en siRNA por RNasa tipo III o Dicers (DCL2/3/4). El siRNA derivado del virus se ensambla en RISC mediante AGO (AGO1/2/7) y otras proteínas relacionadas que interactúan con AGOs. El RISC cargado con vsiRNA maduro se dirige al ARN viral para cortarlo. Los RDRs de la planta y sus cofactores (SGS3) participan en la amplificación del ARNsi viral secundario. El ARNsi viral también es móvil e induce el silenciamiento sistémico del ARN. Los VSRs evitan el ensamblaje de diferentes efectores o inhiben su función para interrumpir la vía en múltiples pasos (Jian *et al.*, 2012)

## 2. OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Uno de los mecanismos de defensa de las plantas es el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Como respuesta los virus han desarrollado una serie de estrategias en las que usan proteínas propias supresoras del silenciamiento (VSRs). Una de las VSRs más estudiadas es la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV), donde se ha demostrado que interviene en el movimiento sistémico del virus actuando como supresor del PTGS. Por homología en la posición del ORF-2b, se ha propuesto que esa misma proteína 2b en los miembros de los *Ilarvirus*, debería tener funciones similares. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster fue estudiar la posible actividad supresora del PTGS de la proteína 2b a nivel local, en el virus 2 del espárrago (*Asparagus virus 2*, AV2) y en el virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV). Para ello los objetivos parciales fueron:

1. Clonación del ORF-2b de ambos genes en plásmidos binarios bajo la expresión del promotor 35S.
2. Agroinoculación de plantas de *N. benthamiana* 16c y determinar si la proteína 2b desempeña alguna función en la supresión del silenciamiento génico a nivel local.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES.

##### 3.1.1. Material vegetal.

En los ensayos biológicos se utilizó la línea transgénica 16c de *Nicotiana benthamiana* (Fig. 7) que expresa constitutivamente la proteína fluorescente verde (*Fluorescent Protein*, GFP) bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Ruiz *et al.*, 1998), para determinar si existía actividad supresora del silenciamiento de la proteína 2b de los virus AV2 y SpLV.



**Figura 7.** Plántula de *Nicotiana benthamiana* en estadio de 6 hojas verdaderas.

Las plantas se cultivaron en cámaras de ambiente controlado en condiciones óptimas para la especie: 22-24°C, 75-95% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad, sobre un sustrato de turba y vermiculita en proporción 3:1.

##### 3.1.2. Cepas bacterianas.

Para la multiplicación de plásmidos se utilizaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen™) (Taylor *et al.*, 1993). Esta estirpe porta una mutación *recA* que no permite la recombinación y favorece la estabilidad de los plásmidos, y la mutación *LacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos usados habitualmente en clonación.

En los ensayos de expresión transitoria se utilizaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 (Invitrogen™) (Ashby *et al.*, 1988), que presentaban resistencia a kanamicina.



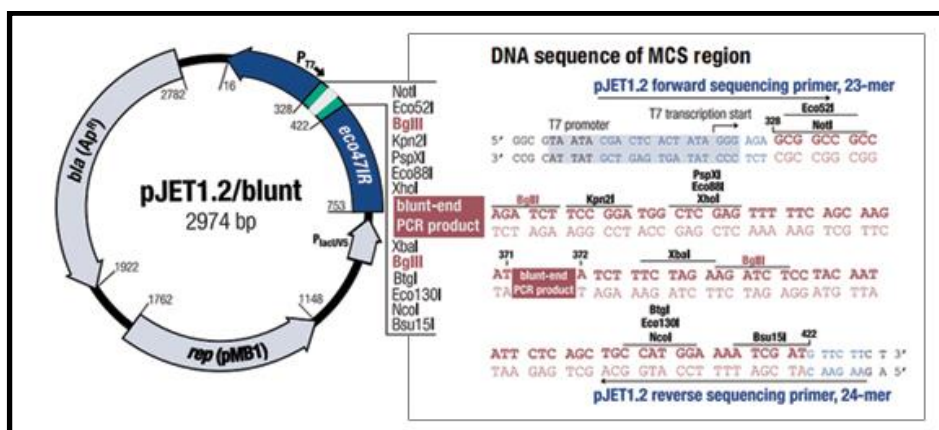
### 3.1.3. Vectores de clonación (plásmidos).

En este estudio se utilizaron dos vectores de clonación y uno de expresión. Los dos primeros, pJET1.2/Blunt y pSK, en pasos intermedios de subclonación para la multiplicación del material de partida y para incorporar un promotor y terminador eucariotas. El último, fue un vector binario, para expresar la proteína en las plantas de *N. benthamiana* 16c.

#### 3.1.3.1. pJET 1.2/Blunt.

Es un plásmido abierto de 2.974 bp con extremos romos donde se pueden ligar insertos de ADN desde de 6 pb a 10 kpb. Tiene la capacidad de clonar fragmentos de ADN de extremos romos. En este caso, se usó para clonar y multiplicar el fragmento de ADN recibido tras el proceso de síntesis química.

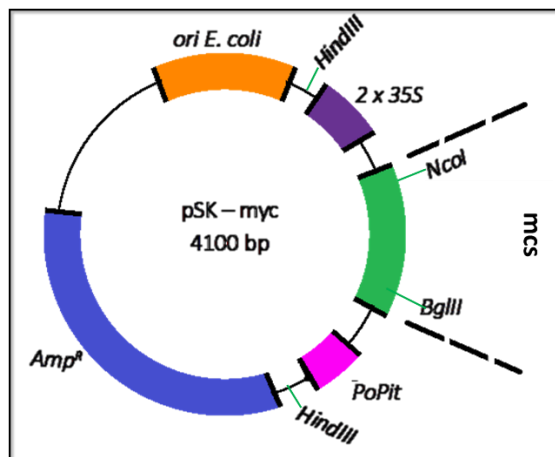
Es parte del kit de clonación CloneJET™ y está equipado con el gen letal *eco47IR* que se interrumpe al ligar un inserto de ADN en el sitio de clonación, permitiendo una selección positiva, ya que sólo las células con plásmidos recombinantes son capaces de propagarse. Este tipo de selección acelera el proceso de identificación de colonias y elimina costes adicionales por selección de color azul/blanco de otros vectores de clonación. Además, presenta el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, utilizado en la selección y mantenimiento de células recombinantes de *E. coli*. Contiene un promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto clonado, un sitio de clonación múltiple expandido, para la cartografía, selección y escisión del inserto; y además sitios de cebadores para identificar el inserto en el paso de PCR de las colonias (Fig. 8).



**Figura 8.** A la izquierda, mapa del vector de clonación pJET1.2/Blunt. **rep (pMB1)**, replicón pMB1, responsable de la replicación del plásmido. **bla (Ap<sup>R</sup>)**, gen  $\beta$ -lactamasa de resistencia a ampicilina. **P<sub>lacUV5</sub>**, promotor de *Plac* modificado para expresar el gen *eco47IR*. **eco47IR**, gen letal de selección positiva del plásmido recombinante. **P<sub>T7</sub>**, promotor T7 de ARN-polimerasa para la transcripción *in vitro* del inserto clonado. A la derecha, sitios de clonación múltiple y secuencias de los cebadores.

### 3.1.3.2. pSK.

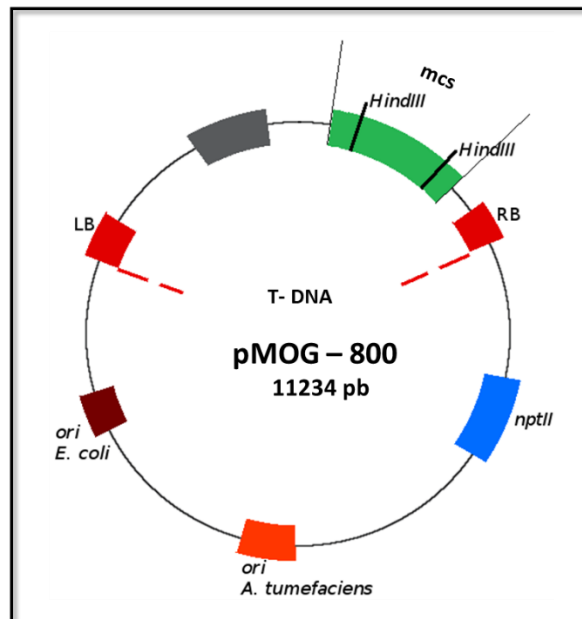
El plásmido pSK (Fig. 9) tiene 4.100 bp y se utilizó para clonar el gen 2b de los virus AV2 y SpLV en un *cassette* de expresión bajo el control del doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus, CaMV*) (Bachan y Dinesh-Kumar, 2012) y el terminador *PoPit* del gen que codifica el inhibidor II de la proteasa de la patata (GenBank X04118). Todo el *cassette* está flanqueado por sitios de restricción *HindIII*. Este plásmido además consta de un sitio de origen de replicación (*ori*) para *Escherichia coli*, el gen *bla* que codifica la  $\beta$ -lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina; y un sitio de clonación múltiple (*mcs*), del cual se utilizaron las dianas de restricción *NcoI* y *BglII* para clonar el inserto de ADN.



**Figura 9.** Esquema del vector de clonación pSK. El *cassette* de expresión está flanqueado por los sitios de restricción *HindIII*. En lila, el sitio del promotor duplicado 35S. En rosa el sitio del terminador *PoPit*. En verde el sitio de clonación múltiple (*mcs*), indicando las enzimas de restricción utilizadas para clonar el inserto de ADN. En azul el gen (**Amp<sup>R</sup>**) que confiere resistencia a ampicilina y en naranja el sitio de replicación para *E. coli* (**ori**).

### 3.1.3.3. pMOG800.

pMOG800 (Fig. 10) es un plásmido binario de 11.234 pb, utilizado en este caso para la agroexpresión transitoria del gen que codifica la proteína 2b mediada por *A. tumefaciens* en plantas de *N. benthamiana*. En el T-DNA presenta el borde izquierdo (LB) y el borde derecho (RB), entre los que se insertó el *cassette* de expresión procedente del vector pSK (promotor 2x35S-secuencia gen 2b-terminador *PoPit*) previa linealización del plásmido con *HindIII*. También consta del gen *nptII* que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa natural y le confiere resistencia a kanamicina. Fuera del T-DNA, hay un origen de replicación para *E. coli* y otro para *A. tumefaciens*, por lo que puede replicarse en ambas bacterias.



**Figura 10.** Esquema del vector de expresión binario pMOG-800. Entre las líneas punteadas en rojo se encuentra el T-DNA flanqueado por el borde izquierdo (**LB**) y el borde derecho (**RB**). Entre ellos se clonará el *cassette* de expresión. Fuera del T-DNA, presenta en naranja un origen de replicación para *A. tumefaciens* y otro en marrón para *E. coli*, con los que puede replicarse en ambas bacterias. Además, en azul, el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*).

## 3.2. MÉTODOS.

### 3.2.1. Reacción de ligación de ADN

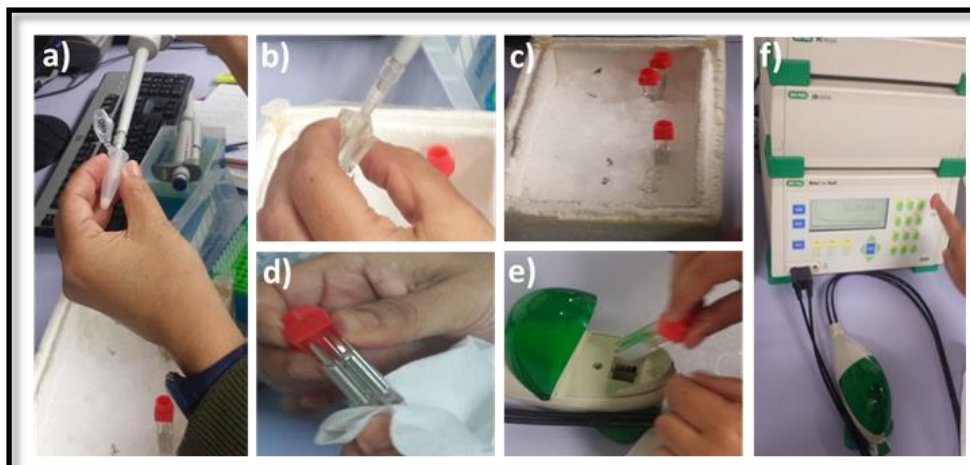
Para ligar un fragmento de ADN en un vector de clonación, previamente se digirieron ambos con las mismas endonucleasas de restricción con el fin de generar extremos cohesivos capaces de unirse entre sí. En algunos casos se ligaron insertos romos de ADN en vectores previamente linealizados. En la reacción de ligación se mantuvo una relación molar inserto:vector de 4:1. El volumen final fue de 10 ó 20  $\mu\text{L}$ , dependiendo de los volúmenes de inserto y de vector utilizados. En la mezcla de ligación, para 10  $\mu\text{L}$  de volumen final, además del ADN del inserto y del vector, se agregaron 1  $\mu\text{L}$  de tampón de ligación 10x T4 ADN-ligasa, y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima T4 DNA-ligasa (5u/ $\mu\text{L}$ ) (Fermentas, Thermo Scientific®), completando el volumen con agua miliQ. Luego se incubó a 22  $^{\circ}\text{C}$  durante 1-2 horas antes de la transformación de células de *E. coli*.

### 3.2.2. Transformación por electroporación.

La incorporación de plásmidos recombinantes en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  o de la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, se hizo mediante electroporación. Con esta técnica se permeabiliza temporalmente la membrana plasmática de la bacteria gracias a su exposición a

un elevado diferencial de potencial que crea un campo eléctrico de alta intensidad permitiendo la incorporación del plásmido recombinante.

Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de bacterias electrocompetentes, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 10%, con 3  $\mu\text{L}$  de la suspensión resultante de la ligación. Se pipeteó la mezcla en una cubeta de electroporación de policarbonato transparente, con electrodos de aluminio en los costados y una ranura de 1 mm, acondicionada en hielo. Se puso la cubeta en la cámara de choque del electroporador Gene Pulser Xcell<sup>®</sup> de Bio Rad, secando previamente los electrodos con papel absorbente para evitar un fallo eléctrico (Fig. 11). Se expuso a un pulso eléctrico de 5 ms, a voltaje constante de 1600 V. Inmediatamente después se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , ajustado todo ello a pH 7 con NaOH) sobre la misma cubeta de electroporación mezclando por pipeteo. Luego se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se dejó incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1h, para que las bacterias se recuperasen del estrés y comenzaran a expresar la resistencia a ampicilina mediante la producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa. Tras la incubación se sembraron las bacterias en medio LB con agar en presencia de ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para asegurar que se conseguían colonias aisladas, el total de células se repartió en dos placas. En una de ellas se sembraron 50  $\mu\text{L}$  y en la otra el resto del cultivo. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que crecieran las colonias. La única diferencia al utilizar *A. tumefaciens*, es que el medio de cultivo lleva rifampicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), tetraciclina (12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y las bacterias se crecen a  $28^{\circ}\text{C}$  en lugar de  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 11.** Proceso de electroporación. (a) y (b) Traspaso de la suspensión del plásmido con el inserto a la cubeta de electroporación. (c) Todo el procedimiento se hace en frío. (d) Secado de la columna para evitar fallo eléctrico. (e) Ubicación de la columna de electroporación en la cámara de choque. (f) Pulso eléctrico de 5 ms en el electroporador.

### 3.2.3. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de las colonias.

**Selección de colonias.** Las colonias de bacterias desarrolladas en placa se recogieron con una punta de pipeta, transfiriéndolas a un microtubo de 1,5 ml, donde se resuspendieron en 10  $\mu$ L de agua miliQ., empleando una parte en la reacción de PCR.

**PCR.** Mediante una reacción de PCR con cebadores de cada uno de los vectores de clonación se confirmó si las colonias que habían crecido en las placas habían incorporado el plásmido recombinante. Para ello se mezcló 1  $\mu$ L de la suspensión en la que se había disuelto la colonia con los componentes de la reacción de PCR (Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 95°C x 3' para la rotura de las bacterias y desnaturalización del ADN y luego 30 ciclos de [94°C x 15" + 55°C x 15" + 72°C x 30" a 120"]. El tiempo de extensión de la PCR varió en función del tamaño de ADN amplificado y para el cálculo se considera que la Taq ADN polimerasa incorpora 1000 nt por cada min de extensión. Para finalizar, tuvo lugar una extensión final de 5 minutos a una temperatura de 72°C.

**Tabla 2.** Componentes de la reacción de PCR utilizada en los procesos de identificación de colonias positivas que habían integrado el plásmido recombinante.

Componente	Volumen
(1) Agua ultrapura	6,80 $\mu$ L
(2) Tampón 10x con MgCl <sub>2</sub>	1,00 $\mu$ L
(3) dNTP (10 mM)	0,20 $\mu$ L
(4) Cebador Directo (10 $\mu$ M)	0,46 $\mu$ L
(5) Cebador Reverso (10 $\mu$ M)	0,46 $\mu$ L
(6) Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L)	0,08 $\mu$ L
(7) Colonia	1,00 $\mu$ L
TOTAL	10 $\mu$ L

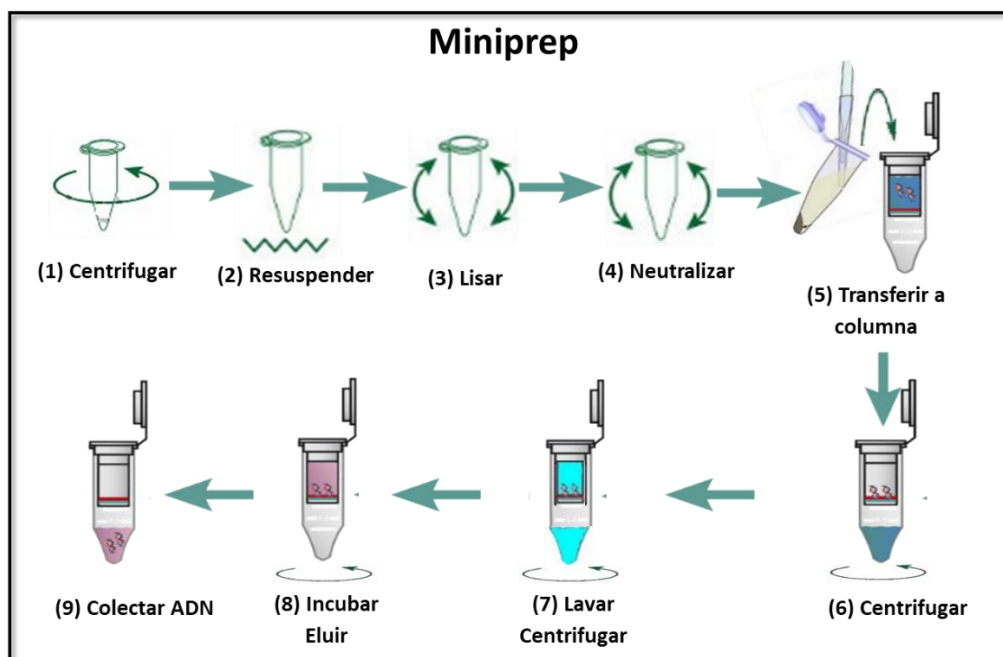
### 3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA), calentando la mezcla hasta su disolución. Una vez preparado el gel, a las muestras se les añadió 1  $\mu$ L de tampón de carga 6 x *ADN Loading Dye* por cada 5  $\mu$ L de muestra y se cargaron en los pocillos del gel. El gel se hizo correr durante 30 min a un voltaje constante de 120 V. Posteriormente, se tiñó el gel con

bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15-20 minutos a temperatura ambiente y se expuso a luz UV en un transiluminador (BIORAD). Para determinar el tamaño de cada fragmento se usó el marcador GeneRuler™ 100 pb Ladder Plus.

### 3.2.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa o procedentes de bacterias (miniprep).

Con este procedimiento se purificaron fragmentos específicos de ADN separados en geles de agarosa o ADN plasmídico procedente de las bacterias recombinantes. En ambos casos se utilizó un protocolo de extracción por centrifugación (Fig. 12). Los fragmentos de gel con los ADN deseados se cortaron con un bisturí bajo luz ultravioleta. Se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, se pesaron y se les añadió 3 volúmenes de tampón de disolución de agarosa (*Binding Buffer QG*) por volumen de gel, según lo indicado en el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Después, se incubó a 50°C en un termobloque hasta fundir por completo. La mezcla se transfirió directamente a la columna de purificación (Fig. 12-5) y se siguió desde el paso 6 el protocolo de la figura 12.



**Figura 12. Purificación de ADN.** (1-5) Sólo es necesario en caso de partir de cultivo de bacterias, con el objetivo de liberar el plásmido recombinante. **(1)** Centrifugar 3 ml de suspensión bacteriana. **(2)** Resuspensión del pellet de bacterias. **(3)** Lisis bacteriana. **(4)** Neutralización de la solución de lisis para evitar degradar el ADN. **(5)** Centrifugar 5 min y transferencia del sobrenadante a una columna de purificación. **(6)** Centrifugar 1 min y descartar el flujo. **(7)** Lavar 2 veces y centrifugar 1 min cada vez, descartando el flujo. Centrifugar 1 min para eliminar restos de solución de lavado **(8)** Transferir la columna a un microtubo de 1,5 ml y añadir tampón de elución, e incubar por 2 min. **(9)** Descartar la columna y almacenar el ADN plasmídico purificado a -20 °C.

Para la extracción de plásmidos recombinantes se siguió el protocolo de extracción por centrifugación del kit GeneJET que se indica en la figura 12. Primero se sembraron 9 µL de la suspensión bacteriana, provenientes del paso de la PCR de colonias, en 4 ml de medio líquido de LB con el antibiótico correspondiente en tubos de ensayo de 10 ml. Luego se incubaron a 37°C en agitación durante 18 horas. Después, se precipitaron 3 ml de la suspensión bacteriana y se resuspendieron en 250 µL de solución de resuspensión. Se añadieron 250 µL de solución de lisis (SDS y NaOH) para romper las células bacterianas y se mezcló por inversión cuidando de no superar los 5 min para evitar la desnaturalización del ADN. Luego, se neutralizó con 350 µL de solución de neutralización mezclando (todas las reacciones están incluidas en el kit de extracción). De aquí en adelante se hacen sucesivas centrifugaciones, donde primero se traspasa el sobrenadante a una columna de purificación, se lava dos veces con solución de lavado y se eluye el ADN con 30 ó 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. El ADN eluido se guardó a -20°C hasta su uso.

### 3.2.6. Reacción de digestión de ADN

Se realizaron diversas digestiones con enzimas de restricción (Tabla 3), con el fin de clonar el gen 2b en el *cassette* de expresión y posteriormente en el vector binario. Primero se extrajo el gen 2b del plásmido pJET1.2/Blunt con las enzimas *Nco*I y *Bgl*II, para clonarlo en el plásmido pSK, cortado con las mismas enzimas. Se utilizaron 8 µL de ADN del plásmido, 4 µL de Buffer Tango 10 x, 1 µL de cada enzima y el agua necesaria hasta completar 20 µL. Después se hizo otra digestión, para extraer el *cassette* de expresión del plásmido pSK con su promotor y terminador eucariotas, y ligarlo en pMOG. Tanto el plásmido recombinante como pMOG, se cortaron con las enzimas de restricción *Hind*III. En este caso se utilizaron 2 µL de ADN, 1,5 µL de Buffer 10 x, 1 µL *Hind*III y agua hasta completar 15 µL de volumen final. Todas las mezclas de digestión se incubaron a 37°C durante 1-2 h.

**Tabla 3.** Enzimas de restricción, bacteria de donde se extrae y su secuencia con el sitio de corte.

Enzima	Bacteria de donde se extrae	Secuencia y sitio de corte
- <i>Nco</i> I	<i>Nocardia coralline</i>	5'...C <sup>^</sup> CATGG...3' 3'...GGTAC <sup>^</sup> C...5'
- <i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globiggi</i>	5'...A <sup>^</sup> GATCT...3' 3'...TCTAG <sup>^</sup> A...5'
- <i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...A <sup>^</sup> AGCTT...3' 3'...TTCGA <sup>^</sup> A...5'

### 3.2.7. Secuenciación de ácidos nucleicos.

La integridad nucleotídica se comprobó por secuenciación, después de cada restricción para asegurar que la construcción se haría con la región correcta. Para ellos, se enviaron alícuotas de 5 -10  $\mu$ L del plásmido purificado al Servicio de secuenciación del IBMCP (CSIC-UPV). En cada caso se aportó un cebador específico (3,2  $\mu$ M) para secuenciar la región de interés.

### 3.2.8. Análisis informático.

Se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de la secuencia de la proteína 2b de ambos virus; y se analizó con el programa *Restriction Map*<sup>®</sup> para determinar los sitios de corte incluidos de forma natural en la secuencia. Luego, con el resultado de la secuenciación del ADN purificado en cada subclonación, se hizo un análisis de alineamiento nucleotídico con la herramienta informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI y se comprobó que no hubiese ningún codón de parada. Además, se contrastaron las secuencias de referencia en relación a la secuenciada a partir de una muestra. Así también, se tradujeron a sus correspondientes secuencias polipeptídicas mediante el uso del portal ExpASY ([www.expasy.org/tools/translate](http://www.expasy.org/tools/translate)).

### 3.2.9. Expresión transitoria de hojas de *N. benthamiana* 16c, por transformación de *A. tumefaciens* cepa C58C1.

Este paso se realizó para expresar transitoriamente la supuesta proteína 2b de los virus AV2 y SPLV. Para ello, las colonias transformadas de *A. tumefaciens* cepa C58C1, se hicieron crecer toda la noche en un medio líquido con LB y los antibióticos correspondientes. Las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de tampón de infiltración (10 mM  $Mg_2Cl$ ; 10 mM MES-NaOH pH 5,6). La densidad óptica del cultivo se midió a 600 nm ( $DO_{600}$ ) en un espectrofotómetro. Los cultivos se diluyeron en solución de infiltración hasta alcanzar la densidad óptica de 1, se añadió acetosiringona a una concentración final de 150  $\mu$ M, y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Después, se agroinfiltró el envés de hojas de *N. benthamiana* 16c, haciendo un pequeño corte y usando una jeringuilla sin aguja que portaba la suspensión bacteriana (Fig. 13). Las plantas se incubaron 24 h a 28°C.



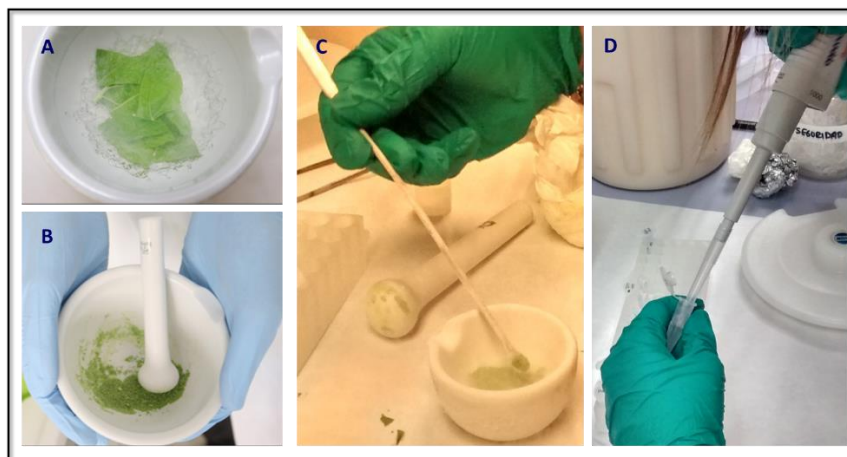


**Figura 13.** Agroinfiltración del envés de la hoja de *N. benthamiana* 16c mediante jeringuilla con suspensión de *A. tumefaciens*.

### 3.2.9.1. Análisis de proteínas a partir de hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.

#### 3.2.9.1.1. Muestra vegetal.

En un microtubo de 2 ml, se colectó 1 hoja de cada muestra y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La muestra se mantuvo siempre congelada, transportándola en nitrógeno líquido para su manipulación. Se pulverizó en un mortero de porcelana y se cogieron 50 mg en un microtubo de 1,5 ml y se le agregan 2 volúmenes de tampón de extracción.



**Figura 14.** Preparación de la muestra vegetal para análisis *western-blot*. La muestra siempre se mantiene congelada. **(A)** Hojas en nitrógeno líquido. **(B)** Pulverización de la muestra en mortero de porcelana. **(C)** 50 mg de muestra cogidas con cucharilla. **(4)** Preparación de la muestra con tampón para cargar el gel.

### 3.2.9.1.2. Western - blot

Las muestras se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción, preparado a partir de una mezcla de 900  $\mu\text{L}$  (glicerol 15%, SDS 2%, TRIS 175 mM pH 8.8) y 100  $\mu\text{L}$  DTT. Luego se incubó a 95°C durante 10 min para inducir la desnaturalización proteica. Después, las muestras se clarificaron por centrifugación durante 30 s y se cargaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en el gel de poliacrilamida.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical desnaturalizante en un gel discontinuo de poliacrilamida. En la fase inferior se ubicó el gel de resolución (14% SDS-PAGE) donde se separaron las proteínas de interés, y en la fase superior el gel de apilamiento (10% SDS-PAGE) cuya función es concentrar las proteínas y lograr una migración uniforme. Ambos geles se preparan de la misma forma, salvo el tampón TRIS-HCl que en el gel superior fue 1 M pH 6,8 y en el gel de resolución fue 1,5 M pH 8,8. El resto de componentes son: Acrilamida 40%, SDS 20%, PSA 10%, TEMED 1% y agua hasta completar el volumen deseado. Una vez polimerizada la acrilamida, los geles se montaron en cubetas de electroforesis y se cubrieron con tampón (0,025 M Tris-HCl pH 8,3; 0,2 M glicina; 1% SDS). La electroforesis se llevó a cabo a 35 mA durante 2 h. Se utilizó el marcador de peso molecular para proteínas BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder de Invitrogen.

Tras su separación por PAGE-SDS, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polivinilideno fluoruro, Amersham) del mismo tamaño que el gel. La membrana fue tratada previamente, sumergiéndola en metanol al 100% durante 1 min, seguido de 3 lavados de 5 minutos con agua destilada. La transferencia de proteínas a la membrana se realizó con el equipo de transferencia semiseca TE 70 de Hoefer™. Para ello, la membrana y el gel se colocaron entre papeles whatman 3MM humedecidos con tampón de electrotransferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina). La transferencia de las proteínas se realizó mediante la aplicación de un campo eléctrico constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 1 h.

Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con caseína manteniéndola sumergida durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada y solución TBST (TBS 1x más Tween 20 0.3%). Después se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en solución de hibridación (5% de leche desnatada en solución TBST) a la que se añadió el antisuero específico contra la proteína myc (en dilución 1:7.000). Le siguieron 3 lavados de 10 min a temperatura ambiente, en 25 ml de tampón TBST para eliminar el exceso del anticuerpo de la membrana. Una vez lavada, la membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente con

solución de hibridación a la que se añadió el anticuerpo secundario (dilución 1:10.000), que reconoce la fracción constante del anticuerpo anti-myc, conjugado a fosfatasa alcalina. Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 min cada uno a temperatura ambiente con tampón TBST y un lavado de 5 min a temperatura ambiente con TBS.

La membrana se reveló preparando un sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina que llevaba el anticuerpo secundario, según lo indicado en el kit de revelado fotosensible ECL plus Western Blotting System de Amersham. La solución que contenía el sustrato se aplicó sobre la membrana en oscuridad por 5 min. Todo el proceso de revelado se realizó en oscuridad, donde la membrana se expuso a una película autorradiográfica (Amersham) durante 15 seg para su revelado y se detectó la señal quimioluminiscente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proteína 2b del Cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) tiene función supresora de silenciamiento y es un conocido determinante de la patogenicidad de este virus. Por homología en cuanto a organización genómica se ha propuesto que el marco de lectura abierta presente en la misma posición de algunos *Ilarvirus* debería tener una función similar. Dentro de este género, estudios previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que la p2b de PMoV no actúa como supresor del PTGS. Sin embargo, se ha descrito que la misma proteína de AV2 presenta actividad supresora del silenciamiento génico a nivel sistémico, pero no a nivel local (Shimura *et al.* 2013). El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster consiste en evaluar la posible función supresora de silenciamiento de la proteína putativa 2b a nivel local, del virus 2 del espárrago (*Asparagus virus 2*, AV2) y en el virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV).

##### 4.1. Obtención, clonación y comprobación de la secuencia nucleotídica de la supuesta proteína 2b de AV2 y SpLV.

###### 4.1.1. Obtención de la secuencia de partida

El gen que codifica la proteína 2b se puede amplificar por RT-PCR con cebadores adecuados a partir de material vegetal infectado con cada uno de los virus. Sin embargo, este es un procedimiento largo y complejo y, además en nuestro grupo no disponemos de los virus AV2 y SpLV, por lo que obtuvo la secuencia del ORF 2b de la base de datos del Genbank. Se obtuvo la secuencia del ORF-2b de AV2 (GenBank AB745636.1) (figura 15) y de SpLV (GenBank NC\_003809.1) (Fig. 16) de la base de datos del GenBank y se solicitó la síntesis química a *Invitrogen™ GeneArt™* de *Thermo Fisher Scientific*. En las figuras 15 y 16, se muestran también las secuencias de polipéptidos codificadas por el gen 2b de cada virus.

**ATG**aatgctcaaaggaagtgtcaaaaatttcccacaccgacggagctcgcgtggacgctgggaatttattc  
 ccaagattaagtccgatgatgattaccggatttttccctaattggatgcttagcaccattagaggctcgtcag  
 tttccaagactgactgctgggttcaggaaagtgtccgacaccgccagctcaattggtaataaaaaataccagac  
 ctgcgaatcgatttccgagctgaaggagttcaccacaccagcgggttggatttcaaaccggttaccgccgaatc  
 atcggcgaagttcctaaaggttggtatgggttgaagtccctggctcttccccaattatggagatgtggtgaca  
 gggctgaaaagggccgcacgggctaaagtgcatttttctattccgggttctgattgggcttatacaactcaat  
 ctatccgatgtgggttctgggcttgactaccacagttaccaattcctgagaaatatctcaagatgccatt  
 tcttttgaaatggatgattccgtctttgggtgacagaatttctgatcgagtaccatctccatgggtacctcggg  
 caa**TGA**

MNAQRKVKISHTD GARVDAGNLF PRLSPMMITGFFLMVILAPLEARQFPRLTAVQESAPTPPAQLVIKIPDLAIDFELKEF  
 TNPAVVIQTVYRRIIEVPGKWYGLKSWSSSNYGDVVTGLKRAARAKVHFSIPGSDWAYTLNLSDDVVSGLALPKLPIPEKYL  
 KMPISFEMDDSVFGDRISDRVPSWPWYLGQ

**Figura 15.** Secuencia del nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del gen 2b de AV2 (aislado de México; GenBank: AB745636.1). En mayúscula de rojo y negrita, los codones de inicio (ATG) y de parada (TGA). En turquesa se indica el sitio de corte interno *Nco*I: C<sup>^</sup>CATGG.

**ATG**gatgctgatgtaatacaaggaacagatgattcgttctcacggaaaaagaatcgtggatgctgggagtatg  
 tcccaaagatggtgcagactgatgtgtctgttctgttactgataaatctttccacagtaacagaggctcgt  
 cgggttcccccaaccgattgctgggtgatggagggtgctccagatccgccagctcgattggtagtaaaaatacca  
 aacctcgccatagatttccgagctgcaggagttcaccacaccagcggctcgtgatccagaccgtataccgccga  
 atcatcgacgaagtgcctaaaggttggtatgggtttaaagtcctggctcttccccaattatggagacgcttggtg  
 gccggactaaaaagggctgcacgagttaaagtgcatttttctataccgggttcagattgggcttatacctta  
 aatctgtccgaagtggatctgtgggttagcactccccaaattaccaattcccagaaatatctcaggatgccg  
 attgctatcacaatcgatgataccgtcaataaaaattggcgtatgggtttgatgatgtaccatctccatgggtac  
 ttgatcaaa**TGA**

MDAMLIKEQMIRSHGKRIVDAGSMSQRCCRLMCLLLLINLSTVTEARRFPQPIAVMEGAPDPPARLVVKIPNLAIIDFELQ  
 EFTNPAVVIQTVYRRIIDEVPGKWYGLKSWSSSNYGDVAVGLKRAARVKVHFSIPGSDWAYTLNLSDDVVSGLALPKLPIPEK  
 YLRMPIAITIDDTV NKIGDGFDDVPSWPWYLYQ

**Figura 16.** Secuencia del nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del gen 2b de SpLV. (GenBank: NC\_003809.1). En mayúscula de rojo y negrita se indican los codones de inicio (ATG) y de parada (TGA). En turquesa se indica el sitio de corte interno *Nco*I: C<sup>^</sup>CATGG.

Para facilitar el proceso de clonación, a cada gen se añadieron las dianas de restricción *Nco*I (C<sup>^</sup>CATGG) en el extremo 5' y *Bgl*II en el extremo 3' (A<sup>^</sup>GATCT), precedidas de 5 nucleótidos AAAAA para optimizar la posterior restricción. Además, ambas secuencias se etiquetaron con el epítipo *myc*, que es una secuencia reconocida por un anticuerpo comercial, para comprobar la correcta expresión de las proteínas (Figuras 17 y 18). La secuencia peptídica de la etiqueta *myc* es: -EQKLISEEDL - (1202 Da), puede fusionarse en el extremo C-terminal o en el extremo N-terminal de una proteína y está codificada en la secuencia de nucleótidos GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG. Además, ambas secuencias del gen 2b se analizaron con el programa informático *Restriction Map*<sup>®</sup> (Anexos 1-4) para determinar los sitios de restricción incluidos de forma natural en cada una y confirmar la ausencia de corte de los enzimas *Nco*I y *Bgl*II. Tanto la secuencia de AV2 como la de SpLV presentaban el sitio CCATGG (marcado en

color turquesa en las figuras 15 y 16), por lo que se hizo una mutagenización *in silico* de la adenina por una timina en las posiciones 598 y 570, respectivamente. Gracias a la flexibilidad entre codones, en ambos casos siguió codificando el aminoácido prolina (Figuras 17 y 18). La secuencia de síntesis química solicitada puede verse en las Figura 17 (AV2) y 18 (SpLV), así como la de sus proteínas cosificadas.

**AAAAA**CCATGgaacaaaaaactcatctcagaagaggatctgaa\_tgctcaaaggaaagtgtcaaaaatttccca  
 caccgacggagctcgcgtggacgctgggaattttattcccaagattaagtccgatgatgattaccggattttt  
 cctaattggtgatcttagcaccattagaggctcgtcagtttccaagactgactgctggttcaggaaagtgtctcc  
 gacaccgccagctcaattggtaataaaaaataccagacctcgcaatcgatttcgagctgaaggagtccaccaa  
 cccagcggttgttattcaaaccgtttaccgocgaatcatcggcgaagttcctaaagggttggtatggtttgaa  
 gtctctggtcttctccaattatggagatgtggtgacagggctgaaaaggccgcacgggctaaagtgcattt  
 ttctattccgggttctgattgggttatacactcaatctatccgatgtggtttctgggcttgactacccaa  
 gttaccaatttctgagaaatatctcaagatgcccattttcttttgaaatggatgattccgtctttggtgacag  
 aatttctgatcgagtaccatctccttggtacctcgggtcaa**TGA**AGATCT**AAAAA**

**M**EQKLISEEDLNAQRKVKISHTDGARVDAGNLPRLSPMMITGFFLMVILAPLEARQFPRLTAVQESAPTPPAQLVIKIPDL  
 AIDFELKEFTNPAVVIQTVYRRIIGVEVPKGWYGLKSWSSSNYGDVVTGLKRAARAKVHFSIPGSDWAYTLNLSDVVSGLALPK  
 LPIPEKYLKMPISFEMDSDVFGDRISDRVPSPWYLGQ

**Figura 17.** Secuencia de nucleótidos solicitada para la síntesis química del gen que codifica la supuesta proteína 2b de AV2 (GenBank: AB745636.1) con los sitios de corte *Nco*I: C<sup>^</sup>CATGG en turquesa y, *Bgl*III: A<sup>^</sup>GATCT en verde. En mayúsculas de rojo y negrita los codones de partida (ATG) y de parada (TGA). En amarillo y subrayado la secuencia del epítipo *myc*. En minúscula de rojo y subrayada, el nucleótido que se mutagenizó *in silico*, para eliminar el sitio de corte interno *Nco*I (a→t). En la secuencia de aminoácidos se muestra en amarillo y subrayado la secuencia del epítipo *myc*.

**AAAAA**CCATGgaacaaaaaactcatctcagaagaggatctgga\_tgctcaaaggaaagtgtcaaaaatttccca  
 ttctcacggaaaaagaatcgtggatgctgggagatgtcccaaagatggttcgactgatgtgtctgttctt  
 gttactgataaatctttccacagtaacagaggctcgtcggtttccccaaccgattgctggtgatggagggtgc  
 tccagatccgccagctcgattggtagtaaaaaataccaaacctcgccatagatttcgagctgcaggagttcac  
 caaccagcggctcgtgatccagaccgtataccgocgaatcatcgacgaagtgcctaaagggttggtatggttt  
 aaagtctggtcttctccaattatggagacggttggcgggactaaaaagggtgcacgagttaaagtgca  
 tttttctataccgggttcagattgggttataccttaaatctgtccgaagtggatctggttagcactccc  
 caaattaccaattcccagagaaatatctcaggatgocgattgctatcacaatcgatgataccgtcaataaaat  
 tggcgatggttttgatgatgtaccatctccttggtacttgatcaa**TGA**AGATCT**AAAAA**

**M**EQKLISEEDLDAMLIKEQMIRSHGKRIVDAGSMSQRCCRLMCLLLLINLSTVTEARRFPQPIAVMEGAPDPPARLVVKIP  
 NLAIQFELQFTNPAVVIQTVYRRIIDEVPGWYGLKSWSSSNYGDVVAGLKRAARVKVHFSIPGSDWAYTLNLSVVSGL  
 ALPKLPIPEKYLRMPIAITIDDTVNIKIGDGFDDVPSPWYLYQ

**Figura 18.** Secuencia de nucleótidos solicitada para la síntesis química del gen que codifica la supuesta proteína 2b de SPLV2 (GenBank: NC\_003809.1) con los sitios de corte *Nco*I: C<sup>^</sup>CATGG en turquesa y, *Bgl*III: A<sup>^</sup>GATCT en verde. En mayúsculas de rojo y negrita los codones de partida (ATG) y de parada (TGA). En amarillo y subrayado la secuencia del epítipo *myc*. En minúscula de rojo y subrayada, el nucleótido que se mutagenizó *in silico*, para eliminar el sitio de corte interno *Nco*I (a→t). En la secuencia de aminoácidos se muestra en amarillo y subrayado la secuencia del epítipo *myc*.

#### 4.1.2. Subclonación en pJET1.2/Blunt

Después de recibir el producto de la síntesis química, se clonó en pJET1.2/Blunt con el objetivo de multiplicar y disponer de suficiente cantidad para posteriores manipulaciones. Tras la ligación, se transformó en *E. coli* y se seleccionaron colonias recombinantes. Se obtuvo la ligación pJET-2b de AV2 en el clon 20 y de SpLV en el clon 33.

La correcta clonación del gen de interés en el vector pJET1.2/Blunt se comprobó por PCR a partir del ADN purificado de cada plásmido recombinante, utilizando los cebadores reverso (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') y directo (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), específicos del vector de clonación. Posteriormente, la correcta síntesis se comprobó mediante secuenciación de los clones citados anteriormente. Se hizo un alineamiento con el programa informático BLASTn-suite del NCBI, en el que se compararon las secuencias de ADN de los plásmidos recombinantes con las secuencias de síntesis químicas previamente solicitadas, a fin de comprobar que no se había producido ningún error durante el proceso de síntesis química. La secuencia del ADN plasmídico pJET-2b de AV2 (clon 20) y pJET-2b de SpLV (clon 33), se puede ver en las figuras 19 y 20, respectivamente, y la identidad de secuencias del 100% en ambos casos en los Anexos 5 y 6.

```
ctattagatggctcgagtttttcagcaagataaaaaccATGaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaa
tgctcaaaaggaaagtgtcaaaaatttcccacaccgacggagctcgcgtggacgctgggaatttattcccaaga
ttaagtccgatgatgattaccggatTTTTcctaattggtgatcttagcaccattagaggctcgtcagtttccaa
gactgactgcggttcaggaaagtgtcctccgacaccgccagctcaattggttaataaaaataccagacctcgcaat
cgatttcgagctgaaggagttcaccaaccagcggttgttattcaaacgtttaccgccaatcatcggcgaa
gttcctaaaggttggtatggtttgaagtctcctccaattatggagatgtggtgacagggctgaaaa
gggccgcacgggctaaagtgcatttttctattccgggttctgattgggcttatacactcaatctatccgatgt
ggtttctgggcttgactacccaagttaccaattcctgagaaatatctcaagatgcccatttcttttgaaatg
gatgattccgtctttggtgacagaatttctgatcgagtaccatctccttggtacctcgggtcaaTGAagatctc
aaaatctttctagacctacaatattctcagctgccatggaaaatcgatggttcttcttttattctctcaagatt
ttcaggctgtatattaaaacttatattaagaactatgctaaccacctcatcagaaccggtgtaggtggccgtg
ggtttcttggaatcgactctcatgaaaactacgagctaaatattcaatatgttcctcttgaccaactttat
tctgcatttttttgaacgagtttagagcaagcttcagaaactgagacaggaatttataaaaatttaaat
tgaagaaagtcagtatagcatccattttgcttgcagtctcaggcatctaacaaaagacgtcttttttgacat
gtttaagttaaacctcctggtgtgaaattatatccgctcataatccacacattatacagccagagcttaagt
gtaaggcttggggtgactagatgactaactcatatgctgcctcatgcaatgcatcagtggaacaa
```

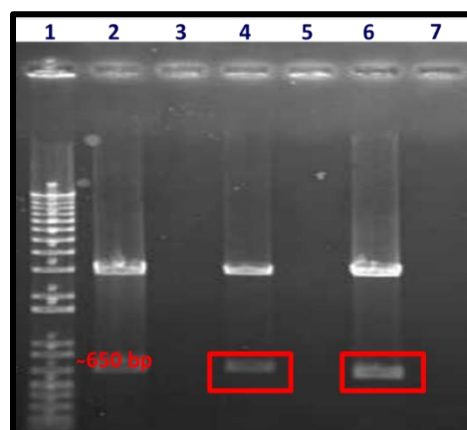
**Figura 19.** Secuencia del clon 20 de AV2. Se muestra en gris la secuencia del vector pJET1.2/Blunt. En rojo y mayúsculas las secuencias del codón de partida (ATG) y del codón de parada (TGA). En amarillo y subrayada la secuencia que codifica el epítipo *myc*. Este vector se digirió con *Nco*I (C<sup>^</sup>CATGG), en turquesa y, con *Bgl*II (A<sup>^</sup>GATCT) en verde para subclonar en el plásmido pSK.



Cattagatggctcgagtttttcagcaagataaaaa**ccATGg**aacaaaaactcatctcagaagaggatctggat  
 gcgatgtaatacaaggaacagatgattcgttctcacggaaaaagaatcgtggatgctgggagatgtcccaa  
 gatgttcagactgatgtgtctgttctgttactgataaatctttccacagtaacagaggctcgtcggtttcc  
 ccaaccgattgCGGTGATGGAGGTGCTCCAGATCCGCCAGCTCGATTGGTAGTAAAAATACCAAACCTCGCC  
 atagatttcgagctgcaggagttaccaaccagcggctcgtgatccagaccgtataaccgccgaatcatcgacg  
 aagtgcctaaaggttggtatggtttaaagtcttcttccaattatggagacggttggtggcggactaaa  
 aagggtgcacgagttaaagtgcatttttctataaccgggttcagattgggcttataccttaaatctgtccgaa  
 gtggtatctgggttagcactcccaaattaccaattcccagaaaatatctc**agg**atgccgattgctatcacia  
 tcgatgataccgtcaataaaa**att**ggcgtatggttttgatgatgtaccatctccttgggacttgtatcaa**TGA**g  
**atct**aaaaatctttctagagatctcctacataattctcagctgccatggaaaatcgatgttcttcttttattct  
 cctcagattttcagctgttttattaaaacttattattagactatgctaccacctcatcagacgtgtaggtggg  
 cgggtgggttttcttggcatcgacctctctcatgaaactacgagctaaatattcaatataatgttctctgacac  
 ttattctgcatttttttgacgagtttaaagcaggctcagaactgaaacgatttataaaatgatttgaaaag  
 tcagtatagcatcatttttgcttgcagtctcacgcacctaacaagacgcttctttgaaagggttagtaacct  
 cgtgtgaaatataacgcctatccacaccattacagcggaaaccaagtaaccgggtgcgcataaggtaggtaat

**Figura 20.** Secuencia del clon 33 de SpLV. Se muestra en gris la secuencia del vector pJET1.2/Blunt. En rojo y mayúsculas las secuencias del codón de partida (ATG) y del codón de parada (TGA). En amarillo y subrayada la secuencia que codifica el epítipo *myc*. Este vector se digirió con *Nco*I (C<sup>^</sup>CATGG), en turquesa y, con *Bgl*II (A<sup>^</sup>GATCT) en verde para subclonar en el plásmido pSK

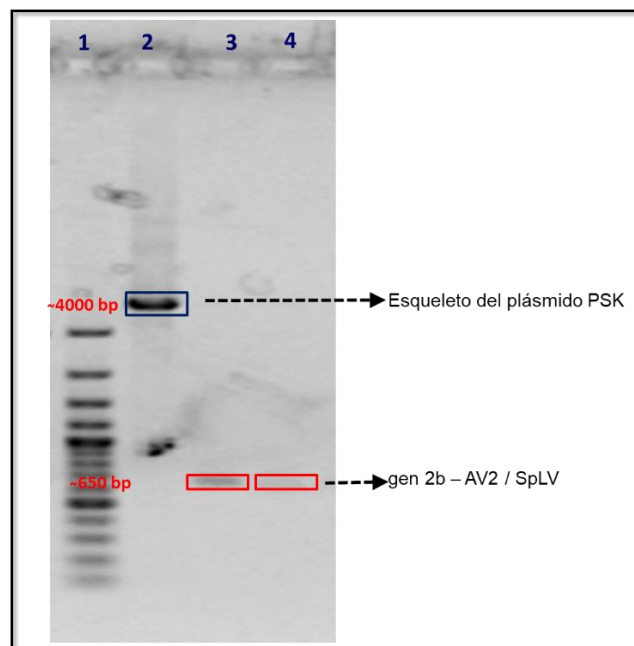
Comprobada la secuencia correcta del gen 2b, los plásmidos pJET-AV2 (clon 20) (Anexo 5) y pJET-SpLV (clon 33) (Anexo 6), se digirieron con los enzimas de restricción *Nco*I (C<sup>^</sup>CATGG) y *Bgl*II (A<sup>^</sup>GATCT), para subclonarlos en el vector pSK, previamente cortado con los mismos enzimas de restricción. El objetivo consiste en clonar el gen entre el promotor 2x35S y el terminador *PoPit*. Tras la restricción, los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 21) y el fragmento de ADN que contenía el gen 2b (~650 pb) se purificó del gel de agarosa.



**Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, de muestras de ADN tras la digestión con las enzimas de restricción *Nco*I y *Bgl*II. **(1)** Patrón de pesos moleculares (100 pb Ladder Plus). En el recuadro en rojo se observa **(4)** la banda con el gen 2b de AV2 (clon 20), y **(6)** la banda del gen 2b de SpLV (clon 33). La banda superior que aparece en los carriles 4 y 6 corresponde al esqueleto del vector pJET1.2/blunt.

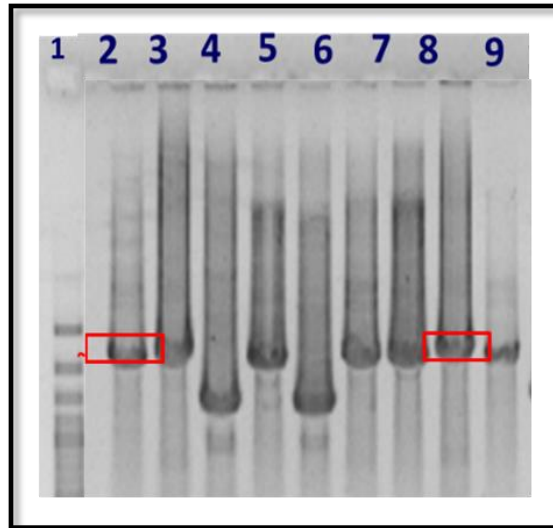
#### 4.1.3. Subclonación del gen 2b en el vector pSK entre el promotor 2x35S y el terminador *PoPit*.

El objetivo de subclonar en el vector pSK es dotar al gen de interés de un promotor y un terminador eucariotas, que en este caso son el promotor 2x35S y el terminador *PoPit*, con lo que la secuencia queda en el contexto deseado para su posterior expresión en las plantas de *N benthamiana*. Tras la purificación de los fragmentos de ADN conteniendo los correspondientes genes 2b, se comprobaron y cuantificaron mediante electroforesis, junto con el vector pSK digerido con los mismos enzimas de restricción y purificado también a partir del gel (Figura 22).



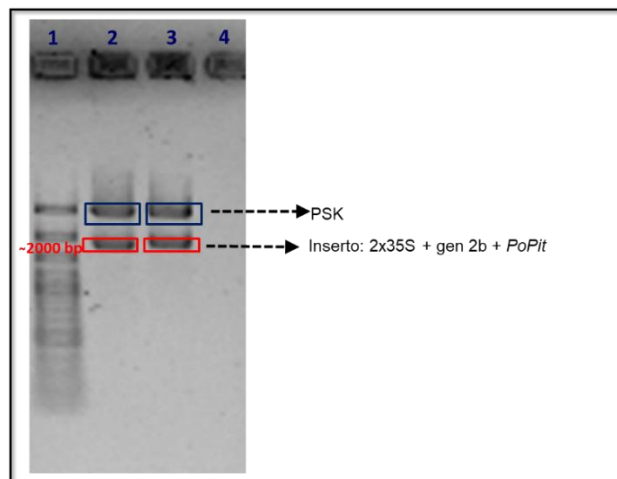
**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de muestras de ADN purificadas tras la digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII*. **(1)** Patrón de pesos moleculares 100 pb Ladder Plus. **(2)** Esqueleto del vector pSK tras la digestión. Gen 2b de los aislados. **(3)** AV2 (clon 20) y **(4)** SpLV (clon 33).

Los fragmentos de ADN que contenían el gen 2b de cada virus, se ligaron en el plásmido pSK, y se repitieron los procedimientos de transformación, obtención de colonias, PCR de las colonias para identificar las colonias portadoras del plásmido recombinante y purificación del ADN plasmídico (Figura 23).



**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de muestras de productos de PCR a partir de bacterias transformadas con pSK-gen 2b de AV2. En este caso se continuó trabajando con el clon 1 (Carril 2). Los productos de amplificación recuadrados son de ~2000 pb y son los que han insertado el gen 2b entre promotor y terminador eucariotas. En (1) se indica el patrón de pesos moleculares 100 bp Ladder Plus.

Se obtuvieron las construcciones pSK-gen 2b AV2 (clon 1) y pSK-gen 2b SpLV (clon 8). La comprobación de los dos plásmidos recombinantes seleccionados se realizó mediante la secuenciación con un cebador que hibrida en el terminador PoPit y mediante digestión con la enzima de restricción *Hind*III (Figura 24). La banda superior corresponde al esqueleto del vector pSK, en tanto la banda de aproximadamente 2.000 pb corresponde al cassette de expresión liberado.



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los plásmidos recombinantes pKS + gen 2b de los virus (2) AV2 y (3) SpLV después de la reacción de digestión con *Hind*III. En ambos casos, la banda superior corresponde a esqueleto del vector y la inferior al *cassette* de expresión liberado (2x35S:gen2b:Terminador *PoPit*). En (1) Patrón de pesos moleculares 100 bp Ladder Plus.

En la Figura 25, aparece la secuenciación del plásmido pSK con el inserto del gen 2b de AV2 proveniente del clon 1 y la traducción de la proteína. Durante el proceso de subclonación se produjo una delección de 32 nucleótidos en el extremo 3'-terminal. Como consecuencia en la secuencia deducida de la proteína faltan los 8 los últimos aminoácidos del extremo C-terminal, siendo diferentes los dos anteriores. Esa delección se ha debido producir debido al efecto estrella de la enzima de restricción *Bgl*III, que en el plásmido pJET1.2 + gen 2b de AV2 habrá reconocido los cuatro nucleótidos centrales del punto de corte (GATC subrayado en verde en la figura 25), generando un fragmento de menor tamaño. Esto, en principio, no debería afectar a la función de la proteína codificada ya que la delección es pequeña y al tratarse del extremo C-terminal el plegamiento de la misma no se debería ver afectado.

```
gccccacccccccccaggggacgtgaggaaaaggaagccgctccagcacgtcttcgaagcagtgatgatggt
atctctcagtgacgtaggggatgacgcacaatccccattttcttcgcaagacctttcctttatataaggaatg
ttcatttcacgtgggagaggggttttttatttttaattttctttcaatacttccaggatcggtaccATGgaac
aaaaactcatctcagaagaggatctgaatgctcaaaggaaagtgtcaaaaatttcccacaccgacggagctcg
cgtggacgctgggaatttattcccagaattaagtccgatgatgattaccggatttttcttaatggtgatctta
gcaccattagaggctcgtcagtttccaagactgactgcggttcaggaaagtgtccgacaccgccagctcaat
tggtataaaaaataccagacctcgcaatcgatttcgagctgaaggagttcaccaaccagcggttgttattca
aaccgtttaccgccaatcatcggcgaagttcctaaaggttggtatggtttgaagtcctggtcttctccaat
tatggagatgtggtgacagggctgaaaagggcgcacgggctaaagtgcatttttctattccgggttctgatt
gggcttatacactcaatctatccgatgtggtttctgggcttgactaccaagttaccaattcctgagaata
tctcaagatgccatttcttttgaatggatgattccgtctttggtgacagaatttctgatc
gagtaccatctccttggtacctcgggtcaaTGAcgactcggetagcgtccctagacttgtccatcttctgga
ttggccaacttaattaatgtatgaaaataaaaggatgcacacatagtacatgctaatcactataatgtgggca
tcaaagtgtgttattggtacaa
```

M**EQKLISEEDL**NAQRKVKISHTD GARVDAGNLFRLSPMMITGFFLMVILAPLEARQFPRLTAVQESAPTPPAQLVIKIPDL  
AIDFELKEFTNPAVVIQTVYRRIIGEVPKGWYGLKSWSSSNYGDVVTGLKRAARAKVHFSIPGSDWAYTLNLSDVVSGLALPK  
LPIPEKYLKMPISFEMDDSVFGDRISD**RVPSPWYLGQ** (secuencia de la proteína nativa esperada)

M**EQKLISEEDL**NAQRKVKISHTD GARVDAGNLFRLSPMMITGFFLMVILAPLEARQFPRLTAVQESAPTPPAQLVIKIPDL  
AIDFELKEFTNPAVVIQTVYRRIIGEVPKGWYGLKSWSSSNYGDVVTGLKRAARAKVHFSIPGSDWAYTLNLSDVVSGLALPK  
LPIPEKYLKMPISFEMDDSVFGDRISD**LG** (secuencia de la proteína obtenida)

**Figura 25.** Secuencia de nucleótidos del clon 1 de pSK-AV2 y secuencia deducida de aminoácidos. En gris la secuencia parcial del promotor 35S y en verde oscuro la del terminador *PoPit*. En rojo y mayúsculas las secuencias del codón de partida original (TGA). En amarillo y subrayada la secuencia que codifica el epítipo *myc*. Los nucleótidos mostrados en azul corresponden a la zona delecionada. En verde se indica el punto de corte de la endonucleasa *Bgl*III (agatct) y la zona donde se ha producido el corte debido al efecto estrella (gatc). En la secuencia de la proteína se indica la secuencia de la proteína nativa esperada y la obtenida. Se indican en verde y subrayado los aminoácidos diferentes entre ambas.

En la figura 26 se muestra la secuenciación del plásmido pSK con el inserto del gen 2b de SpLV del clon 8. Como para la secuenciación se empleó un cebador que hibrida en el terminador *PoPit*, la

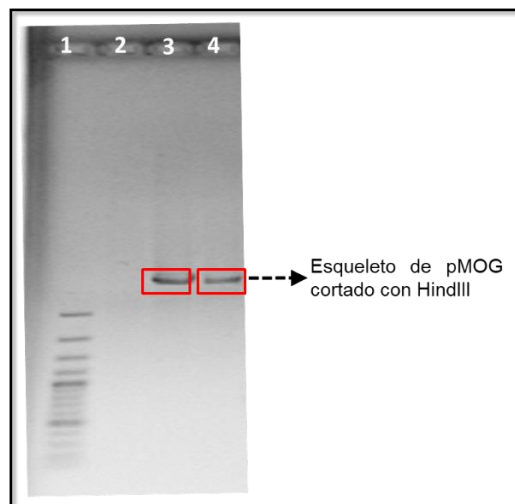
lectura correspondiente a los 150 nucleótidos del extremo 5'-terminal no son de calidad, por lo que se han eliminado.

```
atcaaggaacagatgattcgttctcacggaaaaagaatcgtggatgctgggagtatgtcccaaagatgt
tgcagactgatgtgtctgttctgttactgataaaatctttccacagtaacagaggctcgtcggtttccc
caaccgattgacggatgatggagggtgctccagatccgagctcgattggtagtaaaaaataccaaacctc
gccatagatttcgagctgcaggagttcaccaaccagcggctcgtgatccagaccgtataccgccgaatc
atcgacgaagtgccctaaaggttggtatgggttaaagtcatttttctataccgggttcagattgggcttatacc
gccggactaaaaagggctgcacgagttaaagtgcatTTTTCTATACCgggttcagattgggcttatacc
ttaaactctgtccgaagtggtatctgggttagcactcccaaattaccaattcccgagaaatatctcagg
atgccgattgctatcacaatcgatgataccgtcaataaaattggcgatgggttttgatgatgtaccatct
ccttggtacttgtatcaaTGAagatctaaaaatctttctagaagatctcggctagcgtccctagactt
gtccatcttctggattggccaacttaattaatgtatgaaataaaaggatgcacacatagtgacatgcta
atcactataatgtgggcatcaaagttgtgtgtatgtgtaattactaattatctgaataagagaaagag
atcatccatatttcttatacctaaatgaatgtcacgtgtctttataatcttgatgaaccagatgat
```

**Figura 26.** Secuencia de nucleótidos del clon 8 de pSK-SpLV. En verde se muestra la secuencia del terminador *PoPit*. En rojo y mayúsculas se marca la secuencias del codón de parada TGA de la proteína.

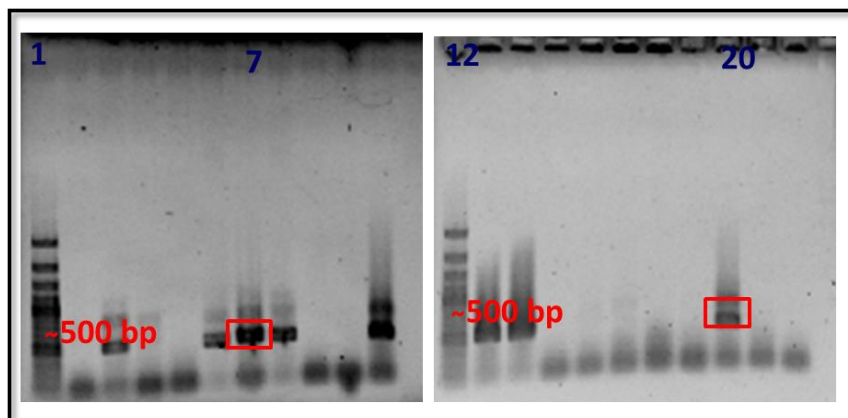
#### 4.1.4. Subclonación de la construcción 35S:gen2b:*PoPit*, en el vector binario pMOG-800

Finalmente, los dos plásmidos recombinantes se cortaron con la enzima de restricción *HindIII* y se subclonaron en el vector de expresión pMOG 800, previamente digerido con la misma enzima de restricción y desfosforilado para evitar la religación (Figura 27).



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8%. **(3 y 4)** Esqueleto del vector binario pMOG digerido con la enzima de restricción *HindIII*. **(1)** Patrón de pesos moleculares 100 pb Ladder Plus.

Se repitió el procedimiento de transformación en *E. coli* y posterior cultivo de colonias. La correcta clonación en el vector binario pMOG se comprobó por PCR con un cebador específico del terminador *PoPit* y otro del vector pMOG (Figura 28).



**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los productos de amplificación de clones recombinantes con el plásmido pMOG que incluía al gen 2b con su promotor y terminador eucariota. A la derecha la construcción en AV2 y a la izquierda en SpLV. Los clones recombinantes que amplifican ~500 pb tienen la construcción correcta. **(1)** y **(12)** Patrón de peso molecular bp Ladder Plus.

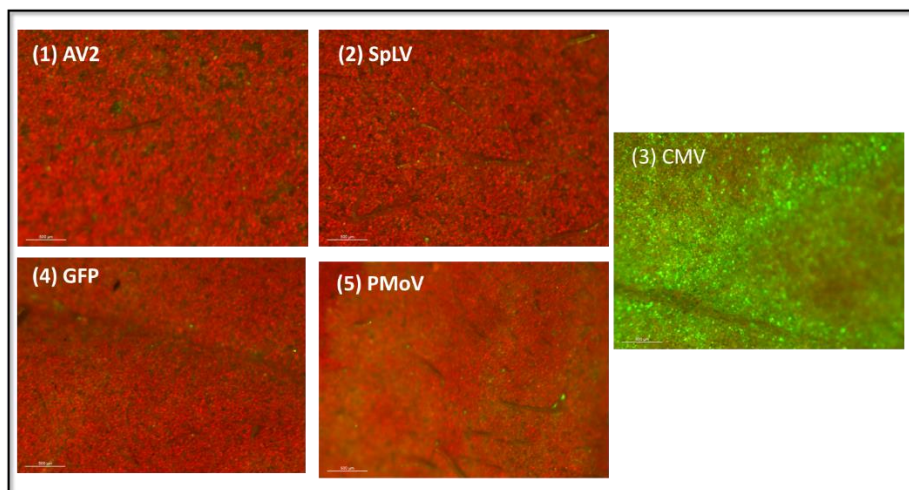
Posteriormente, tras crecer las colonias en un medio líquido con kanamicina y realizar la purificación del plásmido pMOG recombinante, éstos se comprobaron mediante digestión de los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción *HindIII*.

#### **4.2. Agroinfiltración del plásmido pMOG recombinante en plantas de *N. benthamiana* 16c y análisis de la expresión de la proteína**

Los ensayos de expresión transitoria de proteínas mediados por *Agrobacterium*, para determinar la función de genes se utilizan como alternativa a la transformación estable de plantas, siendo una herramienta muy útil y versátil (Van der Hoorn *et al.*, 2000). Este tipo de expresión proporciona un método rápido para el ensayo de la función de algunos tipos de genes en pocos días tras la infiltración. La plantas modelo *N. benthamiana* suele mostrar altos niveles de expresión transitoria por lo que se utiliza habitualmente. En el caso del análisis de la actividad supresora de PTGS, de una proteína determinada, se utilizan plantas *N. benthamiana* 16c. Estas plantas constitutivamente expresan el mRNA de la GFP con lo que bajo luz UV muestran un color verde en contraste con el color rojo de las plantas silvestres debido a la emisión de los cloroplastos tras ser irradiados con luz UV (Kalantidis *et al.*, 2006). Las plantas 16c se co-infiltran con una mezcla de *Agrobacterium* que expresa el mRNA de la GFP y la de la proteína a evaluar. La sobreexpresión del mRNA de la GFP desde las células de *Agrobacterium* activará el PTGS contra este mensajero de modo que las plantas 16c al cabo de pocos días pasan a mostrar un color rojo

bajo luz UV (figura 29 panel 4). Por el contrario, si junto a la GFP se co-expresa una proteína que presente actividad supresora esta impedirá la degradación del mRNA de la GFP con lo que la planta se mantendrá de color verde bajo la luz UV (figura 29 panel 3).

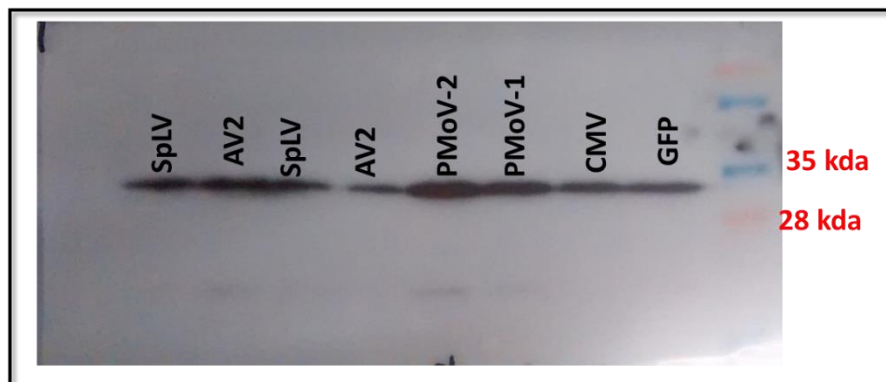
Tras la obtención de los plásmidos binarios recombinantes y la transformación de *Agrobacterium*, se seleccionaron las colonias recombinantes y se agroinfiltraron las hojas de *N. benthamiana* 16c. A 6 días post-infiltración se analizó la presencia de GFP mediante la observación de la emisión de fluorescencia con una lupa equipada con luz ultravioleta. Las hojas co-infiltradas con GFP + la proteína 2b del CMV presentaron la emisión de fluorescencia lo que indica la acumulación de la proteína GFP y por tanto su mRNA no está siendo degradado por el PTGS (Figura 29-3). Esta proteína del CMV se utilizó como control positivo puesto que su función como supresora del PTGS a nivel local es ampliamente conocida (Xin et al., 1998; door Peters, 2009). Por el contrario, las hojas infiltradas solamente con GFP (control de silenciamiento) o con GFP + proteína 2b de los virus AV2, SpLV y PMoV (esta última usada como control negativo) no mostraron fluorescencia indicando que el mRNA de la GFP estaba siendo degradado por el PTGS (Figura 29). Previamente en nuestro laboratorio habíamos demostrado que la proteína 2b de PMoV se expresa en las plantas agroinfiltradas, pero carece de actividad supresora del PTGS (door Peters, 2009). Ahora observamos que las proteínas 2b de AV2 y SpLV tampoco parecen tener actividad supresora de PTGS. Así, nuestros resultados junto a los previamente presentados en el caso del PMoV y AV2 (Shimura *et al.*, 2013), sugieren que estas proteínas en *Ilarvirus* no serían funcionalmente homologas a la del CMV en su actividad como supresor de PTGS a nivel local.



**Figura 29.** Fotografía con lupa Leyca bajo exposición de luz UV de hojas agroinfiltradas a los 6 dpi. **(1)** AV2 – 2b. **(2)** SpLV-2b. **(3)** CMV-2b (Control positivo) **(4)** GFP sola y **(5)** PMoV-2b (Control negativo).

#### 4.3. Análisis tipo Western blot.

Para confirmar que el efecto era debido a la ausencia de actividad PTGS se realizó un análisis western para confirmar la presencia de las proteínas AV2-2b y SpLV-2b. Se empleó un anticuerpo que reconoce el epítipo myc presente en las proteínas 2b de AV2, SpLV y del control negativo PMoV. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes debido posiblemente a que el anticuerpo utilizado no estaba funcionando correctamente (la última vez que se había empleado fue en el año 2009), ya que ni el control positivo pudo ser detectado (proteína 2b de PMoV evaluada en trabajos anteriores, door Peters 2009). El anticuerpo reconoció una proteína de unos 35 Kda que estaba presente en los extractos de todas las plantas, pero no reconoció la presencia de una banda específica alrededor de los 28 Kda correspondiente a las proteínas 2b de PMoV, AV2 y SpLV. Este experimento se repetirá cuando se disponga de un nuevo anticuerpo anti-myc con el objetivo de comprobar que la proteína 2b se expresa en las plantas agroinoculadas, y que su función no está relacionada con la supresión del PTGS a nivel local.



**Figura 30.** Resultado de la prueba de western-blot. Se aprecia la banda de una proteína de 35 kda en todas las muestras, pero no aparece la proteína esperada, 2b, de 28 kda.



# 5. CONCLUSIONES

## 5. Conclusiones

1. Se ha clonado en un vector binario, para la expresión transitoria mediante agroinfiltración, el gen que codifica la supuesta proteína 2b de los *Ilarvirus*: del virus 2 del esparrago (*Asparagus virus 2*, AV2) y del virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV).
2. Mediante la expresión transitoria en el sistema de plantas de *N. benthamiana 16c* se ha determinado que ninguna de estas proteínas presentan actividad supresora del PTGS a nivel local.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Adkins, S. 2000. *Tomato spotted wilt virus*-positive steps towards negative success. *Mol. Plant Pathol.* 1:151-157.
- Almeida, A.; Hanada, J.; Oliveira, K.; Belintani, T.; Kitajima, P.; Souto, E.; Novaes, E.; Nora, P. 2005. Biological and molecular characterization of an isolate of *Tobacco streak virus* obtained from soybeans in Brazil. *Fitopatol. bras.* 30(4):30:366-373.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H. y Vance V.B. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13079-84.
- Aparicio, F., Aramburu, J., Soler, S., Galipienso, L., Nuez F., Pallás V., and López, C. (2009a). Immunodiagnosis of *parietaria mottle virus* in tomato crops using a polyclonal antiserum against its coat protein expressed in a bacterial system. *J. Phytopathol.* 157, 511-513 doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01511.x.
- Aparicio, F., Aramburu, M; Herranz, V.; Pallás, V.; López, C. 2016. *Parietaria mottle virus*: a potential threat for tomato crops? IHSH Interna. Symposium on Tomato Diseases.
- Aparicio, F., Soler, S., Aramburu, J., Galipienso, L., Nuez F., Pallás V., and López, C. (2009b). Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled probe. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 117-123 doi: 10.1007/s10658-008-9347-5.
- Aparicio, F.; Sánchez-Navarro, R.; Olsthoorn, R.; Pallás, V.; Bol, J. 2001. Recognition of cis-acting sequences in RNA 3 of *Prunus necrotic ringspot virus* by the replicase of Alfalfa mosaic virus. *The Journal of General Virology*, 82:947-951
- Aramburu, J., Galipienso, L., Aparicio, F., Soler, S., and López, C. 2010. Mode of transmission of *parietaria mottle virus*. *J. Plant Pathol.* 92, 679–684 doi:10.4454/jpp.v92i3.313.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., and López, C. 2010. Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the Sw-5 resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathol. Mediterr.* 49, 342–351.
- Ashby, A.; Watson, M.; Loake, G.; Shaw, C. 1988. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.*, 170, 4181–7
- Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 2004, 431:356-363.
- Bazzini, A.A., Hopp, H.E., Beachy, R.N. and Asurmendi, S. 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 12157–62.
- Bol, J.F. 2005 *Alfalfa mosaic virus* and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology* 80:1089-1102. 1999.
- Bologna N.G. y Voinnet O. 2014. The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739–6746.
- Brodersen, P.; Sakvarelidze, L.; Bruun, M.; Dunoyer, P.; Yamamoto, Y.; Sieburth, L.; Voinnet, O. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320, 1185–90.
- Brodersen, P.; Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22(5):268-80.
- Burgyán, J. y Havelda, Z. 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272.
- Caciagli, P., Boccardo, G. and Lovisolo, O. 1989. *Parietaria mottle virus*, a posible new ilarvirus from *Parietaria officinalis* (Urticaceae). *Plant Pathol.* 38, 577-84.
- Cañizales M.C., Navas-Castillo J., Moriones E. 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of Tomato chlorosis virus. *Virology* 379; 168 – 174.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C.J., Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN. 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465, 316–21.
- Chapman, E.; Prokhnovsky, A; Gopinath, K.; Dolja, V.; Carrington, J. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, 18, 1179–86.
- Chitwood, D.H., Nogueira, F.T.S., Howell, M.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C. and Timmermans, M.C.P. 2009. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev.*, 23, 549–54.
- Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J. (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479-480, 85–103.
- Díaz-Pendón, J.A. and Ding, S.-W. 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 303–26.
- Ding, S.; Li, W.; Symons, R. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal* 14:5762-5772.
- Ding, S.W. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 10, 632–644.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130, 413–26.
- door Peeters, A. 2009. Characterisation of a potential suppressor of RNA silencing of *Parietaria mottle virus* (PMoV). Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. FAOSTAT-Producción agrícola. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Acceso: 11 Agosto 2017].
- Fauquet, C.; Stanley, J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch. Virology*, 150: 2151-2179.

- Galipienso L., Herranz M.C., Pallás V., Aramburu J. 2005. Detection of a tomato strain of *Parietaria mottle virus* (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology* 54, 29 – 35.
- Galipienso, L., Herranz, M.C., López, C., Pallás, V., and Aramburu, J. 2008. Sequence analysis within the RNA 3 of seven Spanish tomato isolates of *parietaria mottle virus* (PMoVT) reveals important structural differences with parietaria isolates (PMoV). *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 125-135 <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9200-2>.
- Galipienso, L., Rubio, L., López, C., Soler, S., and Aramburu, J. 2009. Complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of *parietaria mottle virus* infecting tomato. *Virus Genes* 39, 256–260 <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-009-0388-4>.
- Garcia, J. A. and Pallas, V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr Opin Virol* 11:21-30.
- Ge, X., Scott, S.W. 1996. The nucleotide sequence of hydrangea mosaic virus RNA 3 exhibits similarity with the RNA 3 of tobacco streak virus. *Virus Res.* 40, 57–63 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)01251-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702(95)01251-6).
- Ge, X.; Scott, S. & Zimmerman, M. 1997. The complete sequence of the genomic RNAs of *Spinach latent virus*. *Arch Virol* 142: 1213-1226
- Guo, H. S. y Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21, 398-407.
- Hanssen, I.; Lapidot, M.; Thomma, B. 2010. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. *MPMI* 23 (5): 539–548. The American Phytopathological Society
- Janssen, D.; Saez, E.; Segundo, E.; Martín, G.; Gil, F.; Cuadrado, M. 2005. Capsicum annumm a new host of *Parietaria mottle virus* in Spain. *Plant Pathol.* 54:567.
- Jiang L., Wei C. y Li Y. 2012. Viral suppression of RNA silencing. *Science China Life Sciences* 55, 109-18.
- Jutglá Monedero, P. 2009. Búsqueda de fuentes de resistencia al virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en tomate. Trabajo de Fin de Máster, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Kalantidis, K.; Tsagris, M. and Tabler, M. 2006. Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *The Pl. Jour.* 45: 1006–1016.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., (eds). 2012. *Potexvirus*, pp 912–915, in *virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses; ninth report of the international committee on taxonomy of viruses* (p 1327) London, UK: Elsevier Academic Press
- Li H.-W., Lucy A.P., Guo H.-S., Li W.-X., Ji L.-H., Wong S.-M. y Ding S.-W. 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *European Molecular Biology Organization Journal* 18, 2683-91.
- Li, F.; Ding, S. 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:503-531.

- Lippman, Z.; Martienssen, R. 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370
- Lisa, V., Ramasso, E., Ciuffo, M., and Roggero, P. 1998. Apical necrosis of tomato caused by a strain of *Parietaria mottle Ilarvirus*. Proceedings 9<sup>th</sup> Conference of the International Society for Horticultural Science. VVWG, Recent advances in vegetable virus research, Turin, 290-291.
- Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.*, 15, 701–7.
- Llave, C.; Kasschau, K.; Rector, M.; Carrington, J. 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14, 1605–19.
- Lucy, A.; Guo, H.; Li, W.; Ding, S. W. 2000. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal*, 19:1672–1680.
- Maloney, C.D. and Hannon, G.J. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* 136, 656-668
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). 2017. Anuario de Estadística, avance 2016. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/> [Acceso: 11 Agosto 2017].
- Marchoux, G., Gognalons, P., and Gebre-Selassie, K., eds. 2008. *Virus des Solanacées. Du genome viral à la protection des cultures* (Versailles, France: Editions Quae), pp.858.
- Marchoux, G., Parrella, G., Gebre-Selassie, K., Gagnalon, P. 1999. Identification de deux Ilarvirus sur tomate dans le Sud de la France. *Phytoma* 522, 53 – 55.
- Martínez, C., Aramburu, J., Rubio, L., and Galipienso, L. (2015). Complete genome sequence of a tomato isolate of *parietaria mottle virus* from Italy. *Genome Announc.* 3(6), e01452-15 doi:10.1128/genomeA.01452-15.
- Mayers, C.; Palukaitis, P.; Carr, J. 2000. Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *J. Gen. Virol.*, 81, 219–226.
- Meister, G.; Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Melnyk, C. W., Molnar, A., Baulcombe, D. C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal* 30: 3553-3563
- Molnar, A., Melnyk, C., Baulcombe, D. C. (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology* 12
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. and Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328, 872–5.
- Navas, J.; Fiallo, E.; Sánchez, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:219-48.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). *Asparagus virus 2* 2b gene for 2b protein, complete cds, isolate: Mexico2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB745636.1> [Acceso: 15 Agosto 2017].

NCBI (National Center for Biotechnology Information). *Spinach latent virus* putative polymerase and putative 2b protein genes, complete cds. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_003809.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_003809.1) [Acceso: 15 Agosto 2017]

Noël, P.; Hance, T.; Bragard, C. 2014. Transmission of the pepino mosaic virus by whitefly. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 23 – 27.

Olsthoorn, R.V.L., Mertens, S., Brederode, T.B., Bol, J.F., 1999. A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication. *The EMBO Journal* 18, 4856-4864.

Pallás, V.; Aparicio, F.; Herranz, M.C.; Sanchez-Navarro, J.; Scott, S. 2013. The Molecular Biology of *Illarviruses*. In *Advances in Virus Research*, 87: 139-181.

Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J. and Scheible, W.-R. 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.*, 53, 731–8.

Parrella, G. 2002. First report of *Parietaria mottle virus* in *Mirabilis jalapa*. *Plant Pathol.* 51, 401 doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00717.x.

Parrella, G.; Greco, B.; Troiano, E. First Report of *Parietaria mottle virus* associated with yellowing disease in *Diplotaxis tenuifolia* in Italy. *Plant Disease* 101(5): 850

Petrov, C.; Nakov, B.; Krasteva, L. 1989. Studies on the resistance of eggplant introductions to *Verticillium* wilt. 7th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant: 183-186. HE CITADO LA DEL 2014 ESTA NO

Petrov, N. 2014. Damaging effects of tomato mosaic virus and potato virus Y on tomato plants. *Plant studies* 4(6):56-60.

Petrovic, D.; Bulajic, A.; Stankovic, I.; Ignjatov, M.; Vujakovic, M.; Krstic, B. Presence and distribution of pepper viruses in Serbia. *Ratar. i Povrt.* 2010, 47, 567–576. ESTA NO

Pumplin, N. and Voinnet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 745–60.

Rafael, M.; Rivera, R. 1999. Molecular characterization of the RNA3 of *Asparagus virus 2*. *Arch Virol* 144: 185–192.

Ramasso, E., Roggero, P., Dellavalle, G., and Lisa, V. 1997. Necrosi apicale del pomodoro causata da un ilarvirus. *Informatore Fitopatologico* 1, 71–77.

Ratcliff, F.; Harrison, B.; Baulcombe, D. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 27(5318):1558-1560

Roggero, P., Ciuffo, M., Katis, N., Alioto, D., Crescenzi, A., Parella, G., and Gallitelli, D. 2000. Necrotic disease in tomatoes in Greece and south Italy caused by tomato strain of *Parietaria mottle virus*. *J. Plant Pathol.* 82, 159.



- Roth, B. M., Pruss, G. J. and Vance, V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102:97-108.
- Scott, S. and Zimmerman, M. 2009. The nucleotide sequences of the RNA 1 and RNA 2 of *Asparagus virus 2* show a close relationship to citrus variegation virus. *Arch. Virol* 54:719-722.
- Scott, S.W., Zimmerman, M.T., and Rankin, D. 2006. Complete sequence of the RNA 1 and RNA 2 of *Parietaria mottle virus*. *Arch Virol*. 151, 1895–1898 <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-006-0803-2>.
- SEF (Sociedad Española de Fitopatología). 2016. Patógenos de plantas descritos en España. <http://sef.es/patogenos.php>
- Shimura H. y Pantaleo V. (2011) Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809, 601-12.
- Shimura, H.; Masuta, C.; Yoshida, N.; Sueda, K. and Suzuki, M. 2013. The 2b protein of *Asparagus virus 2* functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442, 180-188.
- Shipp, J.; Buitenhuis, R.; Stobbs, L.; Wang, K.; Kim, W.; Ferguson, G. 2008. Vectoring of pepino mosaic virus by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology*, 153: 149 – 155.
- Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* 65, 473-503.
- Tzanetakis, I.E., Martin, R.R., (2005). New features in the genus Ilavirus revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus. *Virus Research* 112, 32-37.
- Van der Hoorn, R.; Laurent, F.; Roth, R. and De Wit, P. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-Induced and Avr4/Cf-4-Induced necrosis. *Molec. Plant Microb. Interact.* 13(4):439-446.
- Vaucheret H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13, 350-8.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17: 449-459
- Wang, M. B., Masuta, C., Smith, N. A. and Shimura, H. 2012. RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1275-1285.
- Wieczorek, P.; Obrepalska, A. 2014. Suppress to Survive—Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol. Biol Rep.* 33:335-346.
- Wu-Scharf, D., Jeong, B.; Zhang, C.; Cerutti, H. 2000 Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science* 290: 1159-1162
- Xin, H; Ji, L.; Scott, S.; Symons, R.; Ding, S. 1998. Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the Bromoviridae. *Journal of Virology* 72, 6956-6959.

## 7. ANEXOS

**ANEXO 1.** Resultados del análisis de restricción con el programa informático *Restriction Map*, del gen 2b de AV2.

cuts once - cuts twice

Results for linear 582 residue sequence "Untitled" starting "atgaatgctc"

```

    AccII cg|cg 51
    BstUI cg|cg 51
    SacI gagct|c 49
    SstI gagct|c 49
    AluI ag|ct 47
1 E C S K E S V K N F P H R R S S R G R W
1 * M L K G K C Q K F P T P T E L A W T L
1 M N A Q R K V S K I S H T D G A R V D A
1 atgaatgctcaaggaaagtgtcaaaaatttcccacaccgacggagctcgcgtggacgct
1 10 20 30 40 50
1 tacttacgagtttccctttcacagtttttaagggtgtggctgcctcgagcgcacctgcga
    DpnII |gatc 117
    MboI |gatc 117
    NdeII |gatc 117
    HpaII c|cgg 99
    MspI c|cgg 99
    MseI t|taa 80
21 E F I P K I K S D D D Y R I F P N G D L
21 G I Y S Q D * V R * * L P D F S * W * S
21 G N L F P R L S P M M I T G F F L M V I
61 ggaaatttattcccaagattaagtcagatgattaccggatttttccctaatggtgatc
61 70 80 90 100 110
61 ccctaaataagggttctaatcaggctactactaatggcctaaaaaggattaccactag
41 S T I R G S S V S K T D C G S G K C S D
41 * H H * R L V S F Q D * L R F R K V L R
41 L A P L E A R Q F P R L T A V Q E S A P
121 ttgacaccattagaggctcgtcagtttccaagactgactgcggttcaggaaagtgtccg
121 130 140 150 160 170
121 aatcgtggttaatctccgagcagtcaaaagttctgactgacccaagtcctttcacgagc
    AluI ag|ct 235
    TaqI t|cga 231
    BanIII at|cgat 225
    BseCI at|cgat 225
    BspDI at|cgat 225
    ClaI at|cgat 225
    TaqI t|cga 225
    MfeI c|aattg 194
    AluI ag|ct 191
61 T A S S I G N K N T R P R N R F R A E G
61 H R Q L N W * * K Y Q T S Q S I S S * R
61 T P P A Q L V I K I P D L A I D F E L K
181 acaccgagctcaattggtaataaaaaataaccagacctcgcaatcgatttcgagctgaag
181 190 200 210 220 230
181 tgtggcgtcaggttaaccattatttttatggtctggagcgttagctaaagctcgacttc
    HinfI g|antc 285
81 V H Q P S G C Y S N R L P P N H R R S S
81 S S P T Q R L L F K P F T A E S S A K F
81 E F T N P A V V I Q T V Y R R I I G E V
241 gagttcaccaaccagcgggtgttattcaaacggtttaccgccaatcatcggcgaagt
241 250 260 270 280 290
241 ctcaagtgttggtcgccaacaataagtttgcaaatggcggcttagtagccgcttcaa
101 * R L V W F E V L V F L Q L W R C G D R
101 L K V G M V * S P G L P P I M E M W * Q
101 P K G W Y G L K S W S S S N Y G D V V T
301 cctaaaggttggtatggtttgaagtcctggtcttctccaattatggagatgtggtgaca
301 310 320 330 340 350
301 ggatttccaaccatacacaacttcaggaccagaaggaggttaatacctctacaccactgt
    HpaII c|cgg 404
    MspI c|cgg 404
    HaeIII gg|cc 374
    PhoI gg|cc 374
121 A E K G R T G * S A F F Y S G F * L G L
121 G * K G P H G L K C I F L F R V L I G L
121 G L K R A A R A K V H F S I P G S D W A
361 gggtgaaaaggccgcacgggctaaagtgcatttttctattccgggttctgattgggct
361 370 380 390 400 410
361 cccgacttttccggcgtgcccgatttcacgtaaaaagataaggcccaagactaacccga
141 Y T Q S I R C G F W A C T T Q V T N S *
141 I H S I Y P M W F L G L H Y P S Y Q F L
141 Y T L N L S D V V S G L A L P K L P I P
421 tatacactcaatctatccgatgtggtttctggccttgactaccacaagttaccaattcct

```

```

421 430 440 450 460 470
421 atatgtgagttagataggctacaccaaagaccggaacgtgatgggttcaatggttaagga
      HinfI g|antc 521
161 E I S Q D A H F F * N G * F R L W * Q N
161 R N I S R C P F L L K W M I P S L V T E
161 E K Y L K M P I S F E M D D S V F G D R
481 gagaaatatctcaagatgccatttctttgaaatggatgattccgtctttggtagaca
481 490 500 510 520 530
481 ctctttatagagttctacgggtaaagaaaactttacctaaggcagaaccactgtct
      KpnI ggtac|c 571
      AfaI gt|ac 569
      RsaI gt|ac 569
      Asp718I g|gtacc 567
      NlaIII catg| 567
      Bsp19I c|catgg 563
      NcoI c|catgg 563
      AfaI gt|ac 555
      RsaI gt|ac 555
      TaqI t|cga 550
      DpnII |gatc 547
      MboI |gatc 547
      NdeII |gatc 547
181 F * S S T I S M V P R S M
181 F L I E Y H L H G T S V N
181 I S D R V P S P W Y L G Q *
541 atttctgatcgagtaccatctccatggtacctcggtaaatga
541 550 560 570 580
541 taaagactagctcatggtagaggtaccatggagccagttact

```

**ANEXO 2.** Sitio y número de repeticiones de los sitios de restricción del gen 2b de AV2, según el programa informático Restriction Map.

Sitio	Posiciones	Sitio	Posiciones	Sitio	Posiciones
<i>AatI agg/cct</i>	none	<i>BsePI g/cgcgc</i>	none	<i>NgoMIV g/ccggc</i>	none
<i>AatII gacgt/c</i>	none	<i>BseX3I c/ggccg</i>	none	<i>NheI g/ctagc</i>	none
<i>Acc16I tgc/gca</i>	none	<i>BshTI a/ccggt</i>	none	<i>NlaIII catg/</i>	567
<i>AcclI cg/cg</i>	51	<i>Bsp1407I t/gtaca</i>	none	<i>NotI gc/ggccgc</i>	none
<i>AcclII t/ccgga</i>	none	<i>Bsp19I c/catgg</i>	563	<i>Nrul tcg/cga</i>	none
<i>AclI aa/cgtt</i>	none	<i>BspDI at/cgat</i>	225	<i>Nsil atgca/t</i>	none
<i>AcvI cac/gtg</i>	none	<i>BspEI t/ccgga</i>	none	<i>Pacl ttaat/taa</i>	none
<i>AfaI gt/ac</i>	555, 569	<i>BsrGI t/gtaca</i>	none	<i>PciI a/catgt</i>	none
<i>AfeI agc/gct</i>	none	<i>BssHII g/cgcgc</i>	none	<i>PhoI gg/cc</i>	374
<i>AfIII c/ttaag</i>	none	<i>BstUI cg/cg</i>	51	<i>PmeI gttt/aaac</i>	none
<i>AgeI a/ccggt</i>	none	<i>Clal at/cgat</i>	225	<i>PmlI cac/gtg</i>	none
<i>AhII a/ctagt</i>	none	<i>DpnII  gatc</i>	117, 547	<i>PsiI tta/taa</i>	none
<i>Alw44I g/tgcac</i>	none	<i>DraI ttt/aaa</i>	none	<i>PstI ctgca/g</i>	none
<i>AluI ag/ct</i>	47, 191, 235	<i>EagI c/ggccg</i>	none	<i>PvuI cgat/cg</i>	none
<i>Aor51HI agc/gct</i>	none	<i>EcoRI g/aattc</i>	none	<i>PvuII cag/ctg</i>	none
<i>ApaI gggcc/c</i>	none	<i>EcoRV gat/atc</i>	none	<i>RsaI gt/ac</i>	555, 569
<i>ApaLI g/tgcac</i>	none	<i>EgeI ggc/gcc</i>	none	<i>SacI gagct/c</i>	49
<i>Ascl gg/cgcgcc</i>	none	<i>FseI ggcgg/cc</i>	none	<i>SacII ccg/gg</i>	none
<i>AseI at/taat</i>	none	<i>FspI tgc/gca</i>	none	<i>Sall g/tgcac</i>	none
<i>Asp718I g/gtacc</i>	567	<i>HaellI gg/cc</i>	374	<i>Sbfl cctgca/gg</i>	none
<i>AsuII tt/cgaa</i>	none	<i>HinclI gty/rac</i>	none	<i>Scal agt/act</i>	none
<i>AvaI c/ycgrg</i>	none	<i>HindIII a/agctt</i>	none	<i>SfoI ggc/gcc</i>	none
<i>Avill tgc/gca</i>	none	<i>Hinfl g antc</i>	285, 521	<i>SmaI ccc/ggg</i>	none
<i>AvrII c/ctagg</i>	none	<i>HpaI gtt/aac</i>	none	<i>SnaBI tac/gta</i>	none
<i>Ball tgg/cca</i>	none	<i>HpaII c/cgg</i>	99, 404	<i>SpeI a/ctagt</i>	none
<i>BamHI g/gatcc</i>	none	<i>KasI g/gcc</i>	none	<i>SphI gcatg/c</i>	none
<i>BanIII at/cgat</i>	225	<i>KpnI ggtac/c</i>	571	<i>Sspl aat/att</i>	none
<i>BbeI ggcgc/c</i>	none	<i>MboI  gatc</i>	117, 547	<i>SstI gagct/c</i>	49
<i>BbrPI cac/gtg</i>	none	<i>MfeI c/aattg</i>	194	<i>SstII ccg/gg</i>	none
<i>BbuI gcatg/c</i>	none	<i>MluI a/cgcgt</i>	none	<i>StuI agg/cct</i>	none
<i>BcuI a/ctagt</i>	none	<i>MscI tgg/cca</i>	none	<i>Swal attt/aaat</i>	none
<i>BclI t/gatca</i>	none	<i>MseI t/taa</i>	80	<i>TaqI t/cga</i>	225, 231, 550
<i>Bfal c/tag</i>	none	<i>MspI c/cgg</i>	99, 404	<i>TliI c/tcgag</i>	none
<i>BfrI c/ttaag</i>	none	<i>Nael gcc/ggc</i>	none	<i>VspI at/taat</i>	none
<i>BfrBI atg/cat</i>	none	<i>NarI gg/cgcc</i>	none	<i>XbaI t/ctaga</i>	none
<i>BglII a/gatct</i>	none	<i>NcoI c/catgg</i>	563	<i>XhoI c/tcgag</i>	none
<i>BlnI c/ctagg</i>	none	<i>NdeI ca/tatg</i>	none	<i>XmaI c/ccggg</i>	none
<i>BseCI at/cgat</i>	225	<i>NdeII  gatc</i>	117, 547		

ANEXO 3. Resultados del análisis de restricción con el programa informático *Restriction Map*, del gen 2b de SplV.

cuts once - cuts twice

Results for linear 588 residue sequence "Untitled" starting "atggatgcga"

```

                HinFI g|antc 51
                HinFI g|antc 31
                MseI t|taa 14
1 G C D V N Q G T D D S F S R K K N R G C
1 W M R C * S R N R * F V L T E K E S W M
1 M D A M L I K E Q M I R S H G K R I V D
1 atggatgcgatgtaaatcaaggaacagatgattcgttctcaccgaaaaagaatcgtggat
1 10 20 30 40 50
1 tacctacgctacaattagttccttctactaagcaagagtgcccttttcttagcaccta
21 W E Y V P K M L Q T D V S V P V T D K S
21 L G V C P K D V A D * C V C S C Y * * I
21 A G S M S Q R C C R L M C L F L L L I N
61 gctgggagtgatgtcccaaagatgttcagactgatgtgtctgttctctactgataaa
61 70 80 90 100 110
61 cgaccctatacaggggttctacaacgtctgactacacagacaaggacaatgactattta
41 F H S N R G S S V S P T D C G D G G C S
41 F P Q * Q R L V G F P N R L R * W R V L
41 L S T V T E A R R F P Q P I A V M E G A
121 ctttccacagtaacagaggctcgtcggtttcccaaccgattgcggatgaggaggct
121 130 140 150 160 170
121 gaaaggtgtcattgtctccgagcagccaaaggggttgctaaccgactacctccacga
                AluI ag|ct 238
                TaqI t|cga 234
                TaqI t|cga 196
                AluI ag|ct 194
                DpnII |gatc 184
                MboI |gatc 184
                NdeII |gatc 184
61 R S A S S I G S K N T K P R H R F R A A
61 Q I R Q L D W * * K Y Q T S P * I S S C
61 P D P P A R L V V K I P N L A I D F E L
181 ccagatccgcccagctcgattggtagtaaaaaatccaaacctcgccatagatttcgagctg
181 190 200 210 220 230
181 ggtctaggcggtcgagctaaccatctttttatggtttgagcggatctaaagctcgac
                TaqI t|cga 294
                HinFI g|antc 288
                DpnII |gatc 267
                MboI |gatc 267
                NdeII |gatc 267
                PstI ctgca|g 243
81 G V H Q P S G R D P D R I P P N H R R S
81 R S S P T Q R S * S R P Y T A E S S T K
81 Q E F T N P A V V I Q T V Y R R I I D E
241 caggagtccaccaaccagcggctcgtgatccagaccgtataaccgccaatcatcgacgaa
241 250 260 270 280 290
241 gtccctcaagtggttggtcgccagcactaggtctggcatatggcggcttagtagctgctt
                DraI ttt|aaa 324
                MseI t|taa 323
101 A * R L V W F K V L V F L Q L W R R C G
101 C L K V G M V * S P G L P P I M E T L W
101 V P K G W Y G L K S W S S S N Y G D V V
301 gtgcctaaagttggtatggtttaaagtctgttctcctccaattatggagacggttg
301 310 320 330 340 350
301 cacggatttccaaccataccaatttcaggaccagaaggaggttaataacctctgcaaac
                HpaII c|cgg 407
                MspI c|cgg 407
                MseI t|taa 387
                HpaII c|cgg 363
                MspI c|cgg 363
                HaeIII gg|cc 362
                PfoI gg|cc 362
121 R T K K G C T S * S A F F Y T G F R L G
121 P D * K G L H E L K C I F L Y R V Q I G
121 A G L K R A A R V K V H F S I P G S D W
361 gccggactaaaaagggctgcacaggttaaagtgcatTTTTTctataccgggttcagattgg
361 370 380 390 400 410
361 cggcctgatttttcccgactgctcaatttcacgtaaaaagatatggcccaagtctaacc
                MseI t|taa 431
141 L Y L K S V R S G I W V S T P Q I T N S
141 L I P * I C P K W Y L G * H S P N Y Q F
141 A Y T L N L S E V V S G L A L P K L P I

```

```

421 gcttataaccttaaatctgtccgaagtggatctgggtagcactccccaattaccaatt
421 430 440 450 460 470
421 cgaatatggaatttagacaggcttcacatagaccaatcgtaggggtttaatggttaa
    BanIII at|cgat 519
    BseCI at|cgat 519
    BspDI at|cgat 519
    ClaI at|cgat 519
    TaqI t|cga 519
    AvaI c|ycgrg 482
161 R E I S Q D A D C Y H N R * Y R Q * N W
161 P R N I S G C R L L S Q S M I P S I K L
161 P E K Y L R M P I A I T I D D T V N K I
481 cccgagaaatatctcaggatgccgattgctatcacaatcgatgataccgtcaataaaatt
481 490 500 510 520 530
481 gggctctttatagagtcctacggctaacgatagtgtagctactatggcagttatnttaa
    AfaI gt|ac 575
    RsaI gt|ac 575
    NlaIII catg| 573
    Bsp19I c|catgg 569
    NcoI c|catgg 569
    AfaI gt|ac 561
    RsaI gt|ac 561
181 R W F * * C T I S M V L V S M
181 A M V L M M Y H L H G T C I N
181 G D G F D D V P S P W Y L Y Q *
541 ggcgatggtttgatgatgtaccatctccatggtacttgtatcaatga
541 550 560 570 580
541 ccgctacaaaactactacatggtagagggtaccatgaacatagttact

```

**ANEXO 4.** Sitio y número de repeticiones de los sitios de restricción del gen 2b de AV2, según el programa informático *Restriction Map*.

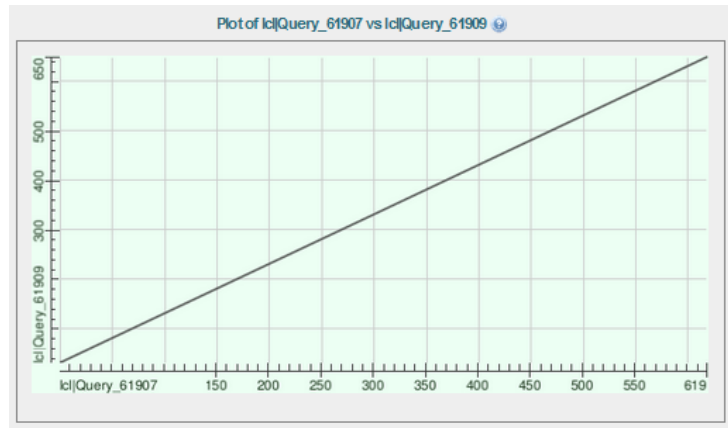
Sitio	Posiciones	Sitio	Posiciones	Sitio	Posiciones
<i>AatI agg cct</i>	none	<i>BsePI g cgcg</i>	none	<i>NgoMIV g ccggc</i>	none
<i>AatII gacgt c</i>	none	<i>BseX3I c ggccg</i>	none	<i>NheI g ctagc</i>	none
<i>Acc16I tgc gca</i>	none	<i>BshTI a ccggt</i>	none	<i>NlaIII catg </i>	573
<i>AccII cg cg</i>	none	<i>Bsp1407I t gtaca</i>	none	<i>NotI gc ggccgc</i>	none
<i>AccIII t ccgga</i>	none	<i>Bsp19I c catgg</i>	569	<i>NruI tcg cga</i>	none
<i>AclI aa cgtt</i>	none	<i>BspDI at cgat</i>	519	<i>Nsil atgca t</i>	none
<i>AcvI cac gtg</i>	none	<i>BspEI t ccgga</i>	none	<i>Pacl ttaat taa</i>	none
<i>AfaI gt ac</i>	561, 575	<i>BsrGI t gtaca</i>	none	<i>PciI a catgt</i>	none
<i>AfeI agc gct</i>	none	<i>BssHII g cgcg</i>	none	<i>PhoI gg cc</i>	362
<i>AfIII c ttaag</i>	none	<i>BstUI cg cg</i>	none	<i>PmeI gttt aaac</i>	none
<i>AgeI a ccggt</i>	none	<i>Clal at cgat</i>	519	<i>PmlI cac gtg</i>	none
<i>AhII a ctagt</i>	none	<i>DpnII  gatc</i>	184, 267	<i>PsiI tta taa</i>	none
<i>Alw44I g tgcac</i>	none	<i>DraI ttt aaa</i>	324	<i>PstI ctgca g</i>	243
<i>AluI ag ct</i>	194, 238	<i>EagI c ggccg</i>	none	<i>PvuI cgat cg</i>	none
<i>Aor51HI agc gct</i>	none	<i>EcoRI g aattc</i>	none	<i>PvuII cag ctg</i>	none
<i>ApaI gggcc c</i>	none	<i>EcoRV gat atc</i>	none	<i>RsaI gt ac</i>	561, 575
<i>ApalI g tgcac</i>	none	<i>EgeI ggc gcc</i>	none	<i>SacI gagct c</i>	none
<i>Ascl gg cgcgcc</i>	none	<i>FseI ggcgg cc</i>	none	<i>SacII ccg gg</i>	none
<i>Asel at taat</i>	none	<i>FspI tgc gca</i>	none	<i>SalI g tcgac</i>	none
<i>Asp718I g gtacc</i>	none	<i>HaellI gg cc</i>	362	<i>SbfI cctgca gg</i>	none
<i>AsuII tt cgaa</i>	none	<i>HinclI gty rac</i>	none	<i>ScalI agt act</i>	none
<i>AvaI c ycgrg</i>	482	<i>HindIII a agctt</i>	none	<i>SfoI ggc gcc</i>	none
<i>AviII tgc gca</i>	none	<i>HinfI g antc</i>	31, 51, 288	<i>SmaI ccc ggg</i>	none
<i>AvrII c ctagg</i>	none	<i>HpaI gtt aac</i>	none	<i>SnaBI tac gta</i>	none
<i>BallI tgg cca</i>	none	<i>HpaII c cgg</i>	363, 407	<i>SpeI a ctagt</i>	none
<i>BamHI g gatcc</i>	none	<i>KasI g gcgcc</i>	none	<i>SphI gcatg c</i>	none
<i>BanIII at cgat</i>	519	<i>KpnI ggtac c</i>	none	<i>SsplI aat att</i>	none
<i>BbeI ggcgc c</i>	none	<i>MboI  gatc</i>	184, 267	<i>SstI gagct c</i>	none
<i>BbrPI cac gtg</i>	none	<i>MfeI c aattg</i>	none	<i>SstII ccg gg</i>	none
<i>BbuI gcatg c</i>	none	<i>MluI a cgcgt</i>	none	<i>StuI agg cct</i>	none
<i>BcuI a ctagt</i>	none	<i>MscI tgg cca</i>	none	<i>SwalI attt aaat</i>	none
<i>BclI t gatca</i>	none	<i>MseI t taa</i>	14, 323, 387, 431	<i>TaqI t cga</i>	196, 234, 294,
<i>BfaI c tag</i>	none	<i>MspI c cgg</i>	363, 407	<i>TliI c tcgag</i>	none
<i>BfrI c ttaag</i>	none	<i>NaeI gcc ggc</i>	none	<i>VspI at taat</i>	none
<i>BfrBI atg cat</i>	none	<i>NarI gg cgcc</i>	none	<i>XbaI t ctaga</i>	none
<i>BglII a gatct</i>	none	<i>NcoI c catgg</i>	569	<i>XhoI c tcgag</i>	none
<i>BlnI c ctagg</i>	none	<i>NdeI ca tatg</i>	none	<i>XmaI c ccggg</i>	none
<i>BseCI at cgat</i>	519	<i>NdeII  gatc</i>	184, 267		



**ANEXO 5.** Alineamiento con programa de la secuencia solicitada de síntesis química del gen de la proteína putativa 2b de AV2 (GenBank: AB745636.1) en relación a la secuenciación del ADN plasmídico purificado del clon 20 de AV2-2b, obtenida posterior a la clonación en el plásmido pJET1.2/Blunt.

La comparación entre la secuencia solicitada de síntesis química y la presente en la subclonación en el plásmido PJET1.2/Blunt indica que son idénticas en un 100%

**Matriz de puntos**



**Identidad de secuencias**

Sequence ID: Query\_61909 Length: 1161 Number of Matches: 1

Range 1: 32 to 650 [Graphics](#)

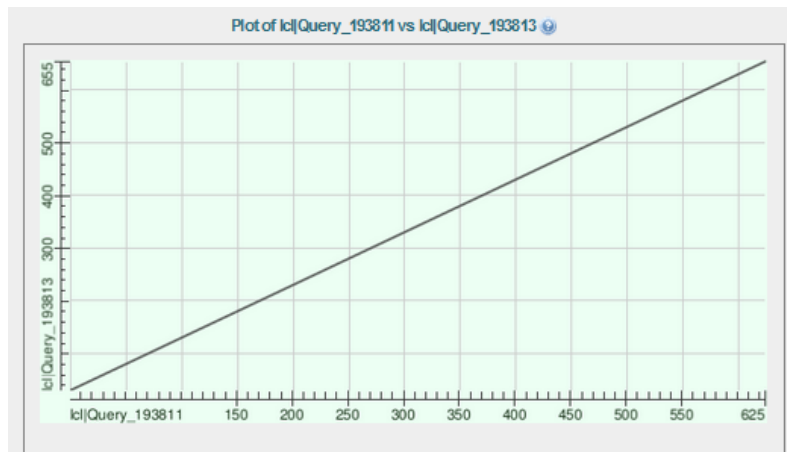
▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1144 bits(619)	0.0	619/619(100%)	0/619(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAACCATGGAAACAAAACTCATCTCAGAAAGGGATCTGAATGCTCAAAGGAAAGTGTGTC	60		
Sbjct 32	AAAAACCATGGAAACAAAACTCATCTCAGAAAGGGATCTGAATGCTCAAAGGAAAGTGTGTC	91		
Query 61	AAAAATTTCCACACCGACGGAGCTCGCGTGGACGCTGGGAATTTATTCCCAAGATTAAAG	120		
Sbjct 92	AAAAATTTCCACACCGACGGAGCTCGCGTGGACGCTGGGAATTTATTCCCAAGATTAAAG	151		
Query 121	TCCGATGATGATTACCGGATTTTTCTAATGGTGATCTTAGCACCATTAGAGGCTCGTCA	180		
Sbjct 152	TCCGATGATGATTACCGGATTTTTCTAATGGTGATCTTAGCACCATTAGAGGCTCGTCA	211		
Query 181	GTTTCCAAGACTGACTGCGGTTTCAGGAAAAGTGCTCCGACACCGCCAGCTCAATTGGTAAT	240		
Sbjct 212	GTTTCCAAGACTGACTGCGGTTTCAGGAAAAGTGCTCCGACACCGCCAGCTCAATTGGTAAT	271		
Query 241	AAAAATACCAGACCTCGCAATCGATTTTCGAGCTGAAGGAGTTCAACCAACCCAGCGGTTGT	300		
Sbjct 272	AAAAATACCAGACCTCGCAATCGATTTTCGAGCTGAAGGAGTTCAACCAACCCAGCGGTTGT	331		
Query 301	TATTCAAACCGTTTACCGCCGAATCATCGGCGAAGTTCCTAAAGGTTGGTATGGTTTGAA	360		
Sbjct 332	TATTCAAACCGTTTACCGCCGAATCATCGGCGAAGTTCCTAAAGGTTGGTATGGTTTGAA	391		
Query 361	GTCCTGGTCTTCTCCAATTATGGAGATGTGGTGACAGGGCTGAAAAGGGCCGACGGGC	420		
Sbjct 392	GTCCTGGTCTTCTCCAATTATGGAGATGTGGTGACAGGGCTGAAAAGGGCCGACGGGC	451		
Query 421	TAAAGTGCAITTTTCTATTCCGGGTTCTGATTGGGCTTATACACTCAATCTATCCGATGT	480		
Sbjct 452	TAAAGTGCAITTTTCTATTCCGGGTTCTGATTGGGCTTATACACTCAATCTATCCGATGT	511		
Query 481	GGTTTCTGGGCTTGCACTACCCAAGTTACCAATTCCTGAGAAATATCTCAAGATGCCCAT	540		
Sbjct 512	GGTTTCTGGGCTTGCACTACCCAAGTTACCAATTCCTGAGAAATATCTCAAGATGCCCAT	571		
Query 541	TTCTTTTGAAATGGATGATTCCGCTCTTTGGTGACAGAAATTTCTGATCGAGTACCATCTCC	600		
Sbjct 572	TTCTTTTGAAATGGATGATTCCGCTCTTTGGTGACAGAAATTTCTGATCGAGTACCATCTCC	631		
Query 601	TTGGTACCTCGGTCAATGA 619			
Sbjct 632	TTGGTACCTCGGTCAATGA 650			

**ANEXO 6.** Alineamiento de la secuencia solicitada de síntesis química del gen de la proteína putativa 2b de SpLV (GenBank: NC\_003809.1) en relación a la secuenciación del ADN plasmídico purificado del clon 33 de SpLV-2b, obtenida posterior a la clonación en el plásmido pJET1.2/Blunt.

La comparación entre la secuencia solicitada de síntesis química y la presente en la subclonación en el plásmido PJET1.2/Blunt indica que son idénticas en un 100%

**Matriz de puntos**



**Identidad de secuencias**

Sequence ID: Query\_193813 Length: 1094 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 655 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1155 bits(625)	0.0	625/625(100%)	0/625(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGATGCGATGTTAATCAGGA			60
Sbjct 31	AAAAACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGATGCGATGTTAATCAGGA			90
Query 61	ACAGATGATTCGTTCTCACGGAAAAAGAATCGTGGATGCTGGGAGTATGTCCCAAGATG			120
Sbjct 91	ACAGATGATTCGTTCTCACGGAAAAAGAATCGTGGATGCTGGGAGTATGTCCCAAGATG			150
Query 121	TTGCAGACTGATGTGTCTGTCTCTGTTACTGATAAATCTTCCACAGTAACAGAGGCTCG			180
Sbjct 151	TTGCAGACTGATGTGTCTGTCTCTGTTACTGATAAATCTTCCACAGTAACAGAGGCTCG			210
Query 181	TCGGTTTCCCAACCGATTGCGGTGATGGAGGGTGTCCAGATCCGCCAGCTCGATTGGT			240
Sbjct 211	TCGGTTTCCCAACCGATTGCGGTGATGGAGGGTGTCCAGATCCGCCAGCTCGATTGGT			270
Query 241	AGTAAAAATACCAAACTCGCCATAGATTCGAGCTGCAGGAGTTCACCAACCCGCGGT			300
Sbjct 271	AGTAAAAATACCAAACTCGCCATAGATTCGAGCTGCAGGAGTTCACCAACCCGCGGT			330
Query 301	CGTGATCCAGACCGTATACCGCCGAATCATCGACGAAGTGCCTAAAGGTTGGTATGGTTT			360
Sbjct 331	CGTGATCCAGACCGTATACCGCCGAATCATCGACGAAGTGCCTAAAGGTTGGTATGGTTT			390
Query 361	AAAGTCTCTGGTCTTCTCCAAATTATGGAGACGTTGTGGCCGGACTAAAAAGGGCTGCACG			420
Sbjct 391	AAAGTCTCTGGTCTTCTCCAAATTATGGAGACGTTGTGGCCGGACTAAAAAGGGCTGCACG			450
Query 421	AGTAAAGTGCAATTTTCTATACCGGGTTCAGATTGGGCTTATACCTTAAATCTGTCCGA			480
Sbjct 451	AGTAAAGTGCAATTTTCTATACCGGGTTCAGATTGGGCTTATACCTTAAATCTGTCCGA			510
Query 481	AGTGGTATCTGGGTTAGCACTCCCAAAATTACCAATCCCGAGAAATATCTCAGGATGCC			540
Sbjct 511	AGTGGTATCTGGGTTAGCACTCCCAAAATTACCAATCCCGAGAAATATCTCAGGATGCC			570
Query 541	GATTGCTATCACAATCGATGATACCGTCAATAAAATTGGCGATGGTTTTGATGATGTACC			600
Sbjct 571	GATTGCTATCACAATCGATGATACCGTCAATAAAATTGGCGATGGTTTTGATGATGTACC			630
Query 601	ATCTCCTGGTACTTGTATCAATGA			625
Sbjct 631	ATCTCCTGGTACTTGTATCAATGA			655