

Universidad Politécnica de Valencia

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)



Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Trabajo Final de Máster

Caracterización de factores celulares involucrados en el transporte viral y en la interacción de la proteína de movimiento del *virus del bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus)* con la proteína codificada por el gen de resistencia Sw-5b

Autor:

Andrea M. Torruella Naranjo

Directores:

Jesús Ángel Sánchez Navarro

Vicente Pallás Benet

Índice

1	Introducción	1
1.1.	Los Virus	1
1.1.1.	Ciclo infectivo de un virus	2
1.1.2.	Problemática y estado de control	3
1.2.	El <i>virus del bronceado del tomate</i> (TSWV)	4
1.2.1.	Clasificación y organización genómica del TSWV.....	5
1.2.2.	Transmisión y Sintomatología asociada al TSWV	6
1.2.3.	Variabilidad genética y biológica.....	9
1.3.	Mejora genética para la resistencia a TSWV	10
1.4.	Superfamilia de las 30K	10
2.	Objetivos	13
3.	Material y Métodos.....	15
3.1.	Material vegetal	15
3.1.1.	Plantas.....	15
3.1.2.	Proteínas de movimiento de TSWV utilizadas.	15
3.1.3.	Material Bacteriano.....	16
3.1.4.	Plásmidos	16
3.2.	Métodos	18
3.2.1.	Clonación de los genes de las MPs.....	18
3.2.2.	Inoculación de plantas de <i>Nicotiana tabaccum</i> P12 y <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
3.2.3.	Detección viral mediante hibridación molecular no radioactiva tipo dot- blot.....	24
3.2.4.	Extracción de ARN total y RT-PCR	25
3.2.5.	Visualización y cuantificación de focos de infección en hojas inoculadas	26
3.2.6.	Purificación de viriones a partir de plantas infectadas	26
3.2.7.	Ensayo de BiFC	27
3.2.8.	Inmunoprecipitación de complejos MP-proteínas del huésped mediante cromatografía de afinidad.....	28
4.	Resultados y discusión	31
4.1.	Obtención de clones híbridos de TSWV en el sistema AMV	31

4.2.	Verificación de infectividad de los clones con etiqueta TST	35
4.3.	Obtención de viriones de AMV	38
4.4.	Purificación de complejos MP-proteínas del huésped.....	41
4.5.	Análisis de la posible interacción de la MP de TSWV con la proteína Hsp70 mediante la técnica de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC).....	42
5.	Conclusiones.....	49
6.	Bibliografía	51

1 Introducción

1.1. Los Virus

Los postulados de Robert Koch enunciados en 1882 sentaron las bases para la asociación y potencial identificación de los agentes causantes de enfermedades infecciosas. Estos postulados eran los siguientes: 1) El microorganismo debe estar presente en todos los casos de la enfermedad, y ausente en los organismos sanos; 2) El organismo debe de ser aislado y obtenido en un cultivo puro a partir de lesiones de la enfermedad; 3) La inoculación del agente a partir del cultivo debe reproducir la enfermedad y; 4) El organismo debe de poder recuperarse nuevamente a partir de las lesiones del huésped.

Gracias a éstas y a otras aportaciones se descubrió un nuevo agente infeccioso al que se le denominó virus (proveniente del latín, para referirse a “venenos”) siendo el primer virus identificado el conocido como el *virus del mosaico del tabaco* (Beijerinck, 1898; Iwanowski, 1892). Los virus, son entidades acelulares con una organización simple formada por el material genético, que puede ser ADN o ARN, de simple o doble cadena, linear, circular o segmentado y polaridad positiva o negativa, protegido por una cubierta proteica o cápside, que en algunos casos puede presentar una bicapa lipídica. Estos microorganismos son parásitos estrictos de la maquinaria celular, dependiendo de células vivas para llevar a cabo su ciclo de infección.

Hasta hace relativamente poco tiempo el tamaño de genoma viral podría oscilar entre 10^6 a 10^8 Daltons, con capacidad para expresar desde 3-4 hasta más de 100 proteínas, respectivamente. El genoma viral junto con varias subunidades de la/s proteínas de cubierta o cápside (CP) codificadas por el virus, constituyen la partícula vírica completa o virión. Su tamaño y forma puede ser muy variable oscilando entre 10-400 nm de diámetro y morfología icosaédrica, en varilla o helicoidal. Con el descubrimiento de los mimivirus y otros virus relacionados la frontera entre el tamaño de un virus y una bacteria se ha estrechado. Así, estos virus gigantes presentan un tamaño entre 200 y 1.000 nm y la longitud de su genoma puede llegar hasta los 2,5 Mb pudiendo codificar hasta 1.000 proteínas.

1.1.1. Ciclo infectivo de un virus

Durante el ciclo viral se generan partículas víricas utilizando la maquinaria del huésped y las propias proteínas codificadas por el virus.

En plantas, la entrada de los viriones a las células vegetales puede producirse de varias formas dependiendo del ciclo o estabilidad de la especie viral. Así, los virus pueden transmitirse por contacto o mecánicamente (Lacasa *et al.*, 2001), por vectores biológicos tales como insectos, representando el principal grupo de trasmisión de virus vegetales (Harris, 1981), hongos, nematodos, por semilla (Aparicio *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2008), por propagación vegetativa (van der Vlugt, 2009) o por soluciones nutritivas (Lot *et al.*, 2002). Una vez dentro, se produce la desencapsidación, seguida de la traducción y replicación. El material genético se va uniendo a la maquinaria de traducción a medida que se va liberando para evitar la completa desprotección que podría provocar una degradación por nucleasas celulares (Figura 1).

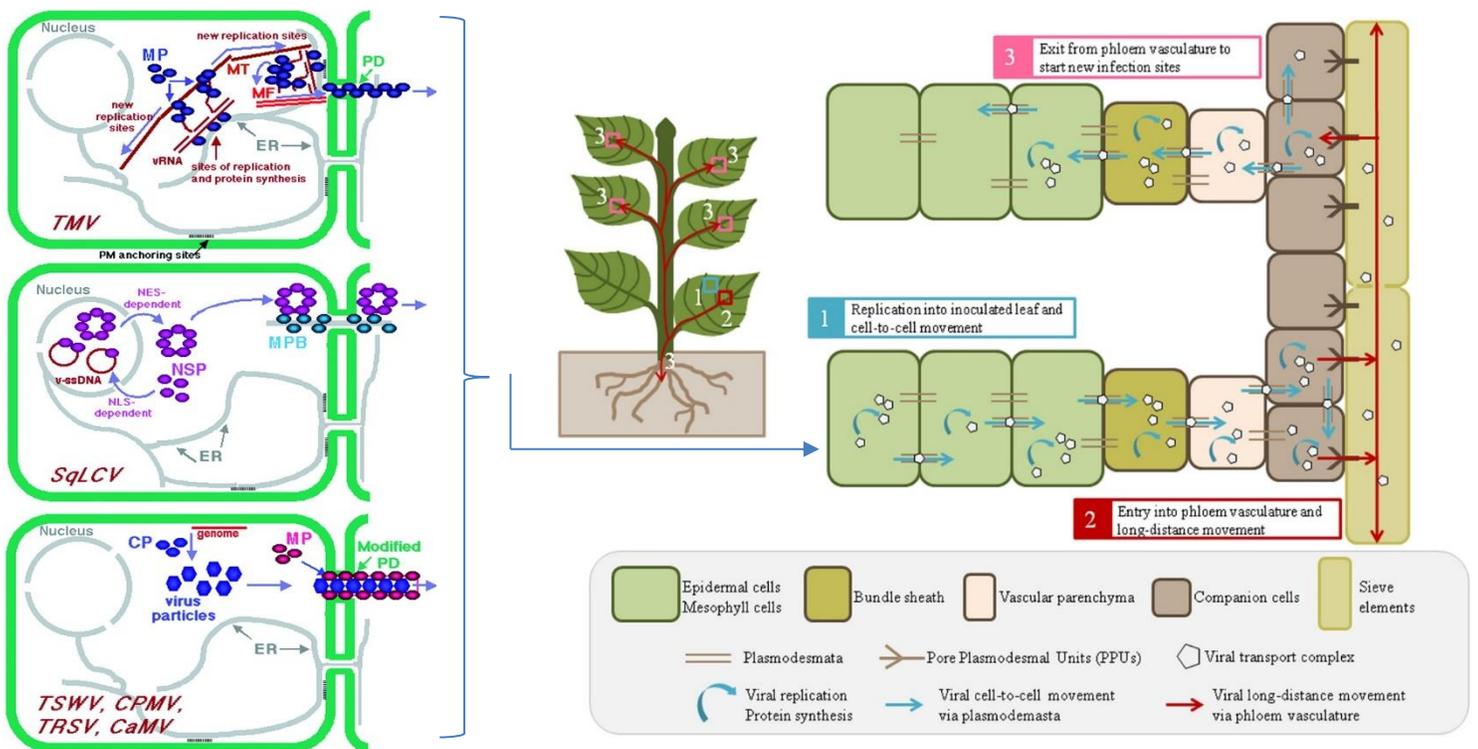


Figura 1. Diagrama general de las distintas etapas que conforman el ciclo de vida de los virus. A la izquierda, representación esquemática de los diferentes modelos de transporte intracelular. CaMV, *Cauliflower mosaic virus* (caulimovirus); CPMV, *Cowpea mosaic virus* (Comovirus); CP, proteína de la cubierta; ER, retículo endoplásmico; MF, microfilamento;

MP, proteína de movimiento; MT, microtúbulo; NES, señal de exportación nuclear; NLS, señal de localización nuclear; NSP, proteína lanzadera nuclear; PD, plasmodesmata; SqLCV, *Squash leaf curl virus* (Geminivirus); TMV, *Tobacco mosaic virus* (Tobamovirus); TRSV, *Tomato ringspot virus* (Nepovirus); TSWV, *Tomato spotted wilt virus* (Tospovirus), ARNv, genoma de ARN viral; v-ssADN, genoma de ADN de cadena simple viral. <http://www.plantcell.org/content/11/4/535>.

A la derecha, esquema general del transporte a corta y larga distancia Fuente: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00154/full>

Gracias al uso de la maquinaria del huésped y después de pasar por el proceso de traducción, se obtienen las proteínas estructurales como la CP, y no estructurales como la replicasa o las proteínas de movimiento (movement protein; MP), así como otras proteínas virales específicas. Las MPs son las responsables del movimiento del virus al resto de la planta. El movimiento célula-célula es la primera etapa y transporta el virus desde las primeras células infectadas a las vecinas a través de los plasmodesmos (Fernández-Calviño *et al.*, 2011). El movimiento sistémico se produce cuando el virus alcanza el sistema vascular para infectar las partes distales de la planta (Pallás *et al.*, 2011). Durante el proceso de transporte, los virus de plantas no solo tienen que salvar la barrera de la pared celular a través de los plasmodesmos, sino que tienen que poder acceder e infectar diferentes tipos de células que forman parte del tejido vascular (Figura 1).

Las interacciones moleculares entre proteínas del huésped y del virus son imprescindibles para el desarrollo de cualquier enfermedad viral. Estas interacciones pueden afectar a la replicación viral, al movimiento a corta o a larga distancia, al desarrollo de los síntomas y al desencadenamiento del sistema defensivo de la planta (Carrington y Whitham, 1998; Lazarowitz, 1999; Pallás y García, 2011). En el caso de las proteínas de movimiento, los factores celulares caracterizados están relacionados con componentes del plasmodesmo o la periferia celular, citoesqueleto, transporte de vesículas, proteínas chaperonas, núcleo o modificadores de proteínas entre otros (Niehl and Heinlein, 2011; Link and Sonnewald, 2016).

1.1.2. Problemática y estado de control

Las enfermedades causadas por los virus en los cultivos son unos de los factores limitantes en la producción vegetal y tienen consecuencias sociales y económicas que en ocasiones son comparables a las de enfermedades de humanos y animales (Savary *et al.*, 2012). A nivel mundial las pérdidas medias producidas por enfermedades se encuentran entre un 13% y un 16% de la producción agrícola. Las pérdidas debidas a enfermedades producidas por infecciones virales representan un tercio y equivalen a 11.000 millones de euros al año (FAO 2005; Oerke 2006). Los virus son, por tanto, el segundo grupo, solo

superado por los hongos, más importante de organismos patógenos de cultivos. (García-Arenal y McDonald, 2003). Por ejemplo, el *virus del bronceado del tomate*, (TSWV, por sus siglas en inglés *Tomato Spotted Wilt Virus*) produce pérdidas por un valor de 860 millones de euros al año al nivel mundial en cultivos hortícolas y en ornamentales (Andret-Link y Fuchs, 2005).

En la naturaleza, las epidemias de virus también ocurren, pero debido a la separación espacial entre las comunidades de plantas parecidas, disminuye la cantidad de fuentes del virus capaz de iniciar una epidemia. Por otro lado, la presencia de depredadores y parásitos de los vectores virales unido a la mezcla de diferentes especies de plantas silvestres que no son huéspedes de un determinado virus, contribuye a la disminución de la propagación del patógeno. Por último, la co-evolución entre los virus y las plantas ha dado lugar a la selección de resistencias naturales del huésped y tolerancia a virus y vectores, lo cual representaba una forma de control natural. Sin embargo, desde que el hombre empezó a cultivar y a generar monocultivos, introducir especies nuevas en otras localizaciones ha posibilitado que las plantas se enfrenten a nuevos virus, con el consiguiente riesgo de expandir vectores, virus y la posible aparición de epidemias (Bos, 1992; Buddenhagen, 1977; Thresh, 1980, 1981, 1982). Para evitar estas epidemias se han implementado ciertas prácticas que incluyen la selección de propágulos de crecimiento más vigoroso (a menudo estos propágulos concentran resistencias vectoriales de los ancestros silvestres), interplantación de cultivos no relacionados que a menudo no son hospedadores, rotación de cultivos, deshierbe, etc. (Jones, 1981; Thresh, 1982).

1.2. El *virus del bronceado del tomate* (TSWV)

El TSWV fue reportado por primera vez en Australia por Brittlebank en 1919 (Leastro *et al.*, 2017; Stevens *et al.*, 1991). Es uno de los virus de plantas más devastadores a nivel mundial, causando daños severos en muchos cultivos de interés agronómico. En 1920 fue nuevamente descrito en Canadá y en E.E.U.U, y en 1931 es detectado en Reino Unido (Smith, 1932). En la actualidad está presente en países de zonas tropicales y subtropicales.

El TSWV afecta a más de 1090 especies de plantas pertenecientes a 85 familias botánicas (15 familias de plantas monocotiledóneas, 69 familias de plantas dicotiledóneas y una familia de pteridofitas) (Prins y Golsbach 1998; Parrella *et al.*, 2003). Es un factor limitante para cultivos como el tomate, la lechuga y el pimiento, además de infectar a otros cultivos de interés como patata, tabaco, cacahuete, haba, papaya, piña, berenjena, col, pepino, guisante, espinaca, alcachofa, apio, coliflor, etc. (Turina *et al.*, 2012).

1.2.1. Clasificación y organización genómica del TSWV

El TSWV pertenece al género Tospovirus, y es el único miembro dentro de la familia Bunyaviridae que infecta a plantas (Milne y Francki, 1984). Su genoma consiste en tres cadenas simples de ARN: la cadena Larga (L), de polaridad negativa, y la cadena mediana (M) y pequeña (S), que son ambisentido. El segmento L tiene un tamaño de 8.9 Kb y codifica para una polimerasa de ARN, ARN dependiente (RdRp) (de Haan *et al.*, 1991); el segmento M tiene un tamaño de 4,8 kb y en un sentido expresa la proteína no estructural NSm, que actúa como proteína de movimiento (Lewandowski and Adkins, 2005; Li *et al.*, 2009; Storms *et al.*, 1995; Peiró *et al.*, 2014) y en el otro, un precursor de una glicoproteína, GN/GC, que contiene determinantes para la transmisión por Trips (Sin *et al.*, 2005). Por último, el fragmento S, de 2.9 Kb, codifica en un sentido para un supresor del silenciamiento (NSs) (Takeda *et al.*, 2002) y en el sentido complementario, la proteína de la nucleocápside (N) usada en la encapsidación del ARN viral (Figura 2). Así, el genoma de este virus presenta en total cinco marcos de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frames*) con capacidad para codificar seis proteínas.

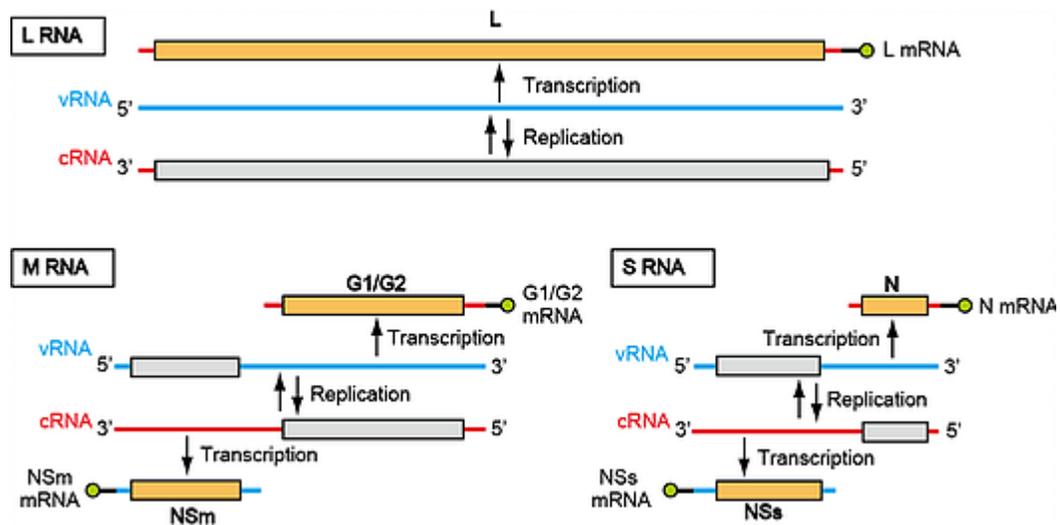


Figura 2. Diagrama del mecanismo de expresión génica del TSWV. En la reacción de replicación, la forma predominante del ARN en el virión, vARN (en azul), es usado como molde para sintetizar la cadena complementaria, cARN (en rojo). En la reacción de transcripción, cada mARN se transcribe del vARN y del cARN. Todos los mARN virales tienen una estructura cap representada como círculos verdes, que se obtiene a partir de mARNs celulares por el mecanismo de captura de caperuza. Fuente: <https://www.komodak.com/tospovirus-en>

Las partículas víricas tienen una forma esférica con un diámetro de 80-120 nm donde los tres segmentos de ARN adoptan conformaciones pseudocirculares debido al apareamiento de secuencias parcialmente complementarias entre los extremos 5' y 3'

terminales de cada uno (de Haan *et al.*, 1989). Estas regiones terminales están conservadas y constituyen importantes señales para la transcripción y replicación del virus. Además, cada ARN genómico está encapsidado por múltiples copias de la proteína N y asociado a un número bajo de moléculas de la proteína L (RdRp) formando estructuras ribonucleoproteicas (RNP) denominadas nucleocápsidas (de Haan, 1991; Kormelink *et al.*, 1992) (Figura3).

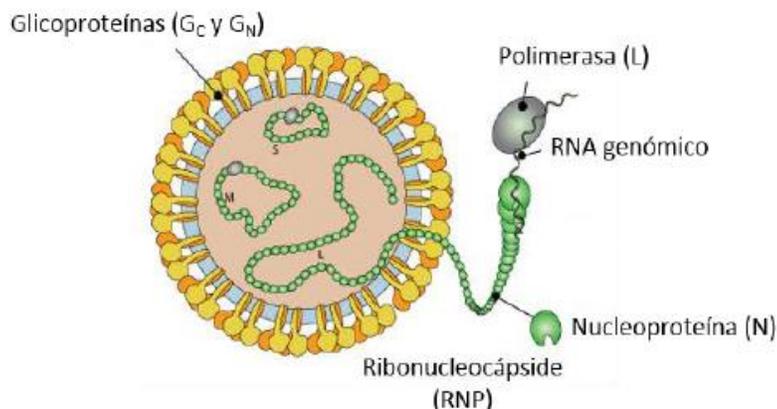


Figura 3. Estructura de una partícula de TSWV, donde se observan los tres fragmentos de ARN viral, S, M y L. GN y GC, glicoproteínas; N, proteína de la cápside y L (RdRp). Fuente: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/253.html.

1.2.2. Transmisión y Sintomatología asociada al TSWV

En la naturaleza el TSWV infecta a plantas usando trips como vector, insectos del orden *Thysanoptera*, y la familia *Thripidae*. Los trips adquieren y transportan el virus al alimentarse del citoplasma de las células vegetales mediante su aparato bucal chupador. En la tabla 1 se muestran las especies de trips capaces de transmitir el virus (Granval de Millán y García, 1999; Mound, 1996), destacando la especie *F. occidentalis* por ser la más eficaz debido a la extensa gama de plantas que utiliza para su alimentación, su amplia distribución geográfica y su gran eficiencia en el transporte del virus con respecto a las demás especies (Roselló *et al.*, 1996; Sakurai, 2004; Pappu *et al.*, 2009).

Especie	Nombre común
Vectores confirmados	
<i>Frankliniella fusca</i>	Trips del tabaco
<i>Frankliniella intosa</i>	
<i>Frankliniella occidentalis</i>	Trips occidental de las flores
<i>Frankliniella schultzei</i>	Trips común de las flores
<i>Thrips palmi</i> Karmy	Trips común del melón
<i>Thrips setosus</i> Moulton	
<i>Thripstabaci</i> Linderman	Trips de la cebolla
Vectores que requieren posteriores confirmaciones	
<i>Scirtothrips dorsalis</i> Hood	Trips del pimiento
<i>Thrips flavus</i> Schrank	
Vectores no confirmados	
<i>Frankliniella tenuicornis</i>	

Tabla 1. Tysanopteros vectores de *Tospovirus*. Fuente: Granval de Millán y García, 1999.

La transmisión del virus por el vector es de tipo propagativo, persistente y circulativa (Goldbach y Peters 1994). Es la larva la que inicia el ciclo de infectividad. Si esta no contrae el virus alimentándose de una planta infectada en su primera fase o al inicio de la segunda fase larval, el adulto no lo hará. Los virus pueden ser adquiridos con periodos de alimentación de tan sólo 15 a 30 segundos (Ohnishi *et al.*, 1998), pero cuanto más larga sea esta fase, más eficiente será posteriormente la transmisión (Wijkamp *et al.*, 1993). Tras la ingesta y antes de poder transmitir el virus, tiene lugar el denominado tiempo promedio mínimo de adquisición (TPMA). Durante este tiempo los viriones se multiplican, pasando desde las glándulas salivares a las células intestinales. Esto solo es posible en la fase larval debido a la proximidad de los órganos (Whitfield *et al.*, 2005) (Figura 4).

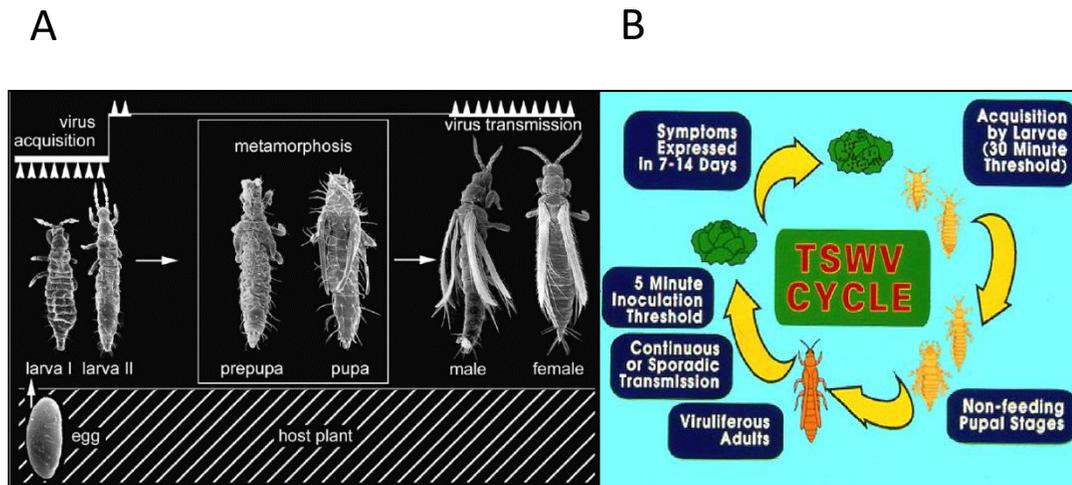


Figura 4. A) estadios del vector *F. occidentalis* donde es capaz de adquirir el virus. Fuente: https://www.researchgate.net/publication/8663571_Tospovirus_transmission_depends_on_thrips_ontogeny B) Esquema del ciclo de transmisión del TSWV por Trips. Fuente: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/TomatoSpotted.aspx>.

El manejo de la enfermedad causada por TSWV ha sido extremadamente difícil debido a su amplia gama de huéspedes y a la resistencia de los vectores de trips a los insecticidas (Boiteux y Giordano, 1993). La sintomatología asociada a la infección de TSWV está condicionada por la especie de planta afectada y el aislado del virus, englobando un gran abanico de síntomas, entre los que se encuentran: anillos necróticos, clorosis, enanismo, abullonamientos y lesiones locales. Además, tanto los factores genéticos como los ambientales parecen afectar la susceptibilidad del hospedador y la severidad de los síntomas inducidos (Francki *et al.*, 1985). Por otro lado, el control de la transmisión de la enfermedad resulta muy complicado al influir las características biológicas, ecológicas y poblacionales del vector (Contreras *et al.* 2007) (Figura 5).



Figura 5. Síntomas asociados a la infección de TSWV en fruto de pimiento (A) o en hojas de tomate (B). <https://vegetableguide.usu.edu/diseases/tomato-pepper-eggplant/tomato-spotted-wilt-virus> y https://ag.purdue.edu/btny/ppdl/Pages/POTW_old/5-2-11.html

1.2.3. Variabilidad genética y biológica

La variabilidad entre las diferentes poblaciones existentes del TSWV podría deberse a la alta frecuencia de mutación ocasionada por su replicasa, que es del orden de 10^{-4} - 10^{-5} mutaciones/nucleótido (Drake *et al.*, 1998), a su alta tasa de replicación en las plantas infectadas, a la gran variedad de hospedadores y a su capacidad de replicación en los insectos vector. Además, otros factores a considerar residen en la composición tripartita de su genoma, propiciando eventos de recombinación o reordenación de sus segmentos, así como la aparición de nuevos aislados asociados a la presión selectiva provocada por el uso de genes de resistencia en los cultivos comerciales.

No obstante, a pesar de su capacidad para evolucionar, el TSWV presenta una diversidad genética moderada debido, en parte, a los pocos cambios genéticos que generalmente son necesarios para adaptarse (Tsompana *et al.*, 2005; López *et al.*, 2011; Tentchev, *et al.*, 2011). Los aislados de todo el mundo se pueden clasificar en tres genotipos basándose en su identidad nucleotídica. La modulación de la diversidad y estructura genética pueden deberse a: i) la comercialización global de los materiales vegetales infectados que causa uniformidad genética entre aislados presentes en diferentes países, ii) la selección negativa que procura conservar la función de las proteínas víricas y, en iii) la selección positiva para adaptarse a nuevas situaciones, tales como la superación a resistencias genéticas del huésped.

En cuanto a la diversidad biológica, no existe una clasificación establecida. Los estudios basados en la reacción de este virus, en plantas indicadoras realizados hasta la fecha, se han limitado a un pequeño número de aislados (García-Arenal *et al.* 2001, López *et al.* 2011, Tsompana *et al.* 2005). Otra clasificación útil está basada en la capacidad de superar las

resistencias obtenidas en tomate y pimiento gracias a la mejora genética. En esta se consideran cuatro biotipos: aislados convencionales incapaces de infectar tomate y pimiento resistentes, aislados que superan la resistencia de tomate, aislados que superan la resistencia de pimiento y aislados que superan las resistencias de tomate y pimiento (Ferrand 2014).

1.3. Mejora genética para la resistencia a TSWV

Las fuentes de resistencia que han tenido más éxito de las encontradas en las últimas décadas son las provenientes de *Solanum peruvianum* y *Capsicum chinense*. Debido a su amplio espectro de acción, los genes de resistencia *Sw-5* y *Tsw* de tomate y pimiento, respectivamente (Boiteux, 1995; Moury *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1991) son los que se han estado utilizando desde 1996 en numerosos cultivares comerciales.

La resistencia mediada por *Sw-5* sigue el modelo gen-a-gen (Staskawicz *et al.*, 1995) que activa una respuesta hipersensible (HR) alrededor de los puntos de infección del TSWV. El locus del *Sw-5* contiene al menos 5 parálogos (denominados desde el *SW-5a* al *Sw-5e*), pero solo con el gen *Sw-5b* es suficiente para conferir resistencia (Peiró *et al.* 2014, Spassova *et al.*, 2001). Este gen codifica una proteína de 1246 aminoácidos y es un miembro de la familia de receptores NB-LRR con un dominio de solanáceas (SD)-coiled-coil (CC) N terminal, actualmente conocido como la clase SD-CNL (Leastro *et al.*, 2017, De Oliveira *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). La MP del TSWV ha sido identificada como el factor de avirulencia (*Avr*) que activa la respuesta hipersensible (Leastro *et al.*, 2017; Hallwass *et al.*, 2014; Peiro *et al.*, 2014).

Las estrategias de control basadas en el gen *Sw-5b* se ven afectadas por el surgimiento de aislados de TSWV capaces de superar la resistencia. Estos aislados han sido reportados en Sudáfrica (Thompson and van Zijl, 1995), Hawái (Canady *et al.*, 2001; Gordillo *et al.*, 2008), Australia (Latham and Jones, 1998), España (Aramburu and Marti, 2003) e Italia (Ciuffo *et al.*, 2005; Zaccardelli *et al.*, 2008). El análisis de varios aislados de TSWV sugirió que la resistencia conferida por *Sw-5b* podía ser superada gracias a dos sustituciones independientes de aminoácidos (C118Y y T120N) en la MP como resultado de una selección positiva (López *et al.*, 2011). Posteriormente, se comprobó que estos cambios de 1-2 residuos de amino ácidos de la MP de TSWV son suficiente para superar la resistencia pero que, a la vez, afectaron a la eficiencia de la MP (Peiró *et al.*, 2014). Recientemente, se ha comprobado que la región de 21 aminoácidos comprendida entre los residuos 115 y 135 de la MP de TSWV, es la responsable de activar la HR a través de su interacción directa con la proteína codificada por el gen de resistencia *Sw-5b* (Zhu *et al.*, 2017).

1.4. Superfamilia de las 30K

La superfamilia 30K, o grupo de proteínas de movimiento virales relacionadas con las MP de 30 KDa del *virus del mosaico del tabaco* (por sus siglas en inglés, TMV, *Tobacco mosaic virus*), está constituida por 20 géneros virales: alfamovirus, baADNvirus,

begomovirus, bromovirus, capilovirus, caulimovirus, comovirus, cucumovirus, diantovirus, furovirus, ilarvirus, idaeovirus, nepovirus, tobamovirus, tobavirus, tospovirus, tricovirus, tumbusvirus, sequivirus, umbravirus. La estructura y función de las MPs virales pertenecientes a esta familia se encuentran relativamente bien caracterizadas. Aunque comparten gran parte de sus funciones, poseen pocos motivos conservados en su secuencia y la Superfamilia engloba tanto a proteínas formadoras de túbulos como no formadoras. La única característica conservada es el motivo LXXD50-60G (Melcher, 1990). Esta baja similitud podría indicar una estructura terciaria común. Mediante la realización de alineamientos se vio que había una estructura “core” común, flanqueada por un N-terminal (Nt) y un C-terminal (Ct) variables, cuya estructura consistía en cuatro α -hélices (α -A-D) y siete elementos- β (β -1-7). La región Nt posee numerosas α -hélices y es de una longitud variable, siendo más larga en aquellas MPs conocidas como formadoras de túbulos y para la MP de *idaevirus*. La parte Ct es mayoritariamente desestructurada (random coil) (Peiró *et al.*, 2014, Berna *et al.*, 1991) y se ha comprobado que no es necesaria para el movimiento célula a célula, pero está implicada tanto en la regulación de la función de la MP como en la interacción con la CP (Aparicio *et al.*, 2010, Sanchez-Navarro and Bol, 2001, Stabolone *et al.*, 2005, Waigmann *et al.*, 2000). Análisis bioquímicos con diferentes miembros de la familia han puesto de manifiesto que son proteínas asociadas a endomembranas, con ambos extremos orientados hacia el citosol (Leastro *et al.*, 2015; Martínez-Gil *et al.*, 2009; Peiró *et al.*, 2014b), incluida la MP de TMV donde previamente se había propuesto como una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático con dos dominios transmembrana (Brill *et al.*, 2000). El carácter hidrofóbico de las MPs virales ha condicionado la caracterización de factores celulares que interactúan con ellas mediante aproximaciones estándar (e.j. sistema de doble híbrido, etc), teniendo que recurrir a versiones modificadas de la proteína (sin región hidrofóbica) o a parte de la molécula para abordar el análisis (Peiró *et al.*, 2014; von Bargen *et al.*, 2001).

Los análisis realizados con el *Virus del mosaico de la alfalfa* (en inglés, *Alfalfa mosaic virus*; AMV) y el intercambio de diferentes proteínas de movimiento pusieron de manifiesto que las MPs de la superfamilia 30K pertenecientes a siete géneros virales, incluyendo virus de ARN y ADN, son funcionalmente intercambiables por la MP del AMV, indicando que una o más propiedades básicas de estas proteínas tienen que estar asociadas con las estructuras secundarias o terciarias conservadas (Fajardo *et al.*, 2013, Sanchez-Navarro and Bol, 2001, Sanchez-Navarro *et al.*, 2006, Sanchez-Navarro *et al.*, 2010). Análisis posteriores realizados con la proteína de movimiento de diferentes virus del género *Tospovirus* pusieron de manifiesto que son funcionalmente intercambiables en el sistema de AMV para el transporte a corta y larga distancia (Peiró *et al.*, 2014; Leastro *et al.*, 2017).

La inexistencia de clones infecciosos para *Tospovirus* está condicionando el estudio de este género viral mediante aproximaciones de genética reversa. Sin embargo, la observación de que MPs de tospovirus son funcionalmente intercambiables en el sistema de AMV está permitiendo avanzar en la caracterización molecular de estas proteínas. En el presente trabajo hemos utilizado el sistema de AMV para estudiar diferentes proteínas de movimiento de TSWV, con capacidad para superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*

y caracterizar factores celulares implicados en su funcionalidad mediante sistemas alternativos basado en el etiquetado de la proteína.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo final de máster consiste en la caracterización de complejos moleculares relacionados con el transporte de *virus del bronceado del tomate* (TSWV) así como con el gen de resistencia *Sw-5b*, mediante el sistema híbrido basado en el *virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), que permite el intercambio funcional de su MP con la correspondiente MP del TSWV. Para ello se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- 1- Puesta a punto del sistema híbrido de AMV con proteínas de movimiento de TSWV, que difieren en la capacidad para superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*, y conteniendo la etiqueta TST (Twin-Strep-tag; WSHPQFEKGGGSGGGS GGSWSHPQFEK).
- 2- Identificación y posible caracterización de factores celulares que interaccionen directa o indirectamente con las diferentes variantes de la MP de TSWV.
- 3- Caracterización de factores celulares involucrados en la respuesta hipersensible mediada por el gen *Sw-5b*.
- 4- Análisis mediante BiFC de la interacción de la MP de TSWV con factores celulares descritos para otras MPs de la familia 30k.

3. Material y Métodos

3.1. Material vegetal

3.1.1. Plantas.

Para la purificación de viriones conteniendo el ARN 3 de AMV encapsidado, se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* que expresan de forma constitutiva las subunidades P1 y P2 de la polimerasa de AMV (Plantas P12) (Taschner *et al.* 1991), en un estadio de 4-6 hojas. Las plantas fueron sembradas en macetas de 12 centímetros de diámetro con una mezcla de turba y vermiculita en un fitotrón con las siguientes condiciones de crecimiento:

- Régimen térmico de 25°C/19°C (día/noche).
- Humedad relativa de 60-65%/95-100% (día/noche).
- Fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad con una irradiancia de 65-85 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes con un intervalo de longitud de onda de entre 400-700 nm.

Por otra parte, se usaron plantas de *N. benthamiana*, también en un estadio de 4-6 hojas, para la obtención de viriones completos, así como en los experimentos de expresión transitoria mediante agroinfiltración. Las plantas fueron sembradas en macetas de 12 centímetros con una mezcla de turba y vermiculita, incubándose en condiciones de invernadero.

3.1.2. Proteínas de movimiento de TSWV utilizadas.

Para este trabajo se utilizaron 4 secuencias de MPs de TSWV: la primera pertenece al aislado silvestre denominado Gr1NL2 (Genbank HM015513), el cual no es capaz de superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*; la segunda corresponde al aislado denominado Grau (GenBank FM163370) que sí es capaz de superar la resistencia conferida por el gen *Sw-5b* (López *et al.*, 2011) y que difiere en dos residuos de amino ácido con respecto a la MP del aislado Gr1NL2 (N120, I130); y dos variantes de la MP del aislado GRAU, obtenidos mediante mutaciones aminoacídicas puntuales, en las que la Asparagina (N) de la posición 120 está sustituida por una Treonina (T) (GrauTSWV/T120) o la isoleucina (I) en la posición 130 ha sido sustituida por una valina (V) (Grau TSWV/V130). Ambas variantes no son capaces de superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b* (Peiró *et al.*, 2014).

3.1.3. Material Bacteriano

La bacteria empleada para la clonación y purificación de los plásmidos fue la cepa DH5 α de *Escherichia coli* mientras que los experimentos de expresión transitoria en planta se realizaron con la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*.

3.1.4. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo fueron pUC18, pBluescript II SK (pSK) y pMOG800:

El pUC18 contiene un gen de resistencia a ampicilina y su pequeño tamaño permite incorporar fragmentos de unas 10.000 pares de bases (pb). Puede producir hasta 500 copias de los fragmentos de ADN insertado por célula. Además, se ha modificado para que presente muchas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción que se han agrupado en una región denominada *polylinker* o *multiple cloning site* (Figura 6). En este caso fue utilizado para la obtención de los clones quimera con la MP de TSWV en el sistema AMV.

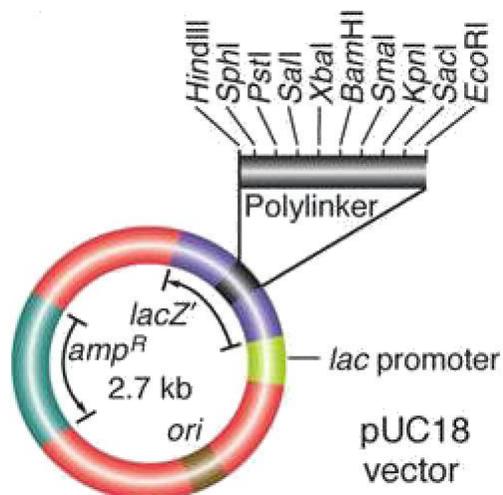


Figura 6. Representación del plásmido pUC18. Obtenida de https://www.mun.ca/biology/scarr/Plasmid_pUC18.html

El pSK, plásmido que tiene resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 7). Este fue el vector utilizado para la obtención de los clones de MP fusionados a diferentes regiones de la YFP dentro de un casete de expresión, que posteriormente se subclonó en el plásmido binario pMOG800.

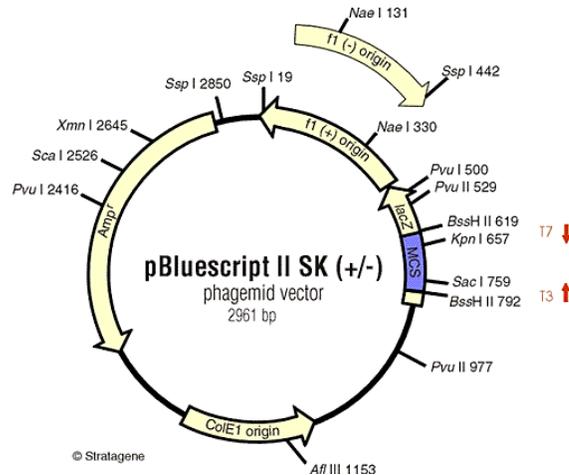


Figura 7. Representación del plásmido pBluescript II SK. Obtenida de <http://www.xenbase.org/other/static/methods/vector-files/pBSSKplus.jsp>

pMOG 800 (Figura 8) es un plásmido binario que presenta un gen que confiere resistencia a kanamicina y permite su replicación tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* en los experimentos de expresión transitoria en planta.

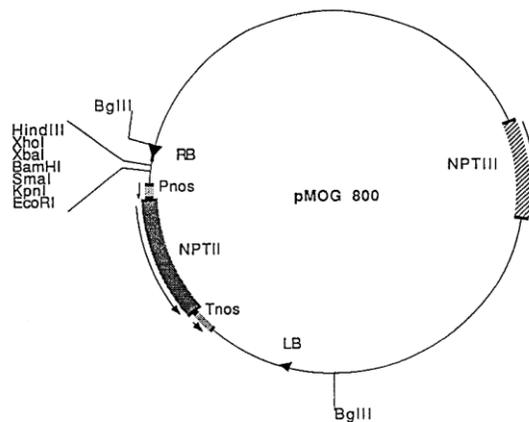


Figura 8. Diagrama del plásmido pMOG 800. Fuente: <https://www.google.com/patents/US6262344>

3.2.Métodos

3.2.1. Clonación de los genes de las MPs

3.2.1.1. Amplificación de ADN por PCR

Para la amplificación de las ORFs de las diferentes MPs de TSWV, así como del ARN 3 de AMV, se utilizaron diferentes cebadores indicados en la tabla 2. En el caso de las diferentes MPs de TSWV (Grau, Gr1NL2, GrauTSWV/T120 y GrauTSWV/V130) la amplificación se llevó a cabo con la pareja de oligos 1851/1852, que contiene los sitios de corte para las enzimas *Pst*I y *Nhe*I. Para amplificar el cADN 3 de AMV conteniendo las diferentes MPs de TSWV y/o el gen de la proteína fluorescente verde (GFP), se utilizó la pareja de cebadores 668/1602.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *Mastercycler pro* de Eppendorf, utilizando la polimerasa PrimeSTAR (Takara Bio Inc.). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25µl conteniendo: 5µl tampón 5X primeStar (Mg²⁺ + plus), 2µl del stock de dNTPs 12,5X, 2,5 µl del stock de cada cebador 10X (5 µM), ADN molde (200ng) y 0,3 µl de la enzima PrimeStar HS ADN polymerase (2,5U/µl). Las condiciones de la PCR fueron para la desnaturalización 94°C durante 15 segundos, para el alineamiento 58°C durante 15 segundos y la extensión se realizó a 72°C a razón de 1 minuto por kilo base durante 30 ciclos.

3.2.1.2. Digestión con enzimas de restricción

Los fragmentos de PCR, correspondientes a las MPs de TSWV, se digirieron con las enzimas de restricción *Pst*I y *Nhe*I (Fermentas), previa fenolización y precipitación con etanol. La digestión se realizó en un volumen final 25 µl conteniendo 1µl de cada enzima (10U/µl) en tampón Tango (Thermo Fisher Scientific) e incubándose a 37°C durante 2 horas. Posteriormente se procedió a la purificación del fragmento digerido en geles de agarosa (apartado 3.2.1.4). Junto con los fragmentos de PCR también se digirieron los vectores plasmídicos en donde se insertarían las diferentes MPs de TSWV y que contiene el ADNc 3 de AMV modificado para la expresión de la GFP (Sanchez-Navarro *et al.*, 2001) y al que previamente se ha intercambiado el gen de la MP por la correspondiente del TMV con la etiqueta TST (pUC18 GFP/TMV:TST:A44/CP), así como el ADNc 3 silvestre de AMV conteniendo la MP de TMV y un extremo 5' no traducible evolucionado para un mayor transporte a corta y larga distancia (5'ev) sin (pUC18 5'ev/TMV:A44/CP) o con la etiqueta peptídica 'TST' (pUC18 5'ev/TMV:TST:A44/CP). 2 µg de cada plásmido se digirieron con 10

unidades de las enzimas de restricción *Nco*I y *Nhe*I (Thermo Fisher Scientific), utilizando el tampón Tango en un volumen final de 40µl durante 2 horas a 37°C.

3.2.1.3. Electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación de los geles se partió de una mezcla inicial de agarosa al 1% en tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA). Antes de la gelificación de la solución de agarosa, se añadió 0,5 µl de bromuro de etidio (0,1 µg/µl) por cada 50 ml de solución. Tras la gelificación, se aplicaron las muestras a las que previamente se les agregó el correspondiente tampón de carga LB (6x) (10 mM Tris-HCl Ph 7,6, 60% glicerol, 60 mM EDTA pH 8.0, 0,03% azul de bromofenol y 0,03% xilencianol). Para determinar el tamaño de los fragmentos de PCR se empleó el marcador de tamaño de *1 kb Plus ADN Ladder* (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) y el ADN se visualizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.1.4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó con el Kit *Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit*, el cual permite obtener altas concentraciones de ADN puro para su utilización en reacciones posteriores. Los fragmentos del gel con los ADNs deseados se cortaron con un bisturí bajo luz ultravioleta y se colocaron en tubos Eppendorf. Tras estimar el peso aproximado de cada fragmento de agarosa, se añadieron 2 volúmenes del tampón de disolución (*Buffer QG*) por gramo de gel, procediendo a incubar a 50°C durante 5-10 min hasta que el fragmento de gel quedó totalmente disuelto. La solución resultante se traspasó a una columna de gel de sílice, colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 mL, que se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. Tras descartar la solución filtrada, se procedió al lavado de la columna añadiendo 0,75 ml del tampón de lavado (*Buffer PE*), centrifugando 1 min a 13.000 rpm y retirando el filtrado. Tras eliminar los restos de solución de lavado mediante una centrifugación de 1 min a 13.000 rpm, se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf para eluir el ADN retenido en la columna. Para ello, se añadieron 20 µl del tampón de elución, se incubó la columna durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm.

3.2.1.5. Reacción de ligación de ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADNligase (Promega) en un volumen final de 8µl conteniendo: 0,8 µl de tampón 10X, 1µl de polietilenglicol 3350 al 40%, 0,5µl de la T4 ADNligasa (3U/µl; Promega), 200ng del vector

plasmídico correspondiente y 400-500ng del Inserto de ADN, previamente digeridos con las correspondientes enzimas de restricción. En estas condiciones, la reacción de ligación se realiza con incubaciones a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, aunque en este trabajo, la mayoría de reacciones se incubaron durante toda la noche.

3.2.1.6. Electroporación de plásmidos en *E. coli*

Los productos de ligación o los plásmidos purificados se introdujeron en células competentes de *E. coli* o de *A. tumefaciens* mediante electroporación. Para ello, 50 µl de células competentes se mezclaron con 4µl de la reacción de ligación o con 30-50ng del plásmido correspondiente. La suspensión celular se introdujo en una cubeta de electroporación de 0,1 cm a la que se le aplicó un pulso de 1450V, utilizando el electroporador Bio-RAD GenePulser Xcell™. A las células transformadas se le agregó rápidamente 500 µl de medio LB (10 g triptona, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl por cada litro de medio) y se incubaron a 37°C durante 1 h. Posteriormente se plaquearon 150µl de la solución de células transformadas, en placas petri LB-Agar, conteniendo el antibiótico correspondiente, y se incubaron a 37°C durante 24h.

3.2.1.7. Selección de bacterias recombinantes mediante PCR de colonia

Para hacer la selección de bacterias que contenían el plásmido con el inserto adecuado se procedió a analizar directamente las colonias obtenidas en la placa de LB-Agar mediante reacciones de PCR. Para evitar falsos positivos, en cada reacción de amplificación se utilizaron dos cebadores que hibridaran con el inserto y vector plasmídico. Así, se emplearon los cebadores 1851 (inicio MP de TSWV) y 2908 (antisentido CP de AMV) para analizar todas las construcciones correspondientes al cADN3 silvestre de AMV en las que se ha introducido las MPs de TSWV. En el caso de las construcciones correspondientes al cADN 3 de AMV que expresa la GFP, se utilizó la pareja de cebadores 1851 (inicio MP de TSWV) y 2560 (antisentido región TST). Por último, para las construcciones que contienen las MPs GrauTSWV/T120 y GrauTSWV/V130 se usó la pareja de cebadores 1851/571, donde 571 es el anti sentido del final del gen de la MP de AMV, correspondiente al fragmento A44 que se fusiona en todas MPs heterólogas introducidas en AMV (Tabla 2). La mezcla para la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 5µl conteniendo: 1µl Tampón 5X Green GoTaq® Flexi Promega, 0,4µl MgCl₂ 25mM, 0,1µl dNTPs 10mM, 0,5µl de cada cebador (5µM), 0,03µl GoTaq® G2 Flexi ADN polimerasa Promega 5U/µl. Como molde, se introdujo en la mezcla de reacción una punta de pipeta que previamente había tocado en la colonia seleccionada. Las condiciones de reacciones fueron: para la desnaturalización 94°C durante 15 segundos,

para el alineamiento 55°C durante 15 segundos y la extensión se realizó a 72°C a razón de 1 minuto por kilo base durante 25 ciclos.

Nombre del primer	Secuencia del Primer 5'-3'	Sentido	Sitio de unión
571	ACACA <u>AAGCTT</u> CAATGATCAGGTAATATTTTC	Antisentido	Final MP AMV
668	ACGTTA <u>AAGCTT</u> AATACGACTCACTATAGTATTAATACCATTTTC	Sentido	Inicio MP AMV
1602	GCATCCCTTAGGGGCATTCATG	Antisentido	Final MP AMV
1851	CACACATGTTGACTTTTTTCAGC	Sentido	Inicio MP TSWV
1852	CAC <u>GCTAGCT</u> ATTTTCATCAAAAGATAAC	Antisentido	Final MP TSWV
2208	CATCATGAGCAAGGGCGAGGAG	Sentido	Inicio GFP
2560	AAAT <u>CTAGAT</u> CCGGATTTTTCGAACTG	Antisentido	Final TST
2908	TTCTTTTGTGAAGAACTCAT	Antisentido	Ny CP

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en los experimentos. Las secuencias subrayadas representan sitios de corte de enzimas de restricción. 571 y 668 tienen sitio de corte para la enzima *HindIII*, 1852 sitio de corte de *NheI*, 2560 sitio de corte *XbaI*.

3.2.1.8. Purificación de plásmidos recombinantes

Para la purificación de plásmidos bacterianos se utilizó el kit de GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Previamente, las bacterias se crecieron a 37°C durante 18 h en medio líquido de LB con el antibiótico correspondiente, partiendo de 6 ml de cultivo, que se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm para luego resuspender el sedimento (células bacterianas) en 250 µl con el tampón de resuspensión del kit conteniendo RNasa A (0,1 mg/ml) mediante vórtex. Seguidamente, se añadieron 250 µl de solución de lisis celular, procediendo a mezclar suavemente mediante inversión del tubo Eppendorf (5-10 veces) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadieron 350

μl de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm, transfiriendo el sobrenadante resultante a una columna de purificación, que se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. Tras descartar la solución filtrada, se añadieron 500 μl de solución de lavado, se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm y se descartó el filtrado. Tras repetir el proceso de lavado y realizar una centrifugación adicional de 1 minuto a 13000rpm para eliminar los restos de solución de lavado, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf para eluir el ADN purificado. Para ello, se añadieron 50 μl de solución de elución libre de nucleasas a la columna de purificación, se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm. El ADN eluido se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2.1.9. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación, tanto del ADN plasmídico como de ARN total generado en las diferentes extracciones, se usó un *Nanodrop ND-1000 spectrophotometer* con su programa ND-1000 V3.8. La medición de la concentración se hizo con 1 μL de muestra, obteniéndose la concentración en ng/μL.

3.2.1.10. Secuenciación de ácidos nucleicos

La determinación de la secuencia de nucleótidos de las diferentes construcciones generadas en el presente proyecto se realizó por el Servicio de secuenciación del centro IBMCP (CSIC-UPV) utilizando los cebadores correspondientes y método de Sanger.

3.2.2. Inoculación de plantas de *Nicotiana tabaccum* P12 y *Nicotiana benthamiana*

3.2.2.1. Generación de transcritos

Los transcritos correspondientes a los diferentes ARNs virales de AMV, incluidos el ARN 3 y sus diferentes construcciones, se obtuvieron mediante reacciones de transcripción con T7 ARN polymerase (Takara Bio Inc.) en un volumen vinal de 10 μl conteniendo: 1 μl tampón transcripción 10X (Roche Diagnostic GmbH), 1 μl NTPs 10mM, 0,15 μl Inhibidor de RNasas (Ribolock ARNse/Thermo Fisher Scientific 40 U/μl), 0,2 μl T7 ARN polymerase (Takara Bio Inc.; 50 U/μl) y 100-200 ng del molde de ADN. Como molde se utilizó el plásmido conteniendo el cADN viral, previamente linearizado con el enzima de restricción SmaI (cADN1 de AMV) o PstI (cADN2 o cADN3 de AMV). Alternativamente, también se utilizó como molde el producto de PCR generado con los cebadores 668/1601. El cebador directo VP668 contiene el extremo 5' del ARN3 de AMV precedido por la secuencia del promotor

T7, mientras que el cebador antisentido VP1602 es complementario al extremo 3' del ARN3 de AMV. Las condiciones de amplificación fueron un paso previo de desnaturalización a 96°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 10 s de desnaturalización a 96 °C, 5 s de hibridación a 53 °C y 3 min de extensión a 72°C. Las reacciones de transcripción se incubaron a 37°C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se analizó 1 µl de la reacción de generación de transcritos en geles de agarosa al 1% TAE, y tras comprobar la validez de los mismos, se emplearon los 9 µl restantes para inocular plantas directamente mediante un abrasivo (Plantas P12) o tras someterlos a una reacción de capeado (plantas de *N. benthamiana*; apartado 3.2.2.2).

3.2.2.2. Fenolización, precipitación y reacción de capping de los transcritos

Para proceder a la reacción de capeado de los ARNs virales generados *in vitro*, primero se eliminaron los componentes de la reacción de transcripción mediante fenolización y posterior precipitado de los transcritos generados. Para ello, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la reacción de transcripción, se centrifugó a 13000 rpm en frío (4°C) durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante al que se le agregó 1/10 del volumen de acetato sódico (AcNa) 0,3M a pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Tras incubar las muestras a -80°C durante 30 minutos o -20°C durante 2 horas, se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm en frío (4°C), se lavó el precipitado con 1ml de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar 5 minutos a 8000 rpm a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en agua libre de RNasa.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de *capeado* con el fin de añadir la caperuza o nucleótido alterado en el extremo 5' de algunos transcritos primarios de eucariotas, como el precursor de ARN mensajero (ARNm). Este proceso está altamente regulado y es vital en la creación de ARNm estables y maduros, capaces de ser traducidos durante la síntesis de proteínas. Para esta reacción se utilizó ARN (1-10µg) resuspendido en agua libre de RNasa (13,5 µl) y el kit ScriptCap™ Capping CellScript, en un volumen final de 20 µl. Para ello y como paso previo a la reacción de capeado, el ARN viral se desnaturalizó mediante incubación a 65°C durante 5-10 min y enfriamiento rápido en hielo. Posteriormente se añadieron 2 µl tampón 10X, 2 µl GTP 10mM, 1 µl S-adenoyl-methionine (SAM) 2mM, 0,5 µl RNase inhibitor (40 U/µl) y 1 µl ScriptCap™ Capping enzima (10 U/µl). La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora, procediendo directamente a inocular plantas de *N. benthamiana*.

3.2.2.3. Inoculación mecánica de plantas

Para este proceso se utilizó una varilla de vidrio, carborundum (compuesto abrasivo capaz de producir heridas sobre la superficie de la hoja), el inóculo (viriones, transcritos o ambos). Una vez se marcaron las hojas a ser inoculadas, se les espolvoreó carborundum y se le agregó 5µl de inóculo/hoja, siendo esparcido por toda la hoja utilizando la varilla de vidrio. En el caso de plantas P12 se utilizó como inóculo la reacción de transcripción directamente, conteniendo el ARN 3 de AMV o sus diferentes construcciones, a una concentración de 1-3 µg/µl. Para la inoculación de plantas de *Nicotiana benthamiana*, el inóculo consistió en una mezcla de los tres ARNs de AMV (cada ARN a una concentración de 1-3 µg/µl), previamente capeados, junto con viriones extraídos de plantas P12 inoculadas con el correspondiente ARN 3 de AMV.

3.2.3. Detección viral mediante hibridación molecular no radioactiva tipo dot-blot

La detección rápida de tejido infectado se realizó mediante hibridación molecular (Pallas *et al.*, 1998) utilizando una sonda de ARN marcada con digoxigenina y complementaria al gen de la proteína de cubierta de AMV. Para ello, el tejido se trituró a temperatura ambiente con 2-3 volúmenes del tampón citrato sódico (50mM Citrato sódico, 5mM de EDTA a pH 8,5), aplicando 3µl del extracto directamente en una membrana de Nylon cargada positivamente. Tras dejar secar y fijar los ácidos nucleicos mediante un entrecruzador de luz ultravioleta, (Vilberlourmat a 0,180 Jouls) se procedió a bloquear los sitios inespecíficos de unión, incubando las membranas en un horno de hibridación a 68 °C durante 2-3 h con la solución de prehibridación (5 ml/100 cm² de membrana) compuesta de 50 % de formamida desionizada, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM, pH 7,0), N-lauroilsarcosina 0,1 % (p/v), SDS 0,02 % (p/v) y 2 x agente bloqueante (Roche). A continuación, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la de hibridación, con la misma composición que la anterior, pero conteniendo la sonda dig-ARN (20 ng/ml). Las membranas se incubaron en dicha solución a 68 °C durante al menos 8 h. Tras realizar la hibridación, las membranas se lavaron 2 x 5 min a temperatura ambiente con la solución de lavado I (2 x SSC y SDS 0,01 %) y a continuación 2 x 30 min a 68 °C con la solución de lavado II (0,1 x SSC y SDS 0,1 %)

La detección inmunológica se realizó incubando las membranas 2-5 min en el tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween-20, 0,3 % (v/v)) para posteriormente incubar durante 30 min con la solución de bloqueo (agente bloqueante, Roche) diluido 1:10 en ácido maleico 0,1 M y NaCl 0,15 M, pH 7,5. A continuación, se incubaron las membranas durante otros 30 min con una solución anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) diluida 1:10.000 en la solución de bloqueo. Para eliminar el exceso

de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron 2 x 15 min con el tampón de lavado, y posteriormente se equilibraron durante 5 min en el tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM pH 9,5). Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente.

El revelado de las membranas se realizó el substrato quimioluminiscente CSPD (Roche). La solución de substrato fue diluida 1:100 en el tampón de equilibrado, incubando la membrana sin agitación y en oscuridad durante 5 min en 5 ml de solución/100 cm² de membrana. Tras retirar el substrato, las membranas se expusieron con película Kodak X-Omat AR durante aproximadamente 15 min. Adicionalmente, se realizaron exposiciones más largas de 2-3 h. Alternativamente, la señal quimioluminiscente se visualizó mediante el sistema digital LAS 3000 Imaging System From Fuji.

3.2.4. Extracción de ARN total y RT-PCR

En los casos en los que la extracción de ARN se hizo a partir de tejido, se utilizó el protocolo de extracción recomendado para el reactivo Tri Reagent (trizol). 100 mg de tejido se homogeneizó con N₂ líquido en tubo Eppendorf añadiendo 1mL de Tri Reagent. Tras mezclar mediante vórtex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200µl de cloroformo, volviendo a mezclar con vórtex e incubar durante 3-5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, recogiendo la fase acuosa en un nuevo Eppendorf y añadiéndole 1/5 del volumen obtenido de cloroformo. Tras incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, recuperando la fase acuosa a la que se le añadió 1 volumen de isopropanol. Tras incubar 10 minutos en hielo, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido se lavó con 1 ml de EtOH 70 % y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado resultante se dejó secar y se resuspendió en 90 µl de agua, procediendo a realizar una nueva precipitación con EtOH absoluto, tal y como se describe en el apartado 3.2.2. Por último, el sedimento obtenido se resuspendió en 15-20 µl de agua estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La extracción de ARN a partir de virión purificado se realizó mediante tratamiento con SDS y fenolización. La purificación se realizó partiendo de 100 µl de extracto de viriones parcialmente purificados (apartado 3.2.6) a los que se añadió 5 µl SDS 20 % (p/v). Tras realizar dos extracciones fenólicas, se procedió a precipitar la fase acuosa resultante añadiendo 1/10 vol de acetato sódico 3 M pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (apartado 3.2.2). El precipitado resultante se resuspendió en 15-20 µl de agua estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para verificar la estabilidad de las diferentes construcciones del ARN3 de AMV en los diferentes pasos de amplificación (Planta P12 o *N. benthamiana*), los ARNs totales extraídos, tanto de virión como de tejido infectado, se analizaron mediante RT-PCR utilizando la pareja de cebadores 1851/571 (tabla 2) que amplifica todo el casete de la construcción. La reacción de RT-PCR se realizó con el Kit de Invitrogen SuperScript®III One-Step RT-PCR platinum® Tag HiFi (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific), en un volumen final de 10 µl conteniendo: 5 µl del tampón 2X, 1 µl de la mezcla de cebadores (5 µM cada cebador), 0,15 µl Inhibidor RNAsas (40U/µl), 0,1 µl de SSIII RT/Platinum® Tag HiFi enzyme Mix (2,5 U/µl) y 0,3 µl del ARN extraído. Las reacciones se incubaron en un primer paso de RT a 50 °C durante 30 minutos, luego para la desnaturalización 10 segundos a 94°C, el alineamiento 15 segundos a 55 °C y la extensión a 68 °C a razón de un minuto por kilo base durante 40 ciclos. Los amplicones resultantes se analizaron en geles de agarosa/TAE al 1% (apartado 3.2.1.3). Alternativamente, los fragmentos de ADN obtenidos se extrajeron de gel de agarosa (apartado 3.2.1.4) y se utilizaron directamente para determinar la secuencia de ácidos nucleicos, utilizando los cebadores 1851 y/o 571.

3.2.5. Visualización y cuantificación de focos de infección en hojas inoculadas

La utilización de la variante del ARN 3 de AMV que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP), permitió visualizar los focos de infección en tejido infectado. La detección de la GFP se realizó a 2 dpi utilizando una lupa Leica MZ 16F, excitando 488nm y registrando la emisión de fluorescencia en el espectro 510-560 nm. La determinación del diámetro de los focos de infección se realizó con el programa Image J (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij>) utilizando un total de 60 focos por construcción.

3.2.6. Purificación de viriones a partir de plantas infectadas

La purificación de partículas virales se realizó a partir de 0,5 gramos de tejido infectado, tanto hojas inoculadas como sistémicas, de *N. benthamiana* y/o *N. tabacum* P12 a 7 dpi. El tejido se trituró en mortero a temperatura ambiente con 2 volúmenes de tampón de extracción TE (K₂HPO₄ 100 mM, ácido ascórbico 100 mM, EDTA 20 mM, pH 7,1). El extracto generado se transfirió a un tubo Eppendorf y se mezcló con 0,5 ml de una mezcla de cloroformo:butanol 1:1 (v/v) mediante vórtex, durante un minuto. El homogenado se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y al sobrenadante se le añadió 1/5 del volumen de polietilenglicol 20.000 al 30 %. Tras mezclar suavemente mediante varias inversiones e incubar 15 minutos en hielo, se centrifugó a 6500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió con 200 µl de tampón PEN (tampón fosfato

10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 6500 rpm durante 5 min, el sobrenadante enriquecido en partículas virales se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.2.7. Ensayo de BiFC

Las colonias de *A. tumefaciens* C58 previamente seleccionadas se pusieron a crecer en LB con kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (25µg/ml) a 28 °C por 24 h, el cultivo de bacterias se resuspendió en tampón de infiltración (MgCl₂ 10 mM, 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES) 10mM, pH 5,6). La infiltración se realizó utilizando una suspensión de bacterias con una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,4 y 0,2 para BiFC y análisis de localización subcelular, respectivamente. En todos los casos, los cultivos se infiltraron en plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad.

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Zeiss LSM 780. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 488 y 508 nm para la GFP, 514 y 527 nm para YFP y 405 y 460-535 nm para el azul de anilina, respectivamente.

3.2.7.1. Detección de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)-SDS

El análisis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970). A las diferentes muestras proteicas, obtenidas a partir de tejido agroinfiltrado, se les añadió 1 vol de tampón Laemmli 1 x (Laemmli 1 x: glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5 %, SDS 2 %, Tris-HCl 2 M pH 6,8, DTT 0,1 %) y se desnaturizaron a 100 °C durante 10 min. Las electroforesis se realizaron en geles discontinuos compuestos de un gel concentrador (375 µl de acrilamida al 40 %, 380 µl de Tris-HCl 2 M pH 6,8, 15 µl SDS 10 %, 2,2 ml de agua) que se polimerizó con 30 µl de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 3 µl de Temed (Sigma) y un gel separador (3 ml de acrilamida al 40 %, 2,5 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,8, 50 µl SDS 10 %, 4,4 ml de agua) al que se le adicionaron para la polimerización 100 µl de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 10 µl de Temed (Sigma). Las electroforesis se realizaron en tampón TGS 1 x (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3, SDS 0,1 %) a 100 V durante 1 h.

3.2.7.2. Análisis tipo Western blot

Las proteínas, previamente separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Immuno-Lite, Laboratorios BioRad, Richmond, CA, USA)

durante 1 h a 100 V, en tampón de transferencia TGM (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v)). La inmunodetección de los diferentes epítomos se realizó bloqueando, en primer lugar, los sitios inespecíficos de unión con un lavado de 1 h en TBS + Teewn20 (NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,2) con seroalbúmina bovina (BSA) al 5 %. El anticuerpo primario fue diluido 1:1500 para el Nt de la GFP (Sigma, producido en conejo) y 1:10000 para el Ct de la GFP (Sigma, producido en ratón), en TBS + Teewn20 con BSA al 2,5 %. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, para estos experimentos se dejó el anticuerpo primario incubando toda la noche a 4°C, las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBS + Teewn20 y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo o anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:10.00 en TBS + Teewn20 con BSA al 2,5 %. Para el revelado de la membrana, después de repetir los lavados de 10 min cada uno en TBS + Teewn20, se añadió el substrato quimioluminiscente AMPPD (Amersham™) diluido 1:100 en el tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM pH 9,5). La membrana se incubó sin agitación y en oscuridad durante 5 min en 5 ml de solución/100 cm² de membrana. Después de retirar el substrato, la membrana se incubó a 37 °C durante 15 min y posteriormente se expuso una película Kodak X-Omat AR durante 30-120 min.

3.2.8. Inmunoprecipitación de complejos MP-proteínas del huésped mediante cromatografía de afinidad

3.2.8.1. *Extracción de proteínas en condiciones nativas*

Para la extracción de proteínas en condiciones nativas se utilizaron 15 g de tejido infectado a 11 dpi, tal y como se explica en el apartado 3.2.2. El tejido se homogeneizó con nitrógeno líquido utilizando 3 volúmenes de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1%), complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Roche). Tras filtrar el extracto a través de dos capas de tela de Miracloth, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 95.000 g durante 45 min a 4 °C. El sobrenadante generado se sometió directamente a purificación en columnas anti-TST.

3.2.8.2. *Purificación mediante columna anti-TST*

La purificación de las proteínas marcadas con la etiqueta TST (Twin-Strep-tag; WSH₂PQFEKGGGSGGGSSGSAWSHPQFEK)(Schmidt *et al.* 2013) se realizó mediante una columna 1-ml Strep-Tactin Superflow column (IBA), con un sistema de cromatografía líquida ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare), que opera a 4 °C con un flujo de ratio 1 ml/min. Tras

equilibrar la columna con 10 ml de tampón de extracción (apartado 3.2.8.1) se aplicaron los extractos de proteína obtenidos en el apartado 3.2.8.1. Tras lavar la columna con 20 ml de tampón de extracción se procedió a eluir las proteínas retenidas mediante la aplicación de 20 ml de tampón de extracción conteniendo D-destiobiotina 10 mM. Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante Western blot utilizando un anticuerpo antiTST (Strep MAB-Classic-HRP mab anti Step-Tag (IBA)) en una dilución 1:10000 conjugado con fosfatasa alcalina.

3.2.8.3. Detección de proteínas en gel PAGE-SDS

El análisis de proteínas se realizó como se indica en el apartado 3.2.7.1. A diferencia de este, a las diferentes muestras proteicas, se les añadió 1 vol de tampón Laemmli 2 x (Laemmli 1 x: glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, SDS 2 %, Tris-HCl 2 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01 %, DTT 0,1%).

4. Resultados y discusión

La inexistencia de clones infecciosos para *Tospovirus* está condicionando el estudio de este género viral mediante aproximaciones de genética reversa. Parte de estas limitaciones se pueden obviar mediante sistemas heterólogos que permiten caracterizar algunas de las propiedades de los diferentes componentes moleculares del virus. Sin embargo, el análisis funcional de proteínas virales en sistemas heterólogos suele ser una excepción por la incompatibilidad del propio sistema. En el caso de las proteínas de movimiento y en especial las pertenecientes a la familia 30K (Melcher, 2000), se ha comprobado al menos para miembros de 9 géneros virales, que son funcionalmente intercambiables por la MP del *virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), para el transporte local y sistémico cuando se les fusiona los últimos 44 amino ácidos (aa) del extremo C-terminal de la MP del AMV, indicando que una o más propiedades básicas de las MPs tienen que estar asociadas con las estructuras secundarias/terciarias conservadas (Fajardo *et al.*, 2013, Sanchez-Navarro and Bol, 2001, Sanchez-Navarro *et al.*, 2006, Sanchez-Navarro *et al.*, 2010). Las proteínas de movimiento del género *Tospovirus*, incluidas dentro de la familia 30K, son funcionalmente intercambiables por la MP de AMV (Peiró *et al.*, 2014; Leastro *et al.*, 2017), lo que posibilita su análisis funcional en un contexto de replicación viral. En el presente trabajo final de Máster se ha abordado la obtención de clones híbridos de la proteína de movimiento de TSWV (NS_M) en el sistema AMV para el estudio y caracterización de factores celulares implicados en su funcionalidad, utilizando el sistema de purificación por columna de proteínas con la etiqueta TST (Schmidt *et al.* 2013). Este nuevo abordaje permitirá caracterizar factores celulares que interaccionen directa o indirectamente (complejos celulares) con las proteínas de movimiento, en un contexto de infección viral y obviando los problemas inherentes al uso de proteínas de membrana o con carácter hidrofóbico, mediante las aproximaciones clásicas (e.j. sistema de doble híbrido, etc).

4.1. Obtención de clones híbridos de TSWV en el sistema AMV

Con el fin de insertar la MP de diferentes aislados de TSWV en el sistema AMV, el primer paso fue amplificar, mediante PCR, las diferentes MPs con los sitios de corte adecuados (*Pst*I y *Nhe*I), utilizando los cebadores 1851 y 1852, así como los moldes disponibles en el laboratorio (Peiró *et al.*, 2014) (Figura 9).

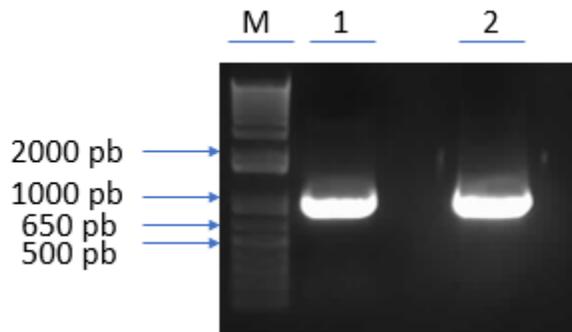


Figura 9. Productos de PCR correspondientes a las MPs de TSWV de los aislados Gr1NL2 (1) y Grau (2), obtenidos con los cebadores 1851 y 1852. En cada carril se analizaron 2 μ del total de 25 μ de reacción. M, marcador 1Kb ADN ladder plus.

El segundo paso fue la digestión de los plásmidos con las diferentes construcciones del ARN 3 de AMV, utilizados en el análisis de las MPs de TSWV. En el presente proyecto se han utilizado 3 variantes del ARN 3 que tienen insertado la MP del TMV para poder ser intercambiada: la primera contiene un 5' no traducible evolucionado para un mejor transporte intercelular del virus así como la etiqueta TST precediendo los 44 amino ácidos C terminales de la MP de AMV (pUC18 5'ev/TMV:TST:A44/CP). Esta construcción se utilizará para la caracterización de factores celulares que interaccionan con las diferentes MPs de TSWV mediante el uso de columnas de afinidad específicas de la etiqueta TST. La segunda construcción es idéntica a la variante utilizada para la purificación de proteínas pero sin la etiqueta TST (pUC18 5'ev/TMV:A44/CP), utilizada como control negativo. La tercera construcción es una variante de la ARN 3 de AMV que lleva la etiqueta TST pero que incorpora la proteína fluorescente verde GFP (pUC18 GFP/TMV:TST:A44/CP) y que permite visualizar y cuantificar el transporte célula a célula. La digestión de los diferentes plásmidos se realizó con las enzimas de restricción *NcoI* y *NheI*, que permiten la liberación del gen correspondiente a la MP de TMV. La purificación del vector plasmídico correspondiente a las diferentes variantes del ARN 3 de AMV sin el gen de la MP de TMV, se realizó a partir de geles de agarosa (Figura 10).

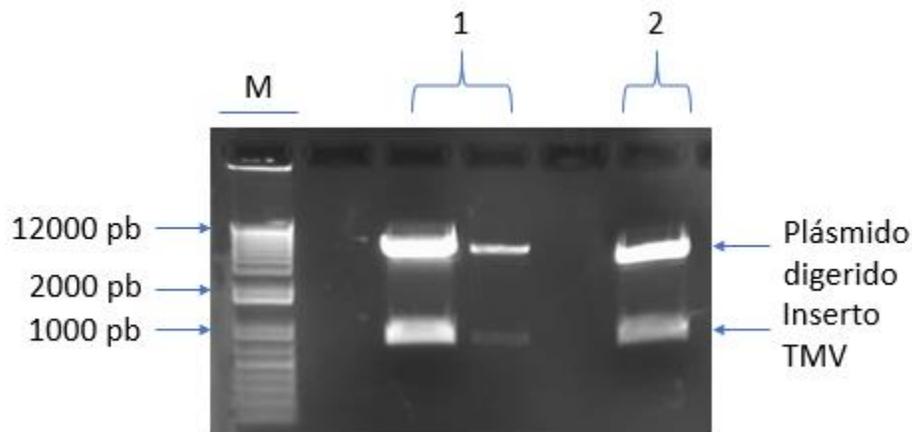


Figura 10. Purificación de vectores plasmídicos utilizados para insertar las MPs de TSWV. Las plásmidos pUC18 5'ev/TMV:TST:A44/CP (1) y pUC18 5'ev/TMV:A44/CP (2), previamente digeridos con los enzimas de restricción *NcoI/NheI*, se extrajeron a partir de gel de agarosa/TAE al 1%, utilizando los 25 μ l de la reacción de digestión. La banda purificada (plásmido digerido) corresponde a la construcción del ADNc 3 de AMV sin la MP de TMV (inserto TMV). M, marcador de peso molecular 1Kb ADN ladder plus.

El tercer paso fue la ligación entre los vectores plasmídicos, conteniendo las diferentes construcciones del ARN 3 de AMV, y las MPs de TSWV, previamente digeridos con *NcoI/NheI* y *PstI/NheI*, respectivamente. Como paso previo a la reacción de ligación, se analizaron en gel de agarosa tanto los vectores plasmídicos como los insertos extraídos de gel, para estimar su concentración y ajustar las cantidades en las reacciones de ligación (Figura 11). Tras la reacción de ligación, se transformaron células DH5 α de *E. coli* y se plaquearon en medio LB suplementado con ampicilina. Tras incubar las placas durante 14 horas a 37°C, se seleccionaron las bacterias recombinantes mediante análisis tipo PCR directamente de colonia, utilizando para ello los cebadores 1851 y 2908 (Figura 12).

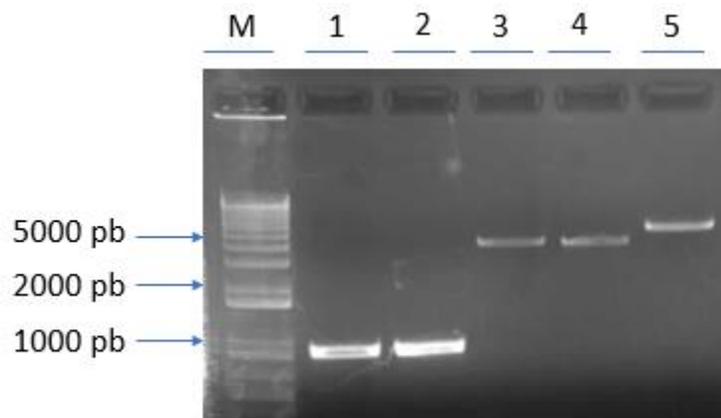


Figura 11. Análisis en gel de agarosa/TAE al 1 % de los insertos Grau (1), Gr1NL2 (2) y vectores plasmídicos extraídos de gel y utilizados en las diferentes reacciones de ligación pUC18 5'ev/TMV:TST:A44/CP (3), pUC18 5'ev/TMV:A44/CP (4), pUC18 GFP/TMV:TST:A44/CP (5). M, marcador 1 Kb ADN Ladder plus. En cada carril se analizaron 2 μ l del total de 20 μ l extraídos de gel.

Por último, se realizó una purificación de plásmidos recombinantes de las bacterias seleccionadas mediante el análisis PCR de colonia. Los plásmidos obtenidos de la purificación fueron cuantificados y se mandaron a secuenciar para descartar cualquier error durante el proceso de clonación.

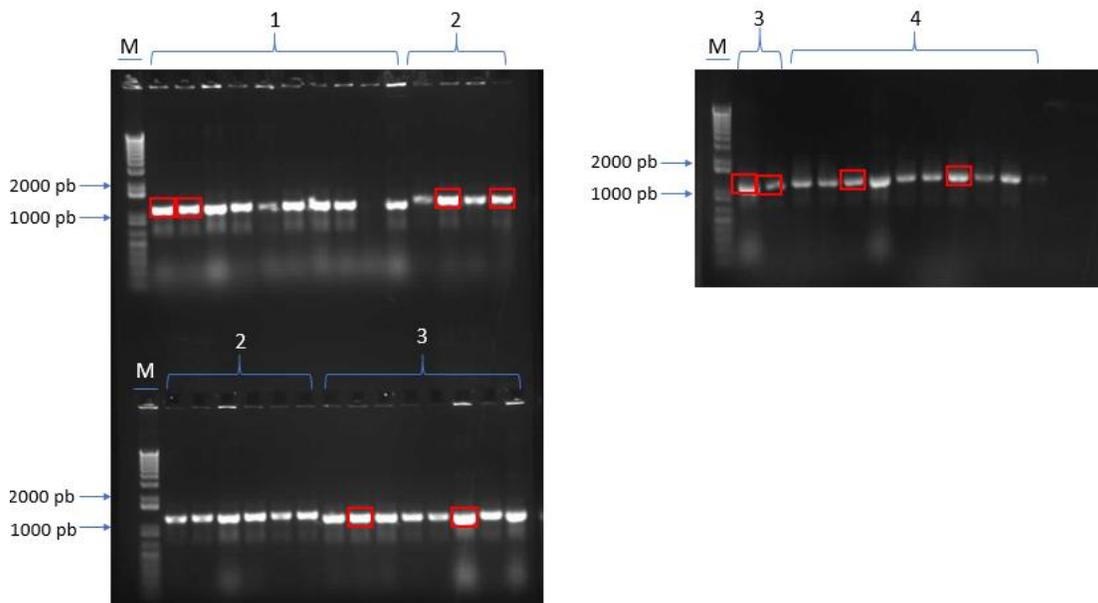


Figura 12. Análisis en geles de agarosa/TAE al 1 % de los productos de amplificación generados durante el análisis de PCR de colonias con los cebadores 1851 y 2908. En color rojo se marcan los productos de PCR de las colonias seleccionadas para hacer purificación

de plásmidos y secuenciación. M, marcador 1 Kb ADN Ladder plus, (1) producto de PCR de las colonias con plásmido pUC18 5'ev/Gr1NL2:A44/CP, (2) pUC18 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, (3) pUC18 5'ev/Grau:A44/CP, (4) pUC18 5'ev/Grau:TST:A44/CP. En cada carril se analizaron los 5 µl de la reacción de PCR.

4.2.Verificación de infectividad de los clones con etiqueta TST

Una vez obtenidos los plásmidos con las construcciones correspondientes se realizó una reacción de PCR para amplificar el ADNc 3 de AMV junto con el promotor de la T7 ARN polimerasa, utilizando los cebadores 668/1602 (Figura 13). El producto de PCR se utilizó directamente en la reacción de transcripción, sin necesidad de realizar pasos adicionales de purificación.

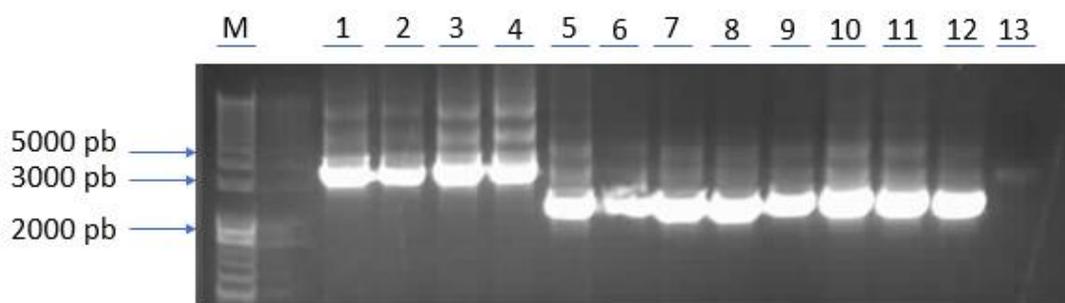


Figura 13. Análisis de los productos de PCR obtenidos con los cebadores 668/1602 y correspondientes a las diferentes variantes del ADNc 3 de AMV junto con el promotor T7 de la ARN polimerasa. M, Marcador 1Kb ADN ladder plus. Cada carril contiene 2µl de los 10µl de la reacción de PCR. (1) GFP/GrauTSWV/V130:TST:A44/CP, (2) GFP/GrauTSWV/T120:TST:A44/CP, (3) GFP/Grau:TST:A44/CP, (4) GFP/Gr1NL2:TST:A44/CP, (5) 5'ev/GrauTSWV/T120:A44/CP, (6) 5'ev/GrauTSWV/V130:A44/CP, (7) 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, (8) 5'ev/Grau:A44/CP, (9) 5'ev/GrauTSWV/V130:TST:A44/CP, (10) 5'ev/GrauTSWV/T120:TST:A44/CP, (11) 5'ev/Grau:TST:A44/CP, (12) 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, (13) Control negativo PCR.

Como paso previo a la purificación de factores celulares que interaccionan con la proteína de movimiento del *virus del bronceado del tomate* mediante columnas de afinidad a la etiqueta TST, procedimos a analizar la influencia de la etiqueta en la funcionalidad de la proteína de movimiento. Para ello, utilizamos las construcciones del ARN 3 de AMV que expresan la GFP y permiten visualizar y cuantificar el transporte a corta distancia. Los transcritos obtenidos a partir de los moldes generados por PCR (Figura 14) se inocularon directamente en plantas P12, las cuales expresan de manera constitutiva el complejo

replicativo del virus, analizando los focos de infección a partir de segundo día post inoculación (dpi).

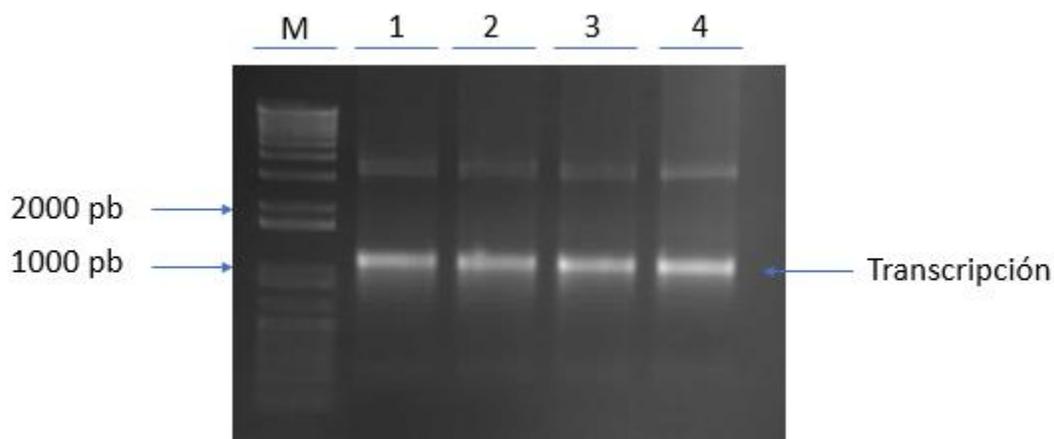


Figura 14. Análisis en gel de agarosa/TAE al 1 % de los transcritos obtenidos a partir de la construcciones GFP/GrauTSWV/V130:TST:A44/CP (1), GFP/GrauTSWV/T120:TST:A44/CP (2), GFP/GRAU:TST:A44/CP (3) y GFP/Gr1NL2:TST:A44/CP (4). M, Marcador 1Kb ADN ladder plus. En cada carril se analizaron 2 μ l de los 10 μ l de la reacción de transcripción.

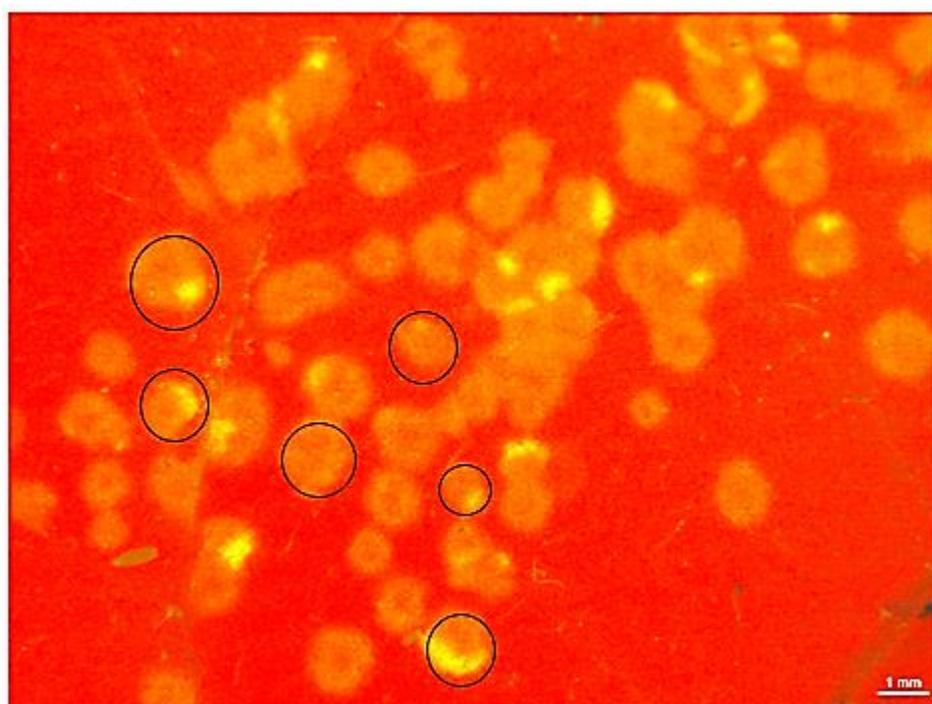


Figura 15. Detalle de una hoja vista en lupa con luz ultravioleta con filtro para la GFP. En color amarillo se pueden apreciar los focos de infección del virus. Los círculos negros indican la posición de parte de los focos de infección utilizados para cuantificar el diámetro.

La detección de la señal derivada de la GFP en las hojas inoculadas puso de manifiesto que todas las construcciones ensayadas generaban focos de infección claramente visibles a 2 dpi (Figura 15). Para cuantificar el funcionamiento de las diferentes proteínas de movimiento, se determinó el diámetro de 60 focos de infección (Gráfico 1). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la proteína movimiento que generó mayores focos de infección correspondió a la del aislado GrauTSWV/T120, seguida de Gr1NL2, Grau y GrauTSWV/V130. Resultados similares se obtuvieron con las variantes correspondientes sin la etiqueta TST (Peiró *et al.*, 2014), indicando que la presencia de la etiqueta TST no alteraba la funcionalidad de la proteína de movimiento.

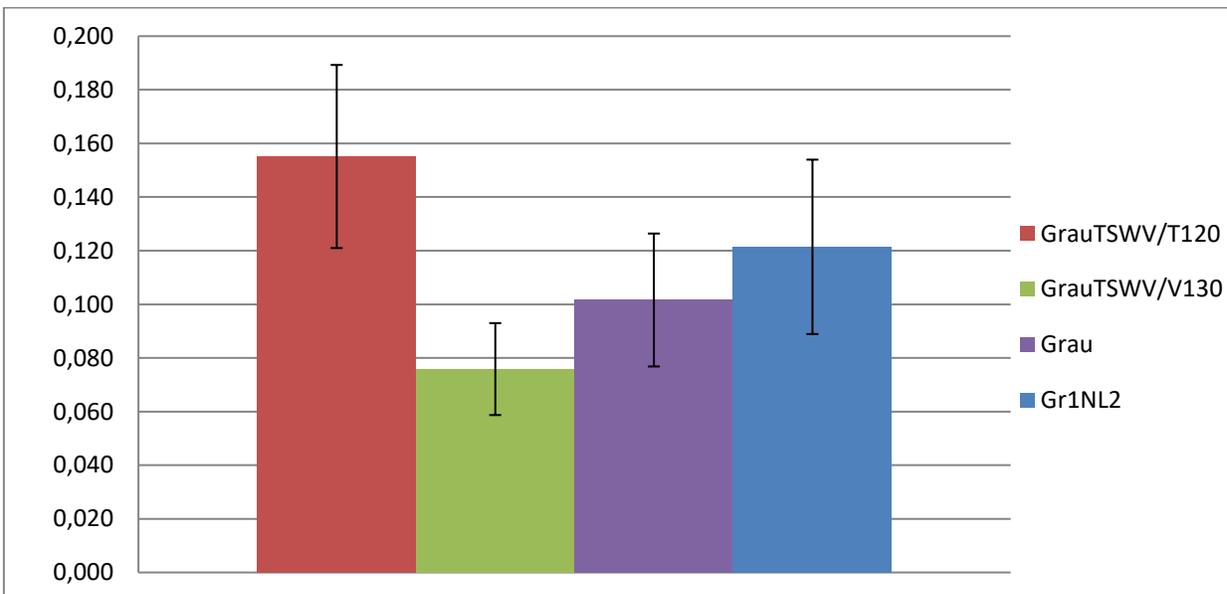


Gráfico 1. Representación de la media aritmética del perímetro de 60 focos de infección observados en Plantas P12 a 2 dpi. Barra de error corresponde a la desviación estándar.

Los aislados Grau y Gr1NL2 son variantes naturales del TSWV que difieren en su capacidad de superar (Grau) o no (Gr1NL2) la resistencia mediada por gen *Sw-5b*, donde la proteína de movimiento es el determinante de avirulencia (Peiró *et al.*, 2014). La proteína de movimiento de Grau difiere en dos aminoácidos con respecto a la del aislado Gr1NL2, en las posiciones 120 y 130. La mutación en el aminoácido 130 es la responsable de que Grau sea capaz de superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b* (Peiró *et al.*, 2014). Sin embargo y como se observa en el gráfico 1, este cambio (TSWV/V130) afecta a la funcionalidad de la proteína al reducir significativamente el transporte viral, requiriendo de un segundo cambio en el aminoácido 120 (GrauTSWV/T120) para compensar la deficiencia asociada al residuo 120. Estos dos cambios permiten que Grau tenga una capacidad

infectiva casi tan eficiente como su homólogo silvestre Gr1NL2, al menos en el transporte célula a célula.

Estos resultados nos indican que la inclusión de la etiqueta TST no altera la funcionalidad de la proteína de movimiento y que los aislados son capaces de reproducir la capacidad infectiva esperada en las variantes naturales como se observa en el gráfico 1.

4.3. Obtención de viriones de AMV

AMV e Ilarvirus requieren de unas pocas moléculas de proteína de cubierta (CP) o en su defecto del ARN 4 para ser infecciosos. Este fenómeno, denominado 'activación genómica', fue descrito por primera vez para el AMV (Bol *et al.*, 1971) y está relacionado con la capacidad de la CP de unirse al extremo 3' no traducible de los ARNs virales y de inducir la expresión de las diferentes proteínas (Bol, 2005). En ese sentido y una vez verificada la funcionalidad de las diferentes MPs de TSWV con la etiqueta TST, se procedió a la obtención de los viriones como fuente de CP, para inocular plantas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello se realizó una transcripción de todas las construcciones con y sin TST y carentes del gen de la GFP (Figura 16) que se inocularon directamente en plantas P12.

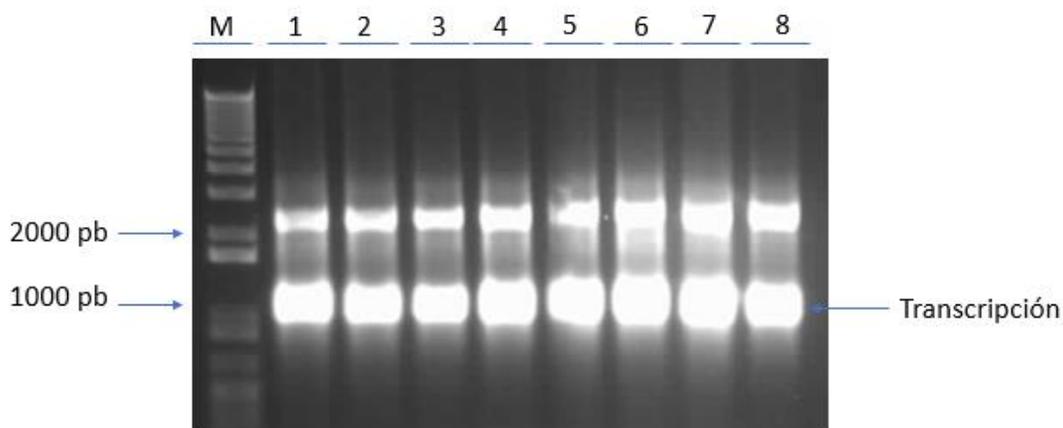


Figura 16. Análisis en gel de agarosa/TAE al 1 % de los transcritos obtenidos a partir de las construcciones 5'ev/GrauTSWV/T120:A44/CP (1), 5'ev/GrauTSWV/V130:A44/CP (2), 5'ev/Gr1NL2:A44/CP (3), 5'ev/Grau:A44/CP (4), 5'ev/GrauTSWV/V130:TST:A44/CP (5), 5'ev/GrauTSWV/T120:TST:A44/CP (6), 5'ev/Grau:TST:A44/CP (7) y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP (8). En cada carril se analizó 1 μ l de los 10 μ l de la reacción de transcripción. M, Marcador 1Kb ADN ladder plus. La banda correspondiente al transcrito del ARN 3 de AMV está indicada.

A los 7 dpi se realizó la purificación de viriones a partir de plantas P12, los cuales contienen encapsidado solo moléculas de los ARN 3 y 4 de AMV. La fracción enriquecida de partículas virales se analizó en geles de agarosa/TAE al 1%, observando la banda esperada en todas las construcciones ensayadas, aunque con diferente intensidad. La presencia de las moléculas de ARN 3 y 4 en las fracciones purificadas de viriones se confirmó mediante análisis tipo dot-blot utilizando una sonda marcada con digoxigenina y complementaria al gen de la CP (Figura 17). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la presencia de los ARNs virales en todas las fracciones obtenidas de viriones, aunque con diferente intensidad, indicando una mayor o menor acumulación de partículas virales.

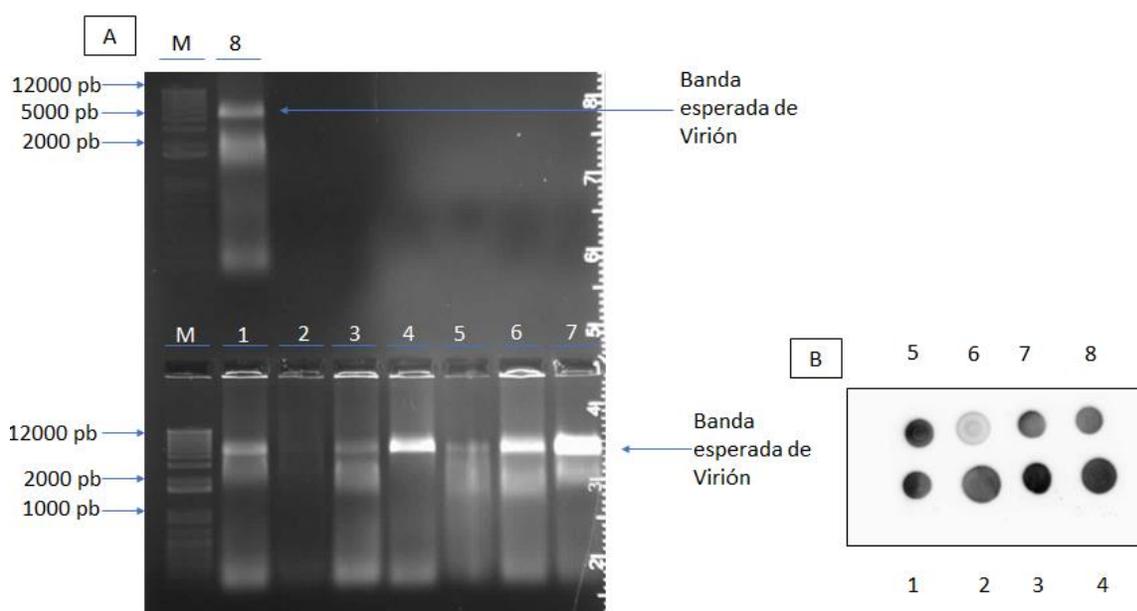


Figura 17. Análisis de las partículas virales purificadas a partir de plantas P12 inoculadas con las construcciones 5'ev/GrauTSWV/T120:A44/CP (1), 5'ev/GrauTSWV/V130:A44/CP (2), 5'ev/Gr1NL2:A44/CP (3), 5'ev/Grau:A44/CP (4), 5'ev/GrauTSWV/V130:TST:A44/CP (5), 5'ev/GrauTSWV/T120:TST:A44/CP (6), 5'ev/Grau:TST:A44/CP (7) y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP (8). (A) Análisis de 10µl de los 100 µl obtenidos de la fracción de viriones en Gel de agarosa/TAE al 1 %. (B) Análisis tipo dot-blot utilizando una sonda marcada con digoxigenina y complementaria al gen de la CP. En cada muestra se aplicó 3µl de la fracción purificada. M, Marcador 1Kb ADN ladder plus. La banda correspondiente al virión de AMV está indicada.

Una vez obtenidos los diferentes viriones a partir de plantas P12, se procedió a sintetizar los transcritos correspondientes al ARN 1 y 2 de AMV, así como de las diferentes construcciones del ARN 3 de AMV. Después de la transcripción, los transcritos obtenidos se fenolizaron y precipitaron para poder someterlos a la reacción de capeado, la cual se realizó

en un volumen final de 20 μ l, conteniendo varios microgramos de los tres ARN virales por construcción. Tras finalizar la reacción de capeado, se añadió a la mezcla de reacción 5 μ l de la fracción correspondiente de viriones purificados, procediendo a inocular directamente sobre plantas de *N. benthamiana*. A los 7 dpi se realizó la extracción de viriones, los cuales contienen todos los ARNs virales encapsidados, pudiéndose utilizar directamente como fuente de inóculo en experimentos posteriores. Sin embargo, de todas las construcciones ensayadas solo se obtuvieron virones purificados para ambos componentes de cada construcción (con o sin la etiqueta TST) para la variante Gr1NL2, utilizándola en el estudio posterior de purificación de factores celulares que interaccionan con al MP viral.

La fracción enriquecida de viriones obtenida de plantas de *Nicotiana benthamiana* y correspondiente a las construcciones 5'ev/Gr1NL2:A44/CP y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, se utilizó para inocular directamente 12 plantas de *N. benthamiana* por construcción, con el objetivo de obtener la cantidad de tejido infectado (15 gramos) requerido para abordar el experimento de purificación de proteínas etiquetadas por columnas de afinidad. Como paso previo y tras triturar los 15 gramos de tejido infectado con nitrógeno líquido, se realizó una extracción de ARN total (Tri-Reagent) a partir de 0,1 gramos de tejido, para confirmar tanto por RT-PCR como por secuenciación, la presencia de las diferentes MPs virales. Para ello, las reacciones de RT-PCR se realizaron con los cebadores 1851 y 2908, que permiten la amplificación del gen completo de la MP de TSWV junto con la región que codifica los 44 aminoácidos del extremo C-terminal de la MP de AMV. Los resultados obtenidos tanto por RT-PCR (Figura 18) como por secuenciación, pusieron de manifiesto que los genes correspondientes a las diferentes MPs no habían sido alterados en los diferentes pasos de infección en plantas P12 y/o *N. benthamiana*.

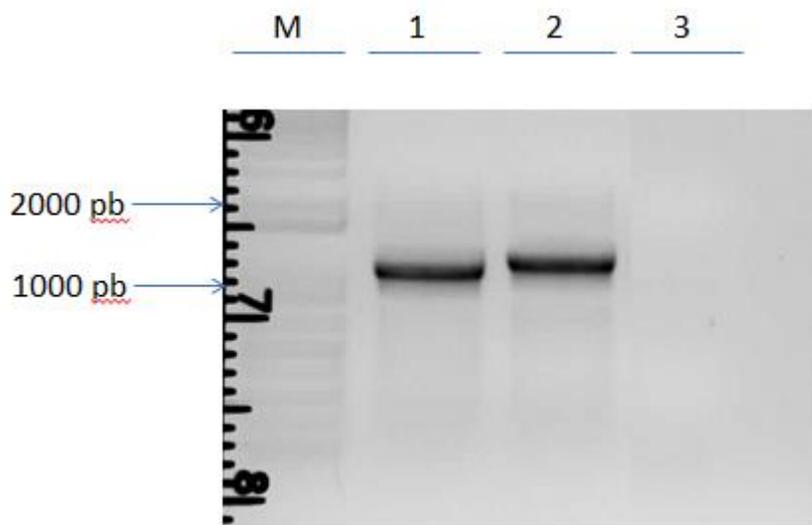


Figura 18. Análisis en gel de agarosa/TAE al 1 % de los productos de RT-PCR obtenidos con los cebadores 1851 y 2908 a partir de ARN total extraído de *N. benthamiana* inoculada con tampón (3) o inoculadas con las construcciones 5'ev/Gr1NL2:A44/CP (1) y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP (2). M, Marcador 1Kb ADN ladder plus.

4.4. Purificación de complejos MP-proteínas del huésped

Para purificar complejos específicos formados entre la MPs virales y proteínas del virus o del huésped, se utilizaron columnas de afinidad contra la etiqueta TST introducida en la MP viral. Extractos de proteínas totales correspondientes a los 15 gramos de tejido infectado con las construcciones 5'ev/Gr1NL2:A44/CP y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, se purificaron por columna tal y como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos (3.2.8). Como resultado se obtuvieron 20 eluidos de 0,5 ml por construcción, de los cuales se analizaron los 9 primeros por western-blot, utilizando un anticuerpo específico de la etiqueta TST (Figura 19). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los eluidos 4, 5, 6, 7, 8 y 9, procedentes del tejido infectado con la construcción 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP, contenían la MP viral con la etiqueta TST, no observándose señal en los eluidos obtenidos con el tejido infectado con la construcción sin la etiqueta TST (5'ev/Gr1NL2:A44/CP). Los eluidos 5, 6, 7 y 8 de ambas purificaciones, se han enviado a la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia para identificar las proteínas presentes mediante LC-MS/MS (AR, GM). Previo al envío de las muestras, se determinó la concentración proteica total en las dos muestras resultantes de mezclar los 4 eluidos, mediante nanodrop y Bradford (Bradford, 1976) estimándose una concentración de entre 0,5-0,8 mg/ml.

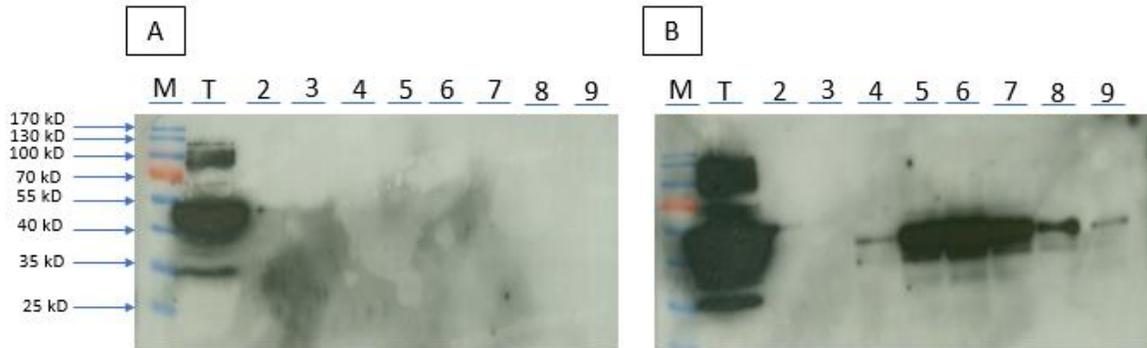


Figura 19. Análisis Western Blot de los eluidos obtenidos con columnas anti-TST a partir de tejido infectado con las construcciones 5'ev/Gr1NL2:A44/CP (A) y 5'ev/Gr1NL2:TST:A44/CP (B). Para el análisis se utilizó un anticuerpo Anti-TST conjugado con fosfatasa alcalina. Los números indican el eluido de 0,5 ml correspondiente del que se ha analizado 15 μ l.

La identificación de proteínas específicas de la fracción eluída con la MP de TSWV conteniendo la etiqueta TST, serán potenciales factores celulares involucrados en la interacción directa o indirecta, con la proteína viral, abriendo interesantes líneas de investigación para el género *Tospovirus* y/o la familia 30k. Los resultados obtenidos hasta la fecha mediante el sistema de dos híbridos y utilizando la MP de TSWV completa (Soellick *et al.*, 2000) o con los 62 residuos de amino ácidos del extremo C-terminal eliminados (von Bargen *et al.*, 2001) han permitido caracterizar la interacción con una proteína chaperona (ADNj-like) y con un componente del citoesqueleto (At-4/1), respectivamente.

4.5. Análisis de la posible interacción de la MP de TSWV con la proteína Hsp70 mediante la técnica de Fluorescencia por Complementación Bimolecular (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)

La Hsp70 (GenBank NP_001312527.1) es una proteína chaperona que en otros estudios realizados en el laboratorio con diferentes MPs y similar abordaje al utilizando con la MP de TSWV, había salido como posible candidata para interactuar con MPs de la familia 30K. Por este motivo, en el presente trabajo decidimos abordar la posible interacción de Hsp70 con la MP de TSWV mediante BiFC. Como paso previo al análisis tipo BiFC, determinamos la localización subcelular de ambas proteínas mediante la fusión de la GFP tanto en el extremo N- como C- terminal. Los resultados pusieron de manifiesto que la localización celular de la Hsp70 es citoplasmática-nuclear cuando lleva la GFP en el extremo N-terminal y en estructuras en la periferia de la pared celular, cuando la lleva en el extremo C-terminal (Figura 20). La tinción con azul de anilina confirmó que las estructuras de la periferia correspondían con plasmodesmos. En el caso de la MP de TSWV, los datos

publicados en la bibliografía indican que la MP se encuentra asociada a plasmodesmos cuando es fusionada con la GFP delante y detrás (Leastro *et al.* 2015).

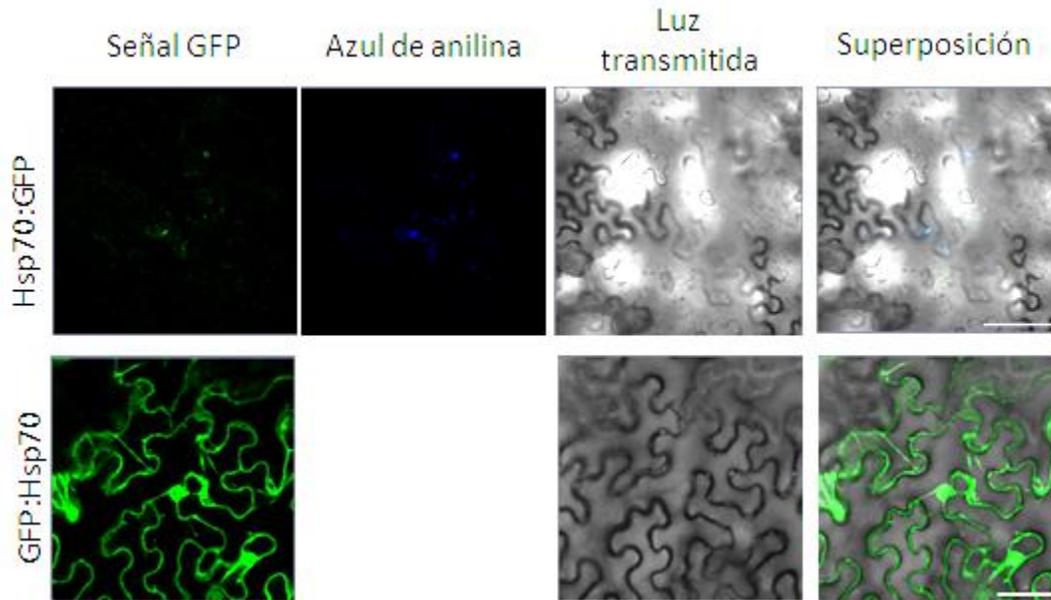


Figura 20. Localización subcelular de la proteína Hsp70 mediante microscopía confocal. Imágenes corresponden a la localización de la Hsp70 con la GFP fusionada en el extremo N-terminal (GFP:Hsp70) o C-terminal (Hsp70:GFP). En azul se visualizan los plasmodesmos marcados con azul de anilina. La línea blanca equivale a 100 µm (Hsp70:GFP) y 50 µm (GFP:Hsp70).

Para el estudio tipo BiFC de la interacción entre la MP de TSWV y la Hsp70 se utilizaron todas las combinaciones posibles con los dos fragmentos N^{YFP} y C^{YFP} terminales de la EYFP fusionados tanto al extremo N-terminal como C-terminal de ambas proteínas. Los resultados obtenidos (Tabla 3) pusieron de manifiesto que todas las combinaciones ensayadas generaron restitución de la fluorescencia, con mayor intensidad en las combinaciones en donde ambos fragmentos de la proteína fluorescente estaban fusionados a los extremos C-terminales de ambas proteínas. No se observó señal fluorescente en ninguno de los dos controles negativos ensayados (Figura 21). La expresión de las correspondientes proteínas se confirmó mediante análisis tipo Western-blot utilizando anticuerpos específicos de los fragmentos N^{YFP} y C^{YFP} terminales de la EYFP (Figura 22).

Tabla 3. Listado de las combinaciones analizadas en el ensayo de BiFC para la interacción entre la proteína de movimiento de TSWV y la proteína Hsp70.

Combinación	Intensidad de interacción
TSWV:C^{YFP} + N^{YFP}:Hsp70	++
TSWV:C^{YFP} + N^{YFP}	-
TSWV:N^{YFP} + C^{YFP}:Hsp70	+
C^{YFP}:Hsp70 + N^{YFP}	-
TSWV:C^{YFP} + Hsp70:N^{YFP}	+++
TSWV:N^{YFP} + Hsp70:C^{YFP}	++
C^{YFP}:TSWV + Hsp70:N^{YFP}	+
C^{YFP}:TSWV + N^{YFP}:Hsp70	+
C^{YFP}:TSWV + N^{YFP}	-
N^{YFP}:TSWV + Hsp70:C^{YFP}	+
N^{YFP}:TSWV + C^{YFP}:Hsp70	+

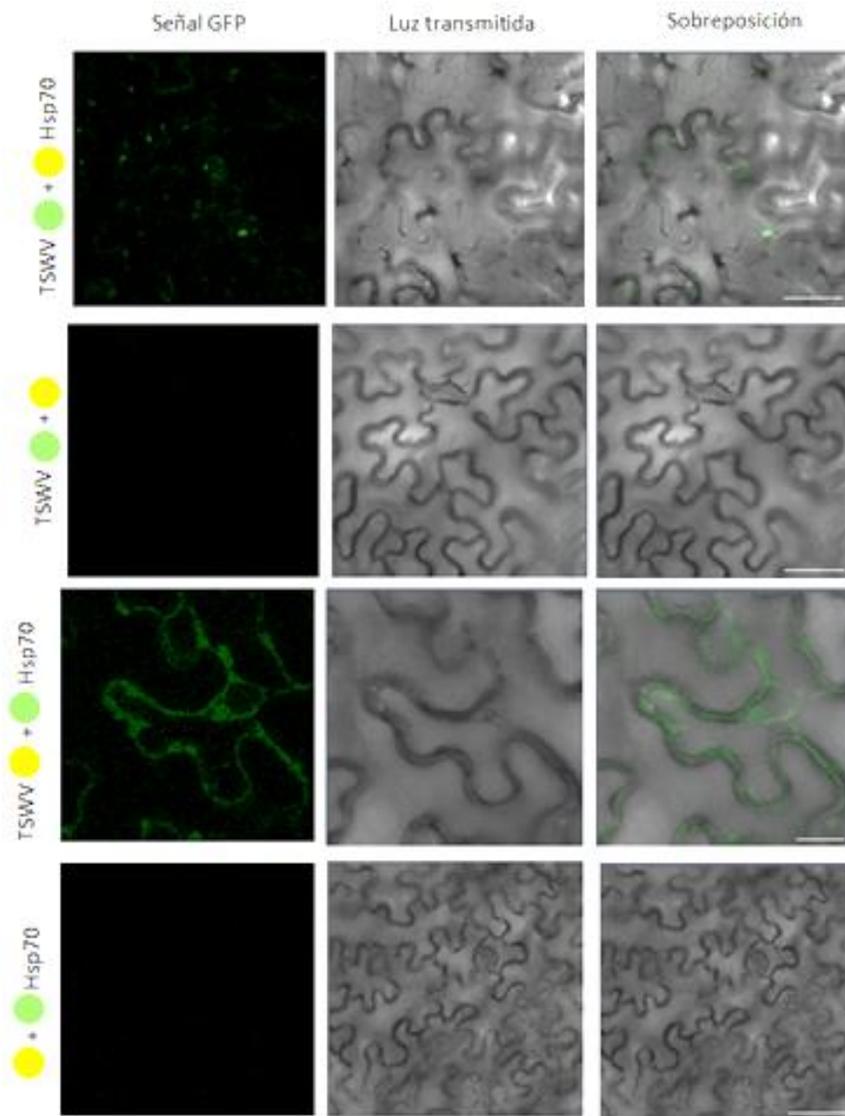


Figura 21. Análisis mediante BiFC de la interacción entre la proteína de movimiento de TSWV y la Hsp70. La expresión transitoria de ambas proteínas conteniendo el fragmento N^{YFP} (●) o C^{YFP} (●) fusionado en el extremo C-terminal de la MP (TSWV-●/●) o N-terminal de la Hsp70 (●/●-Hsp70), se realizó en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración. La señal fluorescente derivada de la reconstitución de la proteína fluorescente se detectó mediante microscopía confocal a 4 dpi. No se observó señal fluorescente cuando ambas proteínas se co-expresaron con el fragmento N^{YFP} (●). La línea blanca equivale a 20 μm (TSWV:N^{YFP}+C^{YFP}:Hsp70) o 50 μm (resto de imágenes).

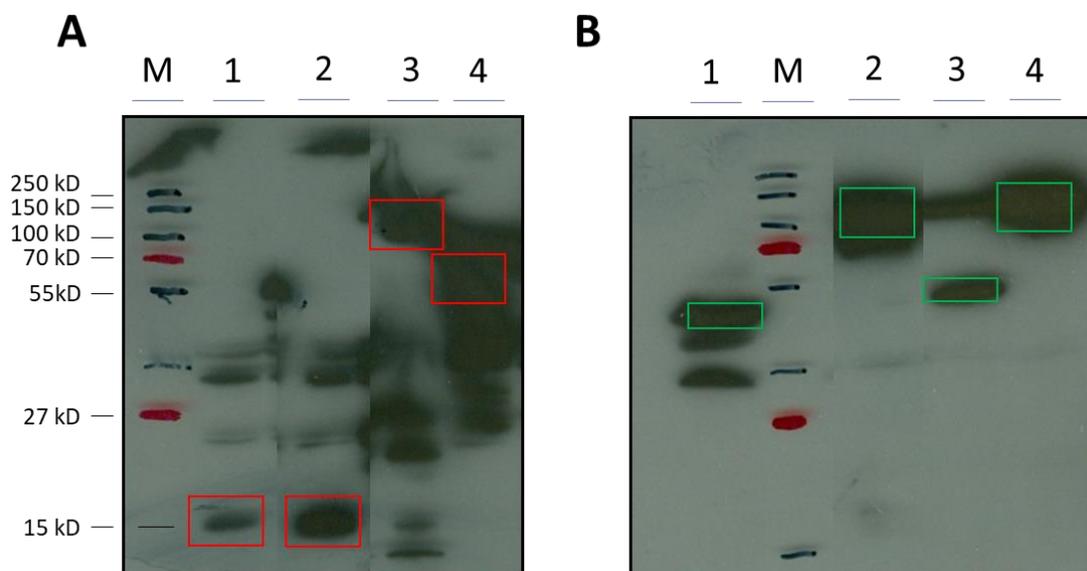


Figura 22. Análisis Western Blot de las proteínas expresadas en el análisis BiFC. Los extractos analizados corresponden a proteínas totales extraídas de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones TSWV:C^{YFP} + N^{YFP}(1), C^{YFP}:Hsp70 + N^{YFP}(2), TSWV:C^{YFP} + N^{YFP}:Hsp70 (3) y TSWV:N^{YFP} + C^{YFP}:Hsp70 (4). M, marcador de tamaño. Las membranas se incubaron con un anticuerpo específico del fragmento N^{YFP} (A) o C^{YFP} (B). Recuadros en rojo o verde indican las diferentes proteínas conteniendo el fragmento N^{YFP} o C^{YFP}, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante BiFC indican que la proteína Hsp70 interacciona con la MP de TSWV *in vivo*, representando un nuevo factor celular asociado a MPs de tospovirus, junto con la chaperona ADNJ-like (Soellick *et al.*, 2000) y la proteína del citoesqueleto At-4/1 (von Bargen *et al.*, 2001), descritas previamente. Se han descrito diferentes proteínas chaperonas que desempeñan un papel en el transporte viral, bien mediante una interacción directa con la MP (Krenz *et al.*, 2012; Soellick *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2009) o bien a través de otras proteínas virales (Hofius *et al.*, 2007; Gorovits *et al.*, 2013; Mathioudakis *et al.*, 2012), teniendo un papel mediador de la interacción de la MP viral con diferentes factores celulares, estabilidad, reclutamiento de otras chaperonas, ensamblaje, procesos de desnaturalización y renaturalización o degradación, entre otros (Link and Sonnewald, 2016). La observación de que proteínas chaperonas Hsp70 interaccionan con MPs de tospovirus extiende el amplio repertorio observado para otras MPs de distintos géneros las cuales interaccionan de manera directa (Begomovirus, Gorovits *et al.*, 2013; Potexvirus, Mathioudakis *et al.*, 2012) o indirecta (Potyvirus, Hofius *et al.*, 2007; Tospovirus, Soellick *et al.*, 2000), para facilitar el transporte viral. En el caso de Tospovirus, se ha propuesto que la interacción descrita de la MP de TSWV

con la chaperona ADNJ-like podría estar mediando el reclutamiento de la proteína Hsp70 (Soellick *et al.*, 2000) para, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, interactuar directamente con la proteína chaperona. La función propuesta para la Hsp70 en el transporte de virus estaría relacionada con el ensamblaje viral. La observación de que la interacción con la MP de TSWV ocurre en los plasmodesmos podría indicar una posible función en el ensamblaje de las estructuras tubulares descritas para tospovirus (Storms *et al.*, 1995). En este sentido, en el futuro se analizará el posible efecto de líneas celulares afectadas en la producción de Hsp70, en la formación de estructuras tubulares y/o el transporte viral.

En resumen, en el presente trabajo se ha puesto a punto un procedimiento novedoso para el estudio de la identificación y caracterización de complejos proteicos con proteínas de movimiento virales de la familia 30K, que dado su carácter hidrofóbico, son recalcitrantes a abordajes más simples y habituales. El procedimiento se ha mostrado viable y con un rendimiento aceptable y aunque en el momento de redactar las presentes conclusiones no se dispone de los datos sobre el número y calidad de las proteínas identificadas en los complejos es perceptible suponer que, dada la naturaleza del procedimiento y los controles incorporados, todas las proteínas identificadas serán parte del complejo macromolecular.

La puesta a punto de este procedimiento es especialmente relevante para el caso del TSWV, dado que: i) no existen hasta la fecha clones infecciosos con los que simular infecciones en sistemas modelo que nos permitan estudiar situaciones reales *in vivo* y ii) la MP del TSWV, además de ser el componente esencial en el transporte viral es un factor determinante en la superación o no de la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*, por lo que el procedimiento puesto a punto en este trabajo permitirá avanzar en el conocimiento de los requerimientos estructurales tanto de la proteína viral como la del huésped en la interacción que condiciona la respuesta de resistencia.

5. Conclusiones

Como resumen de las investigaciones realizadas en el presente trabajo final de máster es posible establecer las siguientes conclusiones:

- 1- El sistema modelo basado en el *virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), ha permitido analizar funcionalmente diferentes proteínas de movimiento (MP) del *virus del bronceado del tomate* (TSWV), que difieren en su capacidad de superar la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*, conteniendo una etiqueta peptídica de 32 residuos de aminoácido en el extremo C-terminal de la MP y precediendo los 44 amino ácidos C-terminales de la MP de AMV. La presencia de la etiqueta peptídica no ha alterado la capacidad de transporte célula a célula, observándose valores similares con las correspondientes construcciones sin etiquetar. La posibilidad de introducir secuencias heterólogas en la MP de AMV, abre interesantes perspectivas no solo para etiquetar proteínas virales sino para expresar o silenciar proteínas de interés.
- 2- La utilización del sistema de AMV conteniendo la MP de TSWV del aislado Gr1NL2 y la etiqueta TST ha permitido obtener una fracción purificada de la proteína que permitirá caracterizar los complejos proteicos asociados a la MP 10 viral (proceso en marcha). El abordaje realizado en un contexto de infección natural y mediante columnas de afinidad sin constricciones experimentales permitirá, a priori, caracterizar cualquier complejo proteico asociado a la MP de TSWV, representando una clara ventaja frente a los sistemas estándar.
- 3- La MP de TSWV es el factor de avirulencia del gen de resistencia *Sw-5b*. En el presente proyecto se ha puesto a punto el sistema de AMV con 4 MPs de TSWV con diferente capacidad para superar (Grau, GrauTSWV/V130) o no (Gr1NL2, GrauTSWV/T120) la resistencia mediada por el gen *Sw-5b*, y que contienen la etiqueta TST. Estas construcciones permitirán caracterizar los complejos proteicos asociados al gen de resistencia mediante el uso de plantas de *Nicotiana benthamiana* que expresan de forma constitutiva el gen *Sw-5b*.
- 4- El análisis tipo BiFC ha puesto de manifiesto la interacción entre la Hsp70 y MP de TSWV, reconstituyendo la fluorescencia tanto en el citoplasma como en los plasmodesmos. Hsp70 representa, junto con la chaperona ADNJ-like y la proteína del citoesqueleto At-4/1, las tres moléculas descritas por su interacción con la MP de TSWV y/o tospovirus. La observación de que proteínas chaperonas Hsp70 intervienen en el transporte de virus pertenecientes a los géneros virales de

Tospovirus, Begomovirus, Potexvirus y Potyvirus permite sugerir su papel general en el transporte de virus de plantas, presentándose como una posible diana en el diseño de resistencia de amplio espectro.

6. Bibliografía

Andret-Link P., and Fuchs M. (2005). Transmission specificity of plant viruses by vectors. *European Journal of Plant Pathology*, 87:153-165.

Aparicio F., Pallás V., and Sanchez-Navarro J.A. (2010). Implication of the C terminus of the *Prunus* necrotic ringspot virus movement protein in cell-to-cell transport and in its interaction with the coat protein. *The Journal of General Virology* 91, 1865-1870.

Aparicio F., Sanchez-Pina M.A., Sanchez-Navarro J.A., Pallas V. (1999). Location of *Prunus* necrotic ringspot ilarvirus within pollen grains of infected nectarine trees: evidence from RT-PCR, dot-blot and in situ hybridisation. *European Journal of Plant Pathology* 105:623-627.

Aramburu J., and Marti, M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of Tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *European Journal of Plant Pathology*. 52, 407-407.

Beijerinck M.J. (1898). Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Verhandelingen der Koninklijke akademie Wetenschappen te Amsterdam*, 65, 3-21.

BeARN A., Gafny R., Wolf S., Lucas W.J., Holt C.A., and Beachy R.N. (1991). The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology*, 182, 682-689.

Boiteux L.S. (1995). Allelic Relationships Between Genes for Resistance to Tomato Spotted Wilt Tospovirus in *Capsicum Chinense*. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 146-149.

Boiteux L.S., and Giordano L.D. (1993). Genetic-Basis of Resistance Against 2 Tospovirus Species in Tomato (*Lycopersicon-Esculentum*). *Euphytica*, 71, 151-154.

Bol J.F., van Vloten-Doting L., and Jaspars E.M.J. (1971). A functional equivalence of top component a ARN and coat protein in the initiation of infection by alfalfa mosaic virus. *Virology* 46 : 73 – 85

Bol J.F., (2005). Replication of alfamo- and ilarviruses: Role of the coat protein. *Annual Review of Phytopathology* 43, 39-62.

Bos L. (1992). New plant virus problems in developing countries: A corollary of agricultural modernisation. *Advances in virus research* 38:349–407.

Bradford M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" (PDF). *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254 – via Google Scholar.

Brill L.M., Nunn R.S., Kahn T.W., Yeager M., and Beachy R.N. (2000). Recombinant 617 tobacco mosaic virus movement protein is an ARN-binding, alpha-helical 618 membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:7112-7117.

Buddenhagen I. W. (1977). Resistance the vulnerability of tropical crops in relation to their evolution and breeding. *Annals of the New York Academy of Sciences* 287:309–326.

Canady M.A., Stevens M.R., Barineau M.S., and Scott J.W. (2001). Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica*, 117, 19-25.

Carrington J.C., and Whitham S.A. (1998). Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 336-341.

Chen X., Zhu M., Jiang L., Zhao W., Li J., Wu J., Li C., Bai B., Lu G., Chen H., Moffett P., and Tao X. (2016). A multilayered regulatory mechanism for the autoinhibition and activation of a plant CC-NB-LRR resistance protein with an extra N-terminal domain. *New Phytologist*. 212, 161–175.

Chu FH, Chao CH, Peng YC, Lin SS, Chen CC, and Yeh SD. (2001). Serological and molecular characterization of Peanut chlorotic fan-spot virus, a new species of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology*. 91:856–863.
doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.856 [PubMed]

Ciuffo M., Finetti-Sialer M.M., Gallitelli D. and Turina M. (2005). First report in Italy of a resistance-breaking strain of Tomato spotted wilt virus infecting tomato cultivars carrying the Sw5 resistance gene. *Plant Pathology* 54, 564.

Contreras R.S., Depreste Manso T.L, y Rodríguez Y. (2007). El virus del broceado del tomate (TSWV) y su incidencia en el cultivo del pimiento (PDF)(pag. 33). *Temas de ciencia y tecnología*. <http://www.utm.mx/temas/temas32.html>

de Haan P., Kormelink R., de Oliveira Resende R., van Poelwijk F., Peters D., and Goldbach R. (1991). Tomato spotted wilt virus L ARN encodes a putative ARN polymerase. *Journal of General Virology* 72, 2207-2216.

de Haan P., Wagemakers L., Peters D., and Goldbach, R. (1989). Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and MARNs of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 70: 3469–73.

Drake J. W., Charlesworth B., Charlesworth D., and Crow J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667–1686.

Du Y., Zhao J., Chen T., Liu Q., Zhang H, Wang Y, Hong Y, Xiao F, Zhang L, Shen Q, Liu Y (2013) Type I J-domain NbMIP1 proteins are required for both tobacco mosaic virus infection and plant innate immunity. *PLOS Pathogens* 9(10):e1003659

Fajardo T.V., Peiro A., Pallás V., and Sanchez-Navarro J.A. (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *Journal of General Virology*. 94, 677-681.

FAO (2005). Status of research and application of crop biotechnologies in developing countries. FAO. Rome-Italy

Fernández-Calviño L., Faulkner C., and Maule A. (2011). Plasmodesmata as active conduits for virus cell-to-cell Movement. In *Recent Advances in Plant Virology*. Edited by Carole Caranta, Miguel A. Aranda, Mark Tepfer and Juan Jose López-Moya. Caister Academic Press.

Ferrand L. (2014). Situación actual de enfermedades virales en cultivos del Cinturón hortiflorícola platense. (PDF) https://inta.gob.ar/sites/default/files/enfermedades_virales_en_cinturon_platense._l._ferrand.pdf

Francki R. I. B., Milne R. G., and Hatta T. (1985). Atlas of Plants Viruses. CRC Press. Boca Raton, Florida, EEUU.65p.

García-Arenal F., and McDonald B. A. (2003). An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93:941-952.

García-Arenal F., Fraile A., and Malpica J.M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39:157-186

Goldbach R., and Peters D. (1994). Posible cause of Tospovirus diseases. *Seminars in Virology*, 5: 113-120.

Gordillo L.F., Stevens M.R., Millard M.A., and Geary B. (2008). Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 92, 694-704.

Gorovits R., Moshe A., Ghanim M., and Czosnek H. (2013). Recruitment of the host plant heat shock protein 70 by tomato yellow leaf curl virus coat protein is required for virus infection. *PLoS One* 8(7):70280

Granval de Millán N. y Gracia O., (1999). El género Tospovirus y su importancia en la horticultura. *Avances en horticultura* 4.

Hallwass M., de Oliveira A.S., de Campos Dianese E., Lohuis, D., Boiteux L.S., InoueNagata A.K., Resende R.O., and Kormelink R., (2014). The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology* 15 (9), 871–880.

Harris K.F. (1981). Arthropod and Nematode vectors of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 19, 209-214.

Hofius D, Maier AT, Dietrich C, Jungkuntz I, Bornke F, Maiss E, Sonnewald U (2007) Capsid protein-mediated recruitment of host ADNJ-like proteins is required for potato virus Y infection in tobacco plants. *Journal of Virology* 81(21):11870–11880

Iwanowski D. (1892). Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg*. 35 67-70.

Jones R. A. C. (1981). The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean Region of South America. In "Pests, Pathogens and Vegetation" (J. M. Thresh ed.), pp. 89–107. Pitman, London

Kormelink R., De Haan P., Meurs C., Peters D., and Goldbach R. (1992). The nucleotide sequence of the M RNA segment of Tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, 73: 2795-2804.

Krenz B., Jeske H., and Kleinow T. (2012). The induction of stomata formation by a plant ADN-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Frontiers in Plant Science* 3:291

Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez C., y Hernández M.D. (2001). La diseminación del *virus del mosaico del pepino dulce* (Pepino mosaic virus) en las labores de entutorado y desbrotado de las plantas de tomate. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 27, 489-501.

Latham L.J., and Jones R.A.C. (1998). Selection of resistance breaking strains of tomato spotted wilt tospovirus. *Annals of Applied Biology* 133, 385-402.

Lazarowitz S.G. (1999). Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 332-338.

Leastro M.O., De Oliveira A.S., Pallás V., Sánchez-Navarro J.A., Kormelink R., Resende R.O. (2017). The NSm proteins of phylogenetically related tospoviruses trigger Sw-5b-mediated resistance dissociated of their cell-to-cell movement function. *Virus Research* 240, 25-34

Leastro M.O., Pallas V., Resende R.O., and Sanchez-Navarro J.A., (2015). The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology* 478, 39-49.

Lewandowski D.J., and Adkins S. (2005). The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342, 26-37.

Li W., Lewandowski D.J., Hilf M.E., and Adkins S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390, 110-121.

Ling K.S. (2008). Pepino mosaic virus on Tomato Seed: Virus Location and Mechanical Transmission. *Plant Disease* 92:1701-1705

Link K., and Sonnewald U. (2016). Interaction of movement proteins with host factors, mechanism of viral host cell manipulation and influence of MPs on plant growth and development. In: Kleinow T, ed. *Plant–virus interactions: molecular biology, intra- and intercellular transport*. Switzerland: Springer International Publishing , 1 –37.

López C., Aramburu J., Galipienso L., Soler .S, and Nuez F, Rubio L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 92:210-215

Lot H., Campbell R.N., Souche S., Milne R.G., and Roggero P. (2002). Transmission by *Olpidium brassicae* of mirafiori lettuce virus and lettuce big-vein virus, and their roles in lettuce big-vein etiology. *Phytopathology* 92: 288–293

Lu L., Du Z., Qin M., Wang P., Lan H., Niu X., Jia, D., Xie L., Lin Q., and Wu Z. (2009). Pc4, a putative movement protein of rice stripe virus, interacts with a type I ADNJ protein and a small Hsp of rice. *Virus Genes* 38(2):320–327

Martínez-Gil L., Sanchez-Navarro J.A., Cruz A., Pallas V., Perez-Gil J., and Mingarro I., 2009. Plant Virus Cell-to-Cell Movement Is Not Dependent on the Transmembrane Disposition of Its Movement Protein. *Journal of Virology* 83, 5535-5543.

Mathioudakis M.M., Veiga R., Ghita M., Tsikou D., Medina V., Canto T., Makris A.M., and Livieratos I.C. (2012). Pepino mosaic virus capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus Research* 163(1):28–39

Melcher U. (1990). Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *Journal of General Virology*. 71, 1009-1018.

Melcher U. (2000). The 30K superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology*. 81, 257-266.

Milne R.G., and Francki, R.I. (1984). Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae?. *Intervirology*, 22, 72-76.

Mound L. A. (1996). The Thysanoptera vector species of tospoviruses. *Acta Horticulturae* 431: 298-309.

Moury B., Selassie K.G., Marchoux G., Daubeze A.M., and Palloix A. (1998). High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted wilt Tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology*. 104, 489-498.

Niehl A., and Heinlein M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248(1):75–99.

Oerke E.C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144:31-43.

Ohnishi J., Hosokawa D., Fujisawa I., and Tsuda S. (1998). TSWV movement into salivary glands during pupation of the thrips vector, *Thrips setosus*, is associated with the transmissibility. In: *Recent Progress: Fourth International Symposium on Tospoviruses and Thrips in Floral and Vegetable Crops*. Wageningen, The Netherlands, 51-53.

Pallás V., and Garcia, J.A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92, 2691-2705.

Pallás V., Genovés A., Sanchez-Pina M.A., and Navarro J.A. (2011). Systemic movement of viruses via the plant phloem. In *Recent Advances in Plant Virology*, Edited by Carole Caranta, Miguel A. Aranda, Mark Tepfer and Juan Jose López-Moya. Caister Academic Press.

Pallas V., Mas P., and Sanchez-Navarro J.A. (1998). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. *Plant Virology Protocols: from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press Inc. G.D. Foster & S.C. Taylor Eds. Lugar de publicación: Totowa, NJ. 81, 461-468.

Pappu H.R., Jones R. A. C., and Jain R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 219-236.

Parrella G., Gognalons P., Gebre-Selassie K., Vovlas C., and Marchoux G. (2003). An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology* 8: 227–264

Peiró A., Martínez-Gil L., Tamborero S., Pallás V., Sanchez-Navarro J.A., and Mingarro, I. (2014). The Tobacco mosaic virus Movement Protein Associates with but Does Not Integrate into Biological Membranes. *Journal of Virology* 88, 3016-3026.

Prins M., and Goldbach R. (1998). The emerging problem of Tospovirus infection and non-conventional method of control. *Trends in Microbiology* 6: 31-34

Roselló S., Jorda C., and Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus – a review. *Scientia Horticulturae* 67: 117-150.

Sakurai T. (2004). Transmission of Tomato spotted wilt virus by the dark form of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) originating in tomato fields in Paraguay. *Applied Entomology Zoology*, 39: 189-194.

Sánchez-Navarro J., Fajardo T., Zicca S., Pallás V., and Stavelone L. (2010). Caulimoviridae tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. *Journal of Virology*. 84, 4109-4112.

Sanchez-Navarro J.A., and Bol J.F. (2001). Role of the Alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Molecular plant-microbe interactions: Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1051-1062.

Sanchez-Navarro J.A., Carmen Herranz M., and Pallás V. (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilar-, bromo-, cucumo-, tobamo- and comoviruses and does not require virion formation. *Virology* 346, 66-73.

Sánchez-Navarro J., Fajardo T., Zicca S., Pallás V., and Stavelone L. (2010). Caulimoviridae tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. *Journal of Virology*. 84, 4109-4112.

Savary S., Ficke A., Aubertot J-N., and Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4:519-537.

Schmidt T.G., Batz L., Bonet L., Carl U., Holzapfel G., Kiem K., Matulewicz K., Niermeier D., Schuchardt I., and Stanar K. (2013). Development of the **Twin-Strep-tag**[®] and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatant's. *Epub* 92(1), 54-61

Shimizu T., Yoshii A., Sakurai K., Hamad, K., Yamaji Y., Suzuki M., Namba S., and Hibi T. (2009). Identification of a novel tobacco ADNJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. *Archives of Virology* 154(6):959–967

Sin S.H., McNulty B.C., Kennedy G.G. and Moyer J.W. (2005). Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 102, 5168-5173.

Smith K. M. (1932). Studies on plant virus diseases. XI. Further experiments with a ringspot virus. Its identification of spotted wilt of the tomato. *Annals of Applied Biology*, 19: 305-330

Soellick T.-R., Uhrig J.F., Bucher G.L., Kellmann J.-W., and Schreier P.H., (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): ARN binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 2373-2378.

Spassova M.I., Prins T.W., Folkertsma R.T., Klein-Lankhorst R.M., Hille J., Goldbach R.W., and Prins, M. (2001). The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7, 151-161.

Staskawicz B.J., Ausubel F.M., Baker B.J., Ellis J.G., and Jones J.D.G. (1995). *Molecular-Genetics of Plant-Disease Resistance*. *Science* 268, 661-667.

Stavolone L., Villani M.E., Leclerc D., and Hohn T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 6219-6224.

Stevens M.R., Scott S.J., and Gergerich R.C. (1991). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59, 9-17.

Storms M.M., Kormelink R., Peters D., van Lent J.W., and Goldbach R.W. (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214, 485-493.

Takeda A., Sugiyama K., Nagano H., Mori M., Kaido M., Mise K., Tsuda S. and Okuno T. (2002). Identification of a novel ARN silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters*. 532, 75-79.

Taschner P.E., Van der Kuyl A.C., Neeleman L., and Bol J.F. (1991). Replication of an incomplete alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology* 181, 445-450.

Tentchev D., Verdin E., Marchal C., Jacquet M., Aguilar J. M., and Moury B. (2011). Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology*, 92: 961– 973.

Thompson G.J., and van Zijl J.J.B. (1995). Control of tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. *Acta Horticulturae*. 431, 379-384.

Thresh J. M. (1980). The origins and epidemiology of some important plant virus diseases. *Annals of Applied Biology*. 5:1–65.

Thresh J. M. (1982). Cropping practices and virus spread. *Annual Review of Phytopathology*. 20:193–218.

Thresh J. M. (ed.) (1981). “Pests Pathogens and Vegetation.” Pitman, London, UK.

Tsompana M., Abad J., Purugganan M., and Moyer J.W. (2005). The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14:53-66

Turina M., Tavella L. and Ciuffo M. (2012). Tospoviruses in the mediterranean area. *Advances in Virus Research* 84: 403-437.

Van der Vlugt R.A.A. (2009). Pepino mosaic virus. *Hellenic Plant Protection Journal* 2, 47-56.

von Bargan S, Salchert K, Paape M, Piechulla B, Kellmann JW (2001) Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and ADNJ-like chaperones. *Plant Physiology and Biochemistry* 39(12):1083–1093

Waigmann E., Chen M.H., Bachmaier R., Ghoshroy S. and Citovsky V. (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *The EMBO Journal*. 19, 4875-4884.

Whitfield A. E., Ullman D. E. and German T. L. (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 459-89

Wijkamp I., Lent J. Van, Komerlink R., Goldbach R., and Peters D. (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, 74: 342–349.

Zaccardelli M., Perrone D., Del Galdo A., Campanile F., Parrella G. and Giordano I. (2008). Tomato genotypes resistant to tomato spotted wilt virus evaluated in open field crops in Southern Italy. *Acta Horticulturae* 789, 147-149.

Zhu M., Jiang L., Bai B., Zhao W., Chen X., Li J., Liu Y., Chen Z., Wang B., Wang C., Wu Q., Shen Q., Dinesh-Kumar S.P., and Tao X., (2017). The Intracellular Immune Receptor Sw-5b Confers Broad-Spectrum Resistance to Tospoviruses through Recognition of a Conserved 21-Amino Acid Viral Effector Epitope. *Plant Cell* 29, 2214-2232.