CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Aspectos moleculares y celulares del movimiento y distribución final del *Virus del moteado del clavel* (CarMV) en plantas de clavel y de *Chenopodium quinoa*.

TESIS DOCTORAL

Silvia García Castillo

2001

1. Introducción

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA VIROLOGÍA VEGETAL 3

1.2. GÉNERO CARMOVIRUS 6

1.2.1. Estructura y organización genómica 9

1.2.2. Mecanismos de expresión génica 13

1.2.3. Función de las proteínas codificadas por el virus 14

1.2.4. Efectos citopatológicos 17

1.3. EL VIRUS DEL MOTEADO DEL CLAVEL (CarMV) 20

1.3.1. Propiedades biológicas y transmisibilidad 20

1.3.2. Propiedades del virión, estructura y organización genómica 23

1.4. MOVIMIENTO VIRAL EN LA PLANTA INFECTADA 25

1.4.1. Movimiento a corta distancia (célula a célula) 27

1.4.2. Movimiento a larga distancia 35

1.4.3. Mecanismos de resistencia al movimiento 49

1.5. DISTRIBUCIÓN FINAL DEL VIRUS EN LA PLANTA 54

1.5.1. Influencia de los factores ambientales en la distribución final del virus en la planta 54

1.5.2. Influencia del estado de desarrollo de la planta en la distribución final del virus 59

1.5.3. Tejidos sumideros de la planta 60

2. Justificación y Objetivos 64

3. CAPÍTULO I 68

Análisis Espacio-Temporal de la Acumulación de los RNAs y Proteínas de Cubierta y Movimiento (p7) del *Virus del moteado del clavel* (CarMV) en *Chenopodium quinoa*.

4. CAPÍTULO II 101

Bases Celulares de la Traslocación y Distribución Final del *Virus del moteado del clavel* (CarMV) en su Huésped Natural.

5. CAPÍTULO III 144

Influencia de las Condiciones de Crecimiento de Plantas de *Chenopodium quinoa* en las Rutas de Translocación e Infección Sistémica del *Virus del moteado del clavel*.

6. Conclusiones 171

7. Bibliografía 175

1. Introducción

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA VIROLOGÍA VEGETAL.

En 1898 se puso en evidencia por primera vez que el agente causal de una enfermedad conocida con el nombre del mosaico del tabaco poseía propiedades físicas diferentes a las bacterias (Beijerinck, 1898). En 1936 se demostró que estos patógenos, a los que se les acuñó el nombre de virus, contenían ácido nucleico, además del componente proteico determinado previamente. En el caso concreto del *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), se demostró que el ácido nucleico era del tipo RNA y 20 años más tarde, Fraenkel-Conrat (1956) observó que preparaciones puras de este RNA eran por sí solas capaces de reproducir la enfermedad. Este descubrimiento significó la demostración, por primera vez, de que el RNA también es portador de la información del material hereditario.

Una serie de descubrimientos posteriores pusieron de manifiesto que los virus vegetales pueden considerarse como parásitos moleculares de la maquinaria traduccional de la célula. Así pues, una eficiente expresión y replicación del genoma viral debe pasar por la competición con los genes celulares. Dada la limitada capacidad codificante del genoma de los virus vegetales (la mayoría de ellos poseen entre 4 y 10 genes), estos patógenos utilizan una variada combinación de mecanismos de expresión. Entre éstos cabe destacar, la organización multipartita de su genoma, la síntesis de RNAs subgenómicos, el procesamiento proteolítico de una única poliproteína, el solapamiento de los marcos de lectura abierta (ORF), el desplazamiento de lectura de los ORF, la síntesis proteica obviando codones de parada, la presencia de activadores traduccionales, etc.

En general, el ciclo de infección de los virus vegetales incluye las siguientes etapas (Figura 1):

1. Penetración en la célula vegetal, que puede ocurrir bien mecánicamente o bien con la ayuda de vectores biológicos (insectos, nemátodos, hongos).
2. Desencapsidación y traducción, procesos que muy probablemente están acoplados.
3. Replicación, en la que intervienen proteínas codificadas tanto por el virus como por el huésped.
4. Movimiento célula a célula, que ocurre a través de los plasmodesmos y que requiere, al menos, la proteína de movimiento (MP) codificada por el genoma viral.
5. Movimiento sistémico, por el que el virus alcanza las partes dístales de la planta a través del sistema vascular (normalmente vía floema).
6. Transmisión, a otras plantas no infectadas a través de vectores biológicos (etapa 1).

La elucidación de la estructura primaria de un gran número de virus vegetales y la posterior comparación con la de los virus animales ha puesto de manifiesto la presencia de genes funcionalmente homólogos entre ambos y ha permitido su clasificación en cuatro grandes superfamilias: virus tipo alfa, tipo picorna, tipo carmo y tipo sobemo (Ahlquist y col., 1985; Goldbach, 1987; Habili y Symons, 1989; Goldbach y col., 1991). El virus objeto de estudio en el presente trabajo, el *Virus del moteado del clavel* (CarMV), pertenece a la superfamilia tipo carmo dentro de la familia *Tombusviridae*. Los virus pertenecientes a esta familia se caracterizan por poseer un genoma monopartito de sentido positivo de RNA de simple cadena. La familia *Tombusviridae* consta de ocho géneros: Tombusvirus, Carmovirus, Machlomovirus, Necrovirus, Dianthovirus, Panicovirus, Aureusvirus y Avenavirus (Russo y col., 1994; Mayo y Pringle, 1998; Pringle, 1998), siendo el género Carmovirus al que pertenece el CarMV.

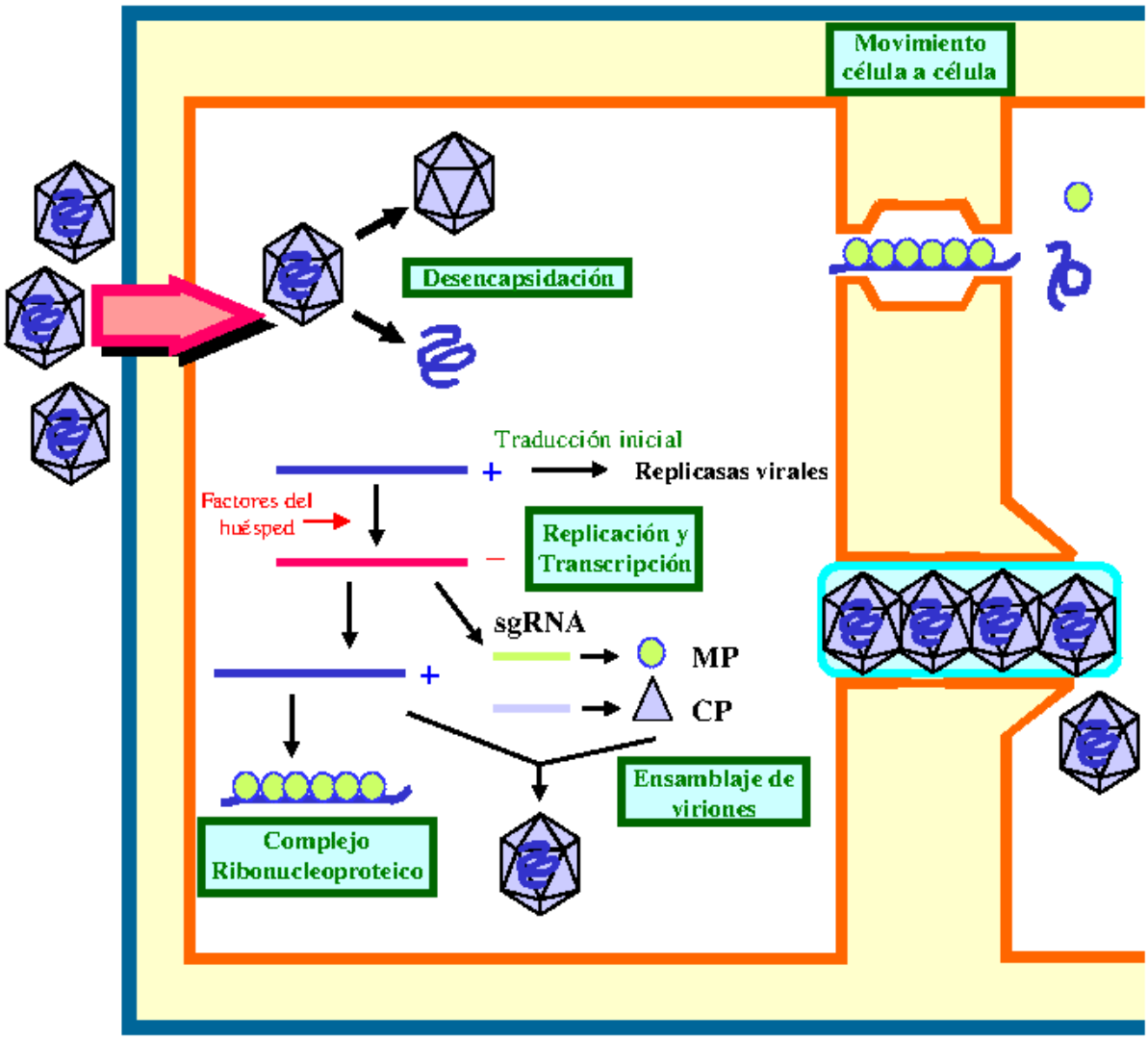


FIGURA 1. Esquema simplificado del ciclo viral de los virus de RNA. En el esquema representado se pueden observar las etapas de penetración viral y expresión temprana de genes, replicación y transcripción del RNA viral, ensamblaje de viriones y dispersión de la infección.

1.2. GENERO CARMOVIRUS

Los Carmovirus han sido clasificados dentro de la familia *Tombusviridae* que fue establecida por el Comité Internacional para la Taxonomía de los virus (ICTV) en el Noveno Congreso Internacional de Virología en Glasgow en 1993 (Mayo y Martelli, 1993). Se describe como constituida por virus de RNA de pequeño tamaño que contienen partículas poliédricas de contorno redondeado (alrededor de 30 nm de diámetro) cuya estructura superficial está pobremente resuelta (Martelli y Russo, 1994).

La gama de huéspedes naturales de cada especie de virus es reducida y restringida a dicotiledóneas, si bien, la de huéspedes experimentales es amplia. Suelen causar importantes pérdidas económicas en las cosechas, especialmente en las regiones templadas, donde se han descrito la mayoría de los virus pertenecientes a la familia *Tombusviridae* (Russo y col., 1994). Todos ellos son transmisibles por inoculación mecánica y por propagación vegetativa. Estos virus se encuentran en ambientes naturales (aguas superficiales y tierras de cultivo) por lo que en general no necesitan vectores para su transmisión. Sólo en el caso de un Tombusvirus [*Virus de la necrosis del pepino* (CNV)] y tres Carmovirus [*Virus del manchado de la hoja del pepino* (CLSV), *Virus del pepino transmitido por el suelo* (CSBV) y el *Virus de las manchas necróticas del melón* (MNSV)] se ha demostrado que son transmitidos por el hongo (Chytrid fungus) *Olpidium bornovanum* (Martelli, 1994), siendo otros transmitidos por escarabajos [*Virus del moteado de la carilla* (CPMoV), *Virus del mosaico suave de la judía* (BMMV), *Virus del moteado del Blackgram* (BMoV), *Virus del arrugamiento del nabo* (TCV)] (van Regenmortel y col., 2000). La infección ocurre en primer lugar en las raíces, donde pueden permanecer restringidos, pero pueden invadir todo tipo de tejidos cuando ocurre una infección sistémica (Russo y col., 1994).

El grupo Tombusvirus es uno de los 16 grupos de plantas establecido en 1971 (Harrison y col., 1971). Su estructura ha permanecido inalterable a través de los años a

excepción del número de componentes. En el Comité Internacional para la Taxonomía de los virus (ICTV) de 1991, el grupo se extiende de 5 a 12 virus (Martelli, 1991). El establecimiento del grupo Carmovirus es más reciente. Aunque desde 1977 se tienen evidencias para separar en un grupo distinto al CarMV junto con un número de virus similares (Hull, 1977), éste no es reconocido formalmente como grupo taxonómico hasta 1991 por la ICTV (Morris, 1991). Ambos grupos (Tombusvirus y Carmovirus) presentan características comunes, como son la estructura y morfología de la partícula, el tipo de genoma (monopartito de sentido positivo de RNA de simple cadena), las propiedades fisico-químicas y el comportamiento epidemiológico y ecológico. Pero diferencias en el tamaño del genoma, el cual es ligeramente mayor en Tombusvirus (4,7 Kb en vez de 4 Kb), y en su organización estructural han mantenido separados los dos grupos taxonómicos, que después han dado lugar a los respectivos géneros Tombusvirus y Carmovirus (Russo y col., 1994).

Actualmente la familia *Tombusviridae* comprende el género Tombusvirus con 13 especies definitivas, el género Carmovirus con 14 especies definitivas y 7 especies provisionales (Tabla 1), el género Necrovirus con 5 especies, el género Dianthovirus con 3 especies y los géneros Machlomovirus, Aureusvirus, Avenavirus y Panicovirus con 1 especie cada uno

GÉNERO CARMOVIRUS

Especies	Referencias
Virus transmitido por el agua de Ahlum (AWBV)	Yi y col. (1992)
Virus del mosaico suave de la judía (BMMV)	Waterworth (1981)
Virus del rayado clorótico de la cardamine (CCFV)	Skotnicki y col. (1993)
Virus del moteado del clavel (CarMV)	Waterworth y Kaper (1972)
Virus del moteado de la carilla (CPMoV)	Bozarth y Shoyinka (1979).
Virus del pepino transmitido por el suelo (CuSBV)	Koenig y col. (1983)
Virus del mosaico de la galinsoga (GaMV)	Behncken y col. (1982)
Virus de las manchas en anillo cloróticas del Hibiscus (HCRSV)	Waterworth (1980
Virus de los anillos necróticos del iris Japonés (JINRV)	Takemoto y col. (2000)
Virus de las manchas necroticas del melón (MNSV)	Bos y col. (1984)
Virus de la rotura de la flor del Pelargonium (PFBV)	Stone y Hollings (1973)
Virus del cactus saguaro (SgCV)	Hammond (1981)
Virus del arrugamiento del nabo (TCV)	Hollings y Stone (1972)
Virus transmitido por el agua de Weddel (WWBV)	Yi y col. (1992)
Especies provisionales en el género	
Virus del moteado del Blackgram (BMoV)	Scott y Hoy (1981)
Virus latente del saúco (ELV)	Jones (1974)
Virus del moteado de la glicina (GMoV)	Behncken y Dale (1984)
Virus de la necrosis apical del narciso (NTNV)	Mowat y col. (1976)
Virus arabescos del Pelargonium (PLPV)	Plese y Stefanac (1980)
Plantain virus 6 (PL6V)	Hammond (1981)
Virus asintomático de la Tephrosia (TeSV)	Bock (1982)

Tabla 1: Clasificación de los virus pertenecientes al género Carmovirus

1.2.1. Estructura y organización genómica

Las micrografías electrónicas de tinciones negativas de los virus pertenecientes al género Carmovirus muestran partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diámetro, con una superficie granular (Fig. 2). La masa molecular del virión es de 8,2 x 10^6. Sedimenta como un solo componente con un coeficiente de sedimentación de 118-130 S (van Regenmortel y col., 2000). El peso molecular del genoma es de 1.4-1.6 x 10^6 y el de la proteína de la cápsida de 36,000-46,000 (Morris y Carrington, 1988).

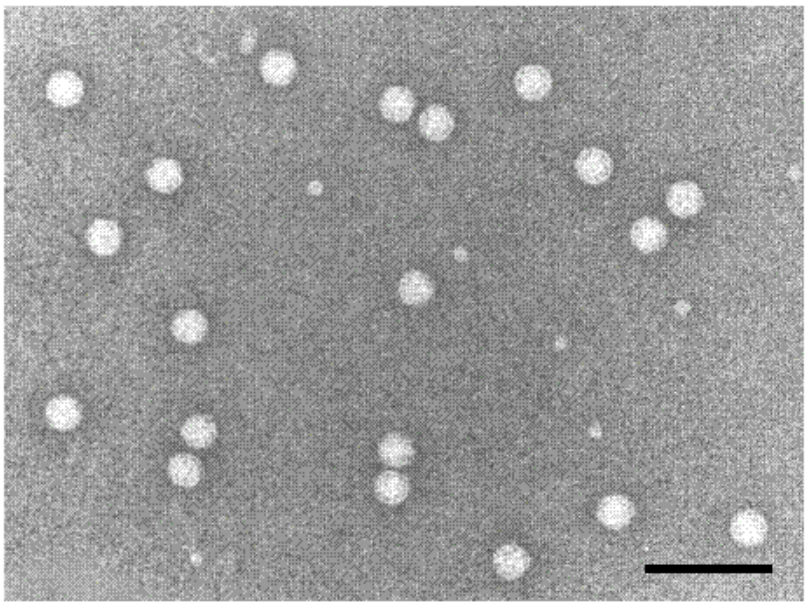


FIGURA 2. Visualización mediante tinción negativa de partículas purificadas del CarMV al Microscopio Electrónico de Transmisión. (Barra=100 nm). Micrografía obtenida por las Dras. C. Risco y M.A Sánchez-Pina en el CNB (CSIC, Madrid).

Las partículas virales se hallan distribuidas en un sistema icosaédrico de simetría T=3 y están compuestas de 180 subunidades proteicas químicamente

idénticas. Cada subunidad se pliega en dominios estructurales distintos: **R**, el dominio interno N-terminal que interacciona con el RNA viral; **S**, el dominio armazón que constituye el esqueleto superficial de la cápsida al que está conectado, mediante un brazo amino terminal, el dominio R; y **P**, el dominio C-terminal que se proyecta hacia afuera, que conecta con el dominio S por una bisagra. Los dominios P se agrupan en parejas para formar 90 proyecciones sobre la superficie de la partícula (Harrison, 1983; Morgunova y col., 1994; Russo y col., 1994). El dominio P determina la propiedades inmunológicas y otras propiedades biológicas del virión (Russo y col., 1994) Los contactos entre dímeros son importantes para el ensamblaje y la estabilización de la estructura del virión. El dominio R contiene un gran número de resíduos cargados positivamente responsables de la unión con el RNA. Se han descrito sitios de unión a Ca^{++} que estabilizan los contactos entre dominios S (van Regenmortel y col., 2000).

Aunque la partícula viral es una estructura muy estable, ésta puede adoptar una estructura expandida a valores de pH superiores a 7 y en presencia de EDTA, pero este cambio conformacional es reversible bajando el pH o por adición de Ca^{++} (Stone, 1980; Stefanac y col., 1982). Durante esta expansión de la partícula no hay cambios de la configuración interna de los dominios de las subunidades proteicas de la partícula y sólo están implicadas las uniones flexibles de las subunidades. Se ha sugerido que estos cambios conformacionales pueden ser importantes para permitir que el RNA entre y salga de la partícula (Stone, 1980; Francki y col., 1985).

En el TCV el ensamblaje del virión se inicia por un complejo de tres dímeros de subunidades proteicas que interaccionan con una zona específica del RNA viral (Sorger y col., 1986). Los primeros análisis de este complejo ribonucleoproteíco de iniciación revelaron que los fragmentos de unión del RNA a las subunidades de la proteína de cubierta, se localizaban en la región 5´terminal (en el gen de la polimerasa cerca del codón de terminación débil de la proteína de 28K), y en la región 3´(en el gen de la proteína de cubierta). Se sugirió entonces que la participación de estas regiones del genoma distantes en la encapsidación facilitaban la condensación del genoma en un

volumen pequeño (Wei y col., 1990). Análisis posteriores pusieron de manifiesto que una región de 186 nucleótidos en el extremo 3´de la proteína de cubierta en la que se encuentra una horquilla de 28 nucleótidos, es la necesaria para que se produzca la encapsidación (Qu y Morris, 1997).

Se conoce la secuencia completa de nucleótidos de nueve especies de virus, CarMV (Guilley y col., 1985; Zhang y col., 1999; Cañizares y col., 2001), MNSV (Riviere y col., 1989; Riviere y Rochon, 1990), TCV (Carrington y col., 1989; Collmer y col., 1992), CCFV (Skotnicki y col., 1993), CPMoV (You y col., 1995), SgCV (Weng y Xiong, 1997), GaMV (Ciuffreda y col., 1998), HCRSV (Huang y col., 2000), y JINRV (Takemoto y col., 2000).

Los virus pertenecientes al género Carmovirus, cuyo miembro tipo es el CarMV (Morris y Carrington, 1988), poseen un genoma monopartito de RNA linear de simple cadena y polaridad positiva, de aproximadamente 4.0 Kb, que contiene al menos 5 marcos de lectura abierta (ORFs) ("open reading frames") (Fig. 3). La presencia de una estructura de tipo Cap en el extremo 5´sólo ha sido demostrado para el CarMV (Guilley y col., 1985), y propuesta para el CPMoV (You y col., 1995). No poseen en su extremo 3´ una cola poliadenilada (Carrington, 1986; Carrington y Morris, 1986). Una secuencia no traducible precede al primer ORF (ORF 1), el cual termina en un codón de terminación débil, y codifica para una proteína de 27-29K. La lectura a través ("read through") del codón débil tiene como resultado la síntesis de una proteína de 85-88k (ORF 2). El ORF 3 codifica para una proteína de aproximadamente 7K, empezando 25nt aguas arriba del codón de terminación del ORF 2. El ORF 4 codifica para una proteína de 9K a partir de un codón de iniciación localizado aguas abajo del codón de terminación de la proteína 85K y solaparía parcialmente con el ORF 3. En el MNSV, el ORF 3 y 4 están separados por un codón débil y se encuentran en la misma fase de lectura, por lo que la lectura a través del ORF 3 daría lugar a una proteína de 14K (Russo y col., 1994).

En todos los Carmovirus, el último marco de lectura abierta (ORF 5) codifica para la proteína de cubierta (CP) y es seguida de una secuencia no codificante de aproximadamente 300 nt que está altamente estructurada y que contiene las secuencias necesarias para el reconocimiento por la polimerasa y la síntesis de las cadenas negativas (Morris y Carrington, 1988; Song y Simon, 1995; Stupina y Simon, 1997; Carpenter y Simon, 1998).

Recientemente, se ha descrito nuevos ORFs hasta el momento no conocidos en miembros del género Carmovirus. Así, en el caso del HCRSV se ha encontrado un nuevo ORF dentro del ORF1 que codificaría para una proteína de 23 kDa, y otro adicional ORF en la misma zona que el ORF5 que codificaría para una proteína de 25 kDa (Huang y col., 2000). En algunos aislados del PFBV se ha demostrado la expresión de un polipéptido adicional de 32 kDa en la región 5´proximal del genoma (Díez y col., 1999). Hasta el momento no se conoce la función de estas nuevas proteínas.

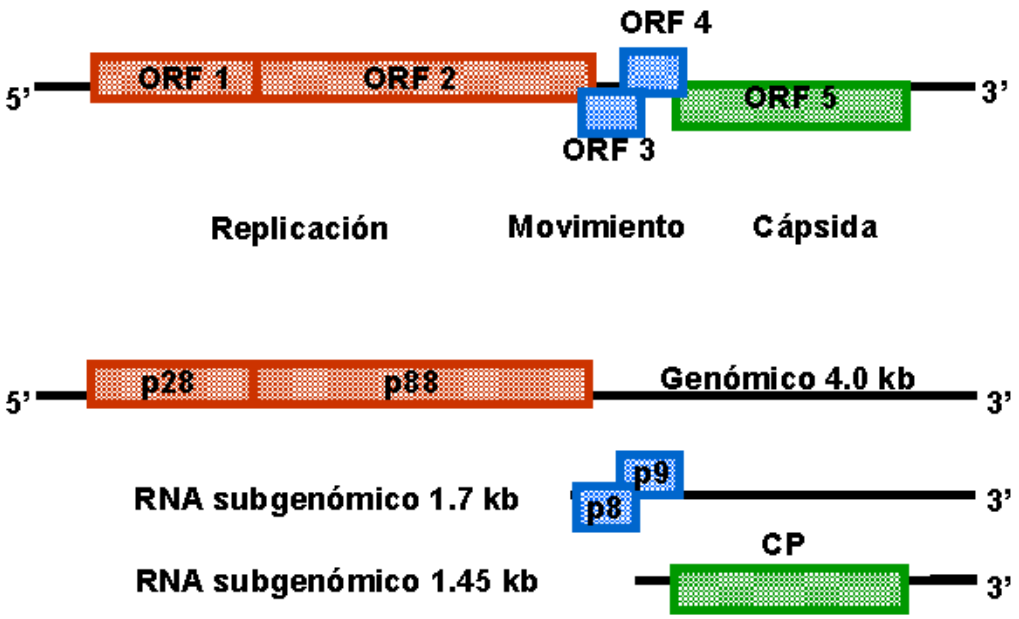


FIGURA 3. Representación esquemática de la organización y expresión del genoma de los Carmovirus en general (arriba) y del Carmovirus mejor estudiado (TCV) (abajo). La organización de la región central (ORFs 3 y 4) puede presentar pequeñas variaciones entre las diferentes especies virales del género.

1.2.2. Mecanismos de expresión genica

Mediante ensayos de traducción *in vitro* del RNA del CarMV en lisados de reticulocito de conejo se describieron todas las proteínas que codificaba el virus (Harbison y col., 1985; Carrington y Morris, 1985; 1986). El producto del ORF 5 se identificó como la CP del virus mediante experimentos de inmunoprecipitación (Harbison y col., 1985). De igual modo se confirmó que el ORF coterminal con el extremo 3´en el caso del PFBV codificaba para la CP (Berthomé y col., 1998). Tambien en el caso del HCRSV, mediante ensayos de traducción *in vitro* con RNA viral usando extractos de germen de trigo y posterior inmunoprecipitación con antisuero antiHCRSV se confirmó que la proteína p38 correspondía a la CP (Huang y col., 2000)

Se ha establecido que durante el ciclo de infección de los Carmovirus se producen dos RNAs subgenómicos (sgRNA) de aproximadamente 1.5 y 1.7Kb, coterminales con el extremo 3´terminal del genoma. El sgRNA más pequeño dirige la traducción de la CP, mientras que el más grande parece ser un RNA bicistrónico que dirige la traducción de las dos proteínas pequeñas centrales por mecanismos aún no caracterizados (Morris y Carrington, 1988; Russo y col., 1994).

Estudios de traducción *in vitro*, con extractos de planta infectadas con CarMV y con viriones, demostraron que las ORFs del extremo 5´proximal eran expresadas a partir del RNA genómico, mientras que una proteína de aproximadamente 10K y la proteína 38K eran expresadas a partir de dos sgRNA de aproximadamente 1,7 y 1,5Kb, respectivamente (Harbison y col., 1984; Carrington y Morris, 1986).

Northern de muestras de RNA de tejido infectado con MNSV mostraron la presencia de dos sgRNAs de aproximadamente 1.9 y 1.6 Kb, respectivamente. El genoma del MNSV sirve como molde para los productos de los ORFs 1 y 2, mientras que los ORFs 3 y 4 son expresadas por el subgenómico más grande y la proteína 42K (ORF 5) a partir del subgenómico más pequeño (Riviere y Rochon, 1990). Se ha

propuesto que el sgRNA de 1.9 Kb es más un RNA bicistrónico a partir del cual se sintetizan dos proteínas pequeñas de aproximadamente 7K, que la síntesis de una proteína pequeña y el producto de su lectura a través (Hacker y col., 1992).

También en el SgCV se han detectado dos sgRNAs de aproximadamente 1.6 y 1.4 Kb, siendo el primero de ellos el que dirigiría la síntesis de las proteínas 6K y 9K, y el segundo el que dirigiría la síntesis de la proteína 37K (Weng y Xiong, 1997). En el TCV, también existen dos sgRNAs de aproximadamente 1.7 y 1.45 Kb. El sgRNA de 1.45 Kb sirve como molde para la síntesis de la proteína 38K (Carrington y col., 1987), mientras que el más grande actúa como un RNA bicistrónico, sirviendo de molde para la síntesis de las proteínas 8K y 9K (Hacker y col., 1992). Para el sgRNA de 1.45 Kb, se ha demostrado la existencia de zonas 5´y 3´UTRs, cuya interacción tiene un efecto sinérgico en la traducción de la CP (Qu y Morris, 2000).

Recientemente, en el HCRSV, se ha puesto de manifiesto que la proteína 38K tambien puede ser expresada a partir del RNA genómico, aunque la eficiencia en la traducción es 10 veces menor que a partir de los RNAs subgenómicos (Huang y col., 2000).

Los sgRNAs del CarMV, SgCV y HCRSV se sintetizan y encapsidan *in vivo* (Morris y Carrington, 1988; Weng y Xiong, 1997; Huang y col., 2000), mientras que los sgRNAs de los virus TCV y MNSV se encapsidan muy poco o nada en absoluto (Riviere y Rochon, 1990; Wei y col., 1990, 1992). Y más inusual, en las infecciones con CCFV no se ha detectado subgenómicos (Skotnicki y col., 1993).

1.2.3. Función de las proteínas codificadas por el virus

El papel de los productos de los genes en la replicación, encapsidación y movimiento de los Carmovirus se ha estudiado principalmente en el TCV, mediante experimentos de análisis mutacional (Heaton y col., 1991; Hacker y col., 1992).

1. Proteínas 28K y 88K

Se ha demostrado para el TCV que sólo se requieren los productos de los ORFs 1 y 2 para la replicación del genoma y ambos productos han de expresarse *in vivo* para que se produzca la infección (Hacker y col., 1992; White y col., 1995).

Al igual que la proteína 92K de los Tombusvirus, la replicasa putativa del TCV y de otros Carmovirus (ej. 86K del CarMV), obtenida por lectura a través (88K) contiene en su secuencia motivos característicos de las RNA polimerasas y dos motivos de la helicasa de ácidos nucleicos (Habili y Symons, 1989). Aunque la función de la proteína de replicación más pequeña (p28) no se conoce (Hacker y col., 1992), se sabe que juega un papel esencial en la replicación (White y col., 1995). Los niveles de acumulación de la proteína de replicación p28 detectados *in vivo* son mucho mayores que los de la proteína que se obtiene como consecuencia de la lectura a través del codón de parada débil (p88), lo que parece indicar que esta lectura a través es muy ineficiente, aunque suficiente para que se produzcan pequeñas cantidades de p88 requeridas para la replicación del genoma del TCV (White y col., 1995). Aunque en un principio se sugirió que el nivel de expresión de la proteína 88K del TCV dependía del mantenimiento de una estructura en forma de tallo que se forma alrededor del codón de terminación débil del gen de la replicasa (Wei y col., 1992), estudios posteriores sugieren que este segmento de RNA probablemente no está modulando la lectura a través de este codón débil, ni por tanto la síntesis de la p88, sino que más bien está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del RNA y/o forma parte de un elemento de replicación que actúa en cis (White y col., 1995). Este estudio también pone de manifiesto, que mutantes no viables del TCV con mutaciones, bien en el gen de la p28 o bien en el gen de la proteína que se obtiene por lectura a través, p88, pueden complementarse mutuamente permitiendo la replicación del RNA viral (White y col., 1995).

2. Proteínas 8K y 9K

En general, son relativamente escasos los estudios sobre la estructura y función de estas pequeñas proteínas de los Carmovirus. No se han encontrado en ellas los motivos de amino ácidos descritos en las MPs de otros taxones de virus (Koonin y col., 1991). Mediante estudios de mutantes defectivos en la expresión de las proteínas 8K y 9K, se ha demostrado su homología funcional con las proteínas de movimiento (Hacker y col., 1992). Recientemente, se ha puesto de manifiesto, mediante el uso de dichos mutantes y de plantas transgénicas transformadas con las secuencias de las proteínas 8K y 9K, que los genes que codifican las proteínas de movimiento de los Carmovirus deben actuar en trans en la misma célula para mediar el movimiento célula a célula (Li y col., 1998). Estudios de fusión de las MPs del TCV con la GFP han puesto de manifiesto una localización citoplasmática para la p9 y una localización nuclear para la p8. Los análisis de secuencia de la p8 han revelado dos señales de localización nuclear (NLSs), las cuales no se presentan en las P8 homólogas de otros Carmovirus, y no son necesarias para el movimiento célula a célula, sugiriéndose otra función desconocida para esta proteína en el núcleo de la célula (Cohen y col., 2000b).

Recientemente, se ha expresado en *E. Coli* la proteína 7K del CarMV fusiónada a una secuencia de seis histidinas que ha posibilitado su purificación. Se han demostrado sus propiedades de unión a RNA y se ha mapeado su dominio de unión en una secuencia de 19 residuos de aminoácidos (Marcos y col., 1999). Estos 19 aas adoptan una estructura en α-hélice anfipática que definen un posible nuevo dominio de unión a RNA (Vilar y col., 2001).

3. Proteína de cubierta (CP)

Además de su obvio papel estructural, la CP de los Carmovirus participa en otros procesos relevantes del ciclo viral. Así, se ha demostrado que los viriones del TCV se requieren para el movimiento a larga distancia, mientras que el movimiento célula a

célula puede ocurrir en ausencia de CP en algunos huéspedes, pero no en otros. A esta conclusión se ha llegado mediante análisis mutacional de la CP. Así, mutantes completos o parciales de la CP, se replicaban sólo en protoplastos o en hojas inoculadas de *B. Campestris* (huésped sistémico) o *Chenopodium amaranticolor* (huésped de lesiones locales), pero no podían invadir sistémicamente la planta. En experimentos similares realizados en *N. benthamiana*, la replicación era defectiva incluso en la hoja inoculada. (Heaton y col., 1991 y Hacker y col., 1992).

También se ha descrito que la CP de muchos virus de plantas poseen unos sitios de unión a cationes divalentes, particularmente el calcio. La sustitución de dos de los aminoacidos que interaccionan directamente con los iones calcio en la cápsida del TCV, llevaba consigo una disminución en la capacidad para moverse célula a célula, sugiriéndose que la CP juega un papel importante en las interacciones en el movimiento célula a célula (Laakso y Heaton, 1993).

En el caso de los Tombusvirus la presencia de viriones no es necesaria para el movimiento célula a célula, y dependiendo del huésped tampoco es un requerimiento estricto para el movimiento a larga distancia, por lo que se establecerían unas diferencias con los Carmovirus, si se generalizan los resultados obtenidos para el TCV a otros Carmovirus (Russo y col., 1994).

1.2.4. Efectos citopatológicos

Las alteraciones citopatológicas de los Carmovirus no han sido extensamente estudiadas y comparadas, por lo que no se pueden establecer generalidades para este grupo (Francki y col., 1985) a diferencia de lo que ocurre con los Tombusvirus. En este último grupo se han descrito efectos citopatológicos característicos como son la inducción de membranas, la presencia de cuerpos multivesiculares membranosos con vesículas periféricas en el citoplasma de las células infectadas, infección y/o alteración del núcleo, y la acumulación de virus en una especie de burbuja dentro de la vacuola,

que procede de una estrangulación del citoplasma hacía el interior de la vacuola (Martelli, 1981; Francki y col., 1985; Morris y Carrington, 1988).

La infección en Tombusvirus puede alterar la ultraestructura de mitocondrias, cloroplastos y núcleo en diferente grado, y las partículas virales pueden encontrarse en estas organelas dependiendo del virus, del huésped y probablemente de las condiciones ambientales (Martelli y col., 1977). El rasgo más característico de las células infectadas con Tombusvirus es el desarrollo de cuerpos vesiculares en el citoplasma. En un principio se pensó que estas estructuras se formaban a partir del retículo endoplasmático y dictiosomas (Russo y Martelli, 1972); más tarde se sugirió que derivaban o estaban asociados a cloroplastos (Appiano y col., 1978). Sin embargo, otros estudios indican que proceden de microcuerpos y mantienen la actividad enzimática del microcuerpo, lo que se ha demostrado en células infectadas con el *Virus de las manchas en anillo del Cymbidium* (CyRSV), el *Virus del arrugamiento moteado de la berenjena* (EMCV) y el *Virus del enanismo ramificado del tomate* (TBSV) (Russo y Martelli, 1972; Makkouk y col., 1981; Hatta y col., 1983; Russo y col, 1983).

El papel de los cuerpos multivesiculares no está claro, aunque se ha sugerido que están implicados en la replicación ya que contienen fibrillas que pudieran ser ácidos nucleicos (Martelli, 1981; Russo y col, 1983). Además se ha comprobado en infecciones del TBSV que los cuerpos multivesiculares aparecen algunas horas antes de la primera detección de partículas virales, lo cual es esperable si tienen un papel precursor (Appiano y col., 1981).

En cuanto a los Carmovirus, las observaciones estructurales han mostrado que las partículas se acumulan a una concentración alta en el citoplasma de las células infectadas, que las hace ser fácilmente reconocidas, aunque usualmente no forman agregados cristalinos (Robleda, 1973). Sólo se han descrito cristales de partículas virales en células infectadas con HCRSV y en las raíces de plantas infectadas con TCV (Morris y Carrington, 1988). Los cuerpos de inclusión tampoco son comunes y sólo en

el caso del PLPV se ha descrito que induce cuerpos de inclusión citoplasmáticos que contienen partículas virales embebidas en una matriz (Stefanac y col., 1982). Se han descrito inclusiones citoplasmáticas fibrilares en tejidos infectados con el CuSBV (Koenig y col., 1983).

En varios Carmovirus se han observado cuerpos multivesiculares similares a los descritos para Tombusvirus, tales como los que proceden de peroxisomas vesiculados asociados con cloroplastos en la infección por el GMoV (Behncken y Dale, 1984). En células infectadas con HCRSV se han observado peroxisomas similares vesiculados e hinchados, menos parecidos a los cuerpos multivesiculares (Morris y Carrington, 1988). En otros casos, los cuerpos multivesiculares son de origen mitocondrial con vesiculación periférica llamativa, como los observados en plantas infectadas con TCV (Russo y Martelli, 1982) y con GaMV (Hatta y col., 1983). La proliferación de las vesículas citoplasmáticas se ha observado en infecciones del NTNV (Mowat y col., 1976), BMoV (Scott y Hoy, 1981), y CuSBV (Koenig y col., 1983).

Una característica común observada en la mayoría de estos virus (BMoV, CuSBV, GaMV, HCRSV, SgCV, y TCV) es la falta de partículas asociadas con el núcleo. Sin embargo, se han observado partículas en las proximidades del nucleolo en el CarMV (Robleda, 1973) y GMoV (Behncken y Dale, 1984). Otra característica asociada a unos pocos Carmovirus, es la localización de estos virus en el interior de la vacuola, como es el caso del TCV (Russo y Martelli, 1982), y del HCRSV (Waterworth, 1980), mientras que el NTNV aparece embebido en una matriz vacuolar (Mowat y col., 1976). Sólo en el caso del GMoV, se describen estrangulaciones del citoplasma dentro de la vacuola, que es más típico de Tombusvirus (Martelli, 1981).

1.3. EL VIRUS DEL MOTEADO DEL CLAVEL (CarMV)

El cultivo del clavel se ve particularmente afectado por una serie de enfermedades de origen viral entre las que cabe destacar la ocasionada por el *Virus del moteado del clavel* (Pallás y col., 1999). El CarMV fue descrito por Kassanis (1955) y más tarde estudiado por Hollings y Stone (1964) y Kemp (1964). Es el miembro tipo del grupo de los Carmovirus (Morris y Carrington, 1988). Generalmente reconocido como un importante componente de las enfermedades complejas de virus que afectan a las cosechas de todo el mundo. Resulta ser pues un virus de extraordinaria repercusión económica. Los principales efectos de este virus son la intensificación de los síntomas provocados por otras virosis (Smookler y Loebenstein, 1975; Devergner, 1984).

1.3.1. Propiedades biológicas y transmisibilidad

La gama de huéspedes naturales del CarMV está generalmente restringida a miembros de las *Caryophyllaceae* y especialmente a las especies del género *Dianthus L.*, en las cuales sólo produce un suave moteado o es asintomático (Hollings y Stone, 1970). El CarMV se encuentra mundialmente distribuido en los cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus*). La incidencia de este virus en las plantaciones comerciales ha sido objeto de muchas investigaciones (ej. Brierley y Smith, 1957; Smookler y Loebenstein, 1975; Makkouk y Shabab, 1980; Lommel y col., 1982; Cano y col., 1994). Aunque ha sido frecuentemente descrito como un virus asintomático, varios estudios han demostrado que la infección puede tener un efecto perjudicial en la producción de flor cortada. Este efecto puede ser particularmente importante cuando el CarMV se encuentra en infecciones mixtas con otros virus, ya que este virus tiene un efecto sinérgico (Brierley, 1964; Hakkaart, 1964; Hollings y col., 1977). En concreto, produce una disminución del vigor de las plantas, el descenso en la producción de las flores y pérdidas importantes durante el enrraizamiento de los esquejes (Brige y col., 1990; Batllè y Laviña, 1992). En los cultivares rojos de clavel se ha atribuido al virus una

atenuación del color de los pétalos que tiene lugar a temperaturas bajas (Devergne, 1988). Cuando el virus actúa en combinación con el *Virus del anillo del grabado del clavel* (CERV) o el *Virus del moteado de las venas* (CVMV), el moteado y la clorosis son muy severas, conduciendo en ocasiones a la necrosis y muerte de la planta (Barberet y Blanc, S.A.).

Es el virus más extendido en los cultivos de *Dianthus. L* (Brige y col., 1990). En un muestreo realizado en la zona del maresme (Cataluña) en los meses de junio de 1988 y 1989 se comprobó que el 79% y 85% respectivamente de las variedades analizadas presentaban un nivel más o menos alto de virus (Batllè y Laviña, 1992). En California se demostró una incidencia de hasta un 78% en la producción de flor de invernadero (Lommel y col., 1982) e incluso se había descrito una incidencia del 100% (Hollings y col., 1977; Makkouk y Shahab, 1980).

El CarMV es un virus de gran poder infectivo, de transmisión rápida, que se mantiene por propagación vegetativa (Zandwort, 1973) por lo que es necesario un riguroso control en la manipulación de los esquejes de clavel, y a pesar de la termoterapia y el cultivo de meristemos apicales es el virus más difícil de eliminar (Maia y col., 1969; Hollings y col., 1972). Esta es una de las principales razones por las que la legislación de la UE considera la ausencia del CarMV como el principal indicador fitosanitario de las enfermedades virales en clavel.

El CarMV también se ha descrito en *Daphne spp.*, *Lactuca* y posiblemente *Ranunculus* (Morris-Krsinich y Milne, 1977). Además, se ha demostrado que las plantas silvestres constituyen un considerable reservorio potencial del CarMV. Estudios realizados en zonas de cultivo de clavel de la Región de Murcia, mostraron que la familia Compositae era la más afectada por este virus (52,63% del total de especies infectadas) de entre todas las plantas silvestres analizadas (Cano y col., 1994).

En cuanto a los huéspedes experimentales se ha descrito que incluye unas 30 especies en 15 familias de plantas, las más utilizadas pertenecen a las familias *Caryophyllaceae* y *Chenopodiaceae*, en las que el CarMV se trasmite fácilmente por inoculación mecánica (Morris y Carrington, 1988; Sánchez-Navarro y col., 1996). *Chenopodium quinoa* es el indicador biológico del CarMV más utilizado en los métodos de diagnosis biológicos (Devergne y col., 1982), por ser un huésped de lesiones locales y de fácil propagación. Las lesiones se manifiestan como manchas cloróticas localizadas que son visualizadas a los 4-7 días post-inoculación (dpi). En algunos casos se ha descrito infección sistémica acompañada de moteado, además de deformación en algunas hojas (Hollings y Stone, 1970). Este bioensayo permite detectar al menos 0.01 ng de virus/ml, permitiendo revelar la llamada "forma atenuada" de infección (Sánchez-Navarro y col., 1996). Otro indicador biológico descrito como un excelente huésped del CarMV es *Saponaria vaccaria* (Hakkaart y van Olphen, 1971), y aunque se describe como más sensible que *C. quinoa* (25 veces más), probablemente porque pertenece a la misma familia que el clavel (*Caryophyllaceae*), tiene el inconveniente de que requiere períodos más largos de incubación (Sánchez-Navarro y col., 1996). Sin embargo, los métodos de diagnóstico del CarMV más usados, para ensayos sistemáticos a gran escala, son los basados en las propiedades serológicas de las proteínas virales (test ELISA) dada su facilidad y sensibilidad (1ng/ml), aunque tienen el inconveniente de que no detectan la forma atenuada (Devergne y col., 1982; Sánchez-Navarro y col., 1996). Recientemente se han desarrollado métodos alternativos basados en la hibridación molecular no radiactiva con los que se ha obtenido una sensibilidad (0,64 ng/ml) muy similar a la del bioensayo de *C. quinoa* (Sánchez-Navarro y col., 1996). Estos métodos permiten además la detección simultánea de los principales virus del clavel lo que conlleva un considerable ahorro de tiempo y dinero (Sánchez-Navarro y col., 1999).

El CarMV se transmite fácilmente por vía mecánica, al realizar pinzados y recolectar la flor (Devergne, 1988; Batllè y Laviña, 1992) y por *Aphis gossypii* (Singh y Singh, 1989). Los intentos de transmisión por semilla han sido hasta ahora

infructuosos. En la bibliografía también aparecen referencias sobre la presencia del CarMV en las aguas de canales de zonas de cultivo (Koenig y Lesemann, 1985; Koenig y col., 1989; Yi y col., 1992). Esto ha llevado a pensar en la posible implicación de las aguas de drenaje en la transmisión del virus (Cano y col., 1994). Recientemente se ha demostrado su presencia en estas aguas y en aguas de riego mediante análisis por RT-PCR (Sánchez-Navarro, Cano y Pallás, resultados no publicados).

1.3.2. Propiedades del virión, estructura y organización genómica.

El CarMV es un virus muy resistente, el punto de inactivación térmica del virus es de 90ºC (10 min) aunque a 65ºC pierde mucha infectividad. La infectividad sobrevive durante 70 días a 20ºC y la forma atenuada es recuperable después de 13 meses. El virus obtenido del jugo liofilizado de *Dianthus barbatus*, almacenado a temperatura de laboratorio, al vacío, mantuvo la infectividad durante más de 10 años (Hollings y Stone, 1970).

El CarMV es un virus isométrico de 30 nm de diámetro que posee un genoma monopartito de sentido positivo de aproximadamente 4.0 Kb (masa molecular aproximada 1.4 x10) (Morris y Carrington, 1988). La secuencia completa del CarMV consta de 4003 nucleótidos (Guilley y col., 1985). Su cápsida está compuesta de 180 copias de la misma proteína con una masa molecular de 37.787, distribuidas en un sistema icosaédrico T=3.

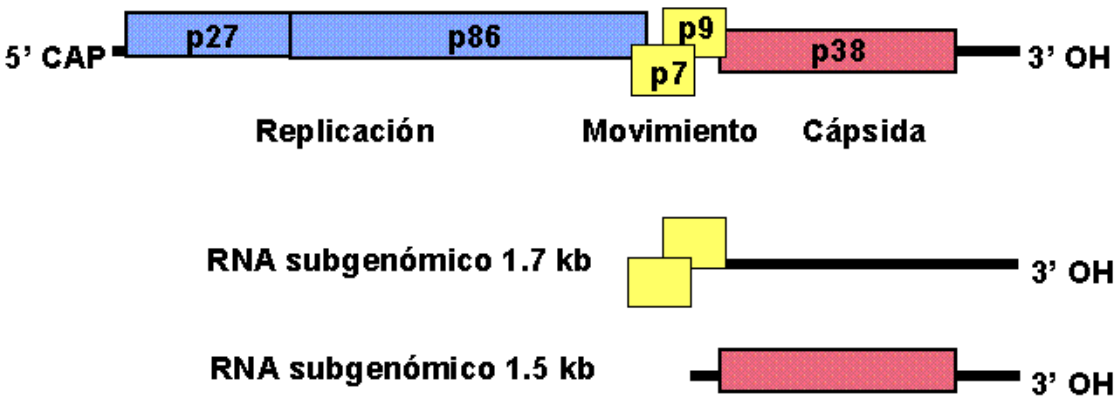


FIGURA 4. Representación esquemática de la organización y expresión del genoma del CarMV

El análisis de la secuencia del genoma del CarMV (Fig. 4) muestra la presencia, característica de los carmovirus, de cinco marcos de lectura abierta (ORF) ("open reading frames") que codifican las proteínas de 27 (p27), 86 (p86), 7 (p7), 9 (p9) y 38 (p38) kDas. Se cree que el ORF más cercano al extremo 5´ (p27) y su producto de lectura a través ("read through") (p86), son esenciales para la replicación del genoma, por homología con el TCV (White y col., 1995). El ORF más próximo al extremo 3´ codifica para la CP de 38-kDa (Morris y Carrington 1988; Russo y col., 1994). Las dos proteínas pequeñas (p7 y p9) se supone, como se ha demostrado para el TCV (Hacker y col., 1992; Li y col., 1998), que se requieren para el movimiento célula a célula, y se ha demostrado en el caso de la p7 que tiene propiedades de unión a RNA (Marcos y col., 1999; Vilar y col., 2001).

1.4. MOVIMIENTO VIRAL EN LA PLANTA INFECTADA

La importancia de una determinada virosis viene condicionada por la capacidad del virus de invadir sistémicamente la planta. Esta invasión sistémica depende tanto de su capacidad para replicarse en las células inicialmente infectadas como del movimiento a corta o a larga distancia (Dawson y Hilf, 1992; Lucas y Gilbertson, 1994).

El ciclo infectivo viral en una planta huésped susceptible de infección, se inicia en la mayoría de los casos, con la entrada del virus en las células de la epidermis o del mesófilo, a través de las heridas producidas mediante inoculación mecánica o con la ayuda de vectores biológicos (insectos, nemátodos, hongos, etc.). Tras replicarse en estas primeras células, el virus invade las células vecinas a través de un movimiento a corta distancia, o también denominado movimiento célula a célula, hasta alcanzar el sistema vascular, donde el virus es transportado al resto de la planta, constituyendo el movimiento a larga distancia (Maule, 1991) (Fig. 5). El movimiento célula a célula es un proceso activo en el que están implicadas las proteínas de movimiento (MPs) que son proteínas no estructurales que codifica el virus (Lucas y col., 1990; Citovsky, 1993; Lucas y Gilbertson, 1994). La mayoría de los virus se mueven por el sistema vascular junto al flujo del fotoasimilado vía floema (Leisner y Turgeon, 1993; Lucas y Gilbertson, 1994), aunque también se ha descrito el movimiento a través del xilema en aquellos virus transmitidos por escarabajos (Gergerich y Scott, 1988; Hull, 1989). En el caso del *Virus de las hojas en forma de cordón del arándano* (BBSSV), transmitido por áfidos utiliza tanto la vía xilemática como la floemática (Urban y col., 1989). Está establecido que la interacción entre el virus y determinados factores del huésped, juega un papel importante en determinar si un virus puede moverse o no en unas especies determinadas de plantas (Dawson y Hilf, 1992).

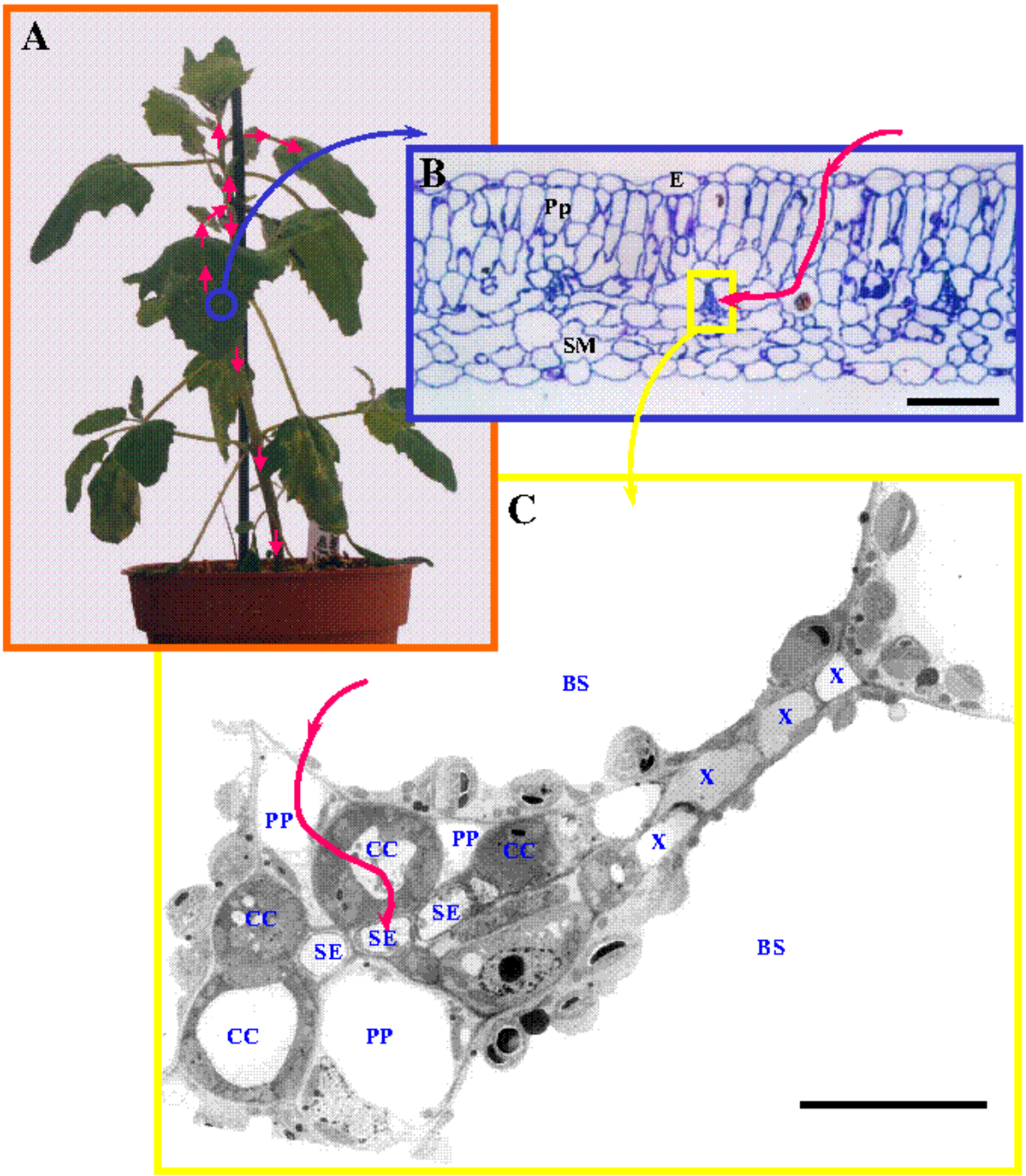


FIGURA 5. Representación esquematica del movimiento viral. (A), planta de *Chenopodium quinoa* infectada con CarMV. Las flechas representan el movimiento a larga distancia del virus. **(B)**, detalle al microscopio óptico de una sección de hoja de *C. quinoa*, donde se observan los distintos tipos célulares (epidermis **(E)**, parénquima en empalizada **(Pp)** y mesófilo lagunar **(SM)**) y varias venas menores. Con las flechas se representa el movimiento célula a célula del virus, desde su entrada en la epidermis **(E)** tras la inoculación hasta su entrada en las células de la vena menor (recuadro amarillo). Barra=100 µm. **(C)**, Detalle al MET de una vena menor de hoja de *C. quinoa,* donde se observan las células del parénquima floemático **(PP)**, células acompañantes **(CC)**, elementos conductores del floema **(SE)** y del xilema **(X)**. Las flechas representan el movimiento del virus célula a célula hasta alcanzar los SEs, comenzando así su movimiento a larga distancia. Barra= 10 µm.

1.4.1. Movimiento a corta distancia (célula a célula)

Las paredes rígidas que rodean las células vegetales constituyen una barrera física para la entrada del virus vía endocitosis mediada por receptores, o vía fusión de membranas, que son los dos mecanismos más comunes utilizados por los virus animales. Por ello, el movimiento viral entre células adyacentes parece realizarse utilizando las conexiones intercelulares de la planta, denominadas plasmodesmos, que permiten el paso de pequeñas moléculas e iones entre células contiguas (Robards y Lucas, 1990, Lucas y Gilbertson, 1994; Carrington y col., 1996). Estudios recientes han demostrado que los plasmodesmos también pueden mediar el transporte célula a célula de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos de origen viral (Fujiwara y col., 1993; Noueiry y col., 1994; B. Ding y col., 1995; Waigmann y Zambryski, 1995; Nguyen y col., 1996; Canto y col., 1997; Ding, 1997; Itaya y col., 1997; Rojas y col., 1997) y de la planta (Bostwick y col., 1992; Fisher y col., 1992; Nakamura y col., 1993; Sakuth y col., 1993; Jackson y col., 1994; Ishiwatari y col., 1995; Lucas y col., 1995; Schobert y col., 1995; Perbal y col., 1996; Balachandran y col., 1997; Clark y col., 1997; Kühn y col., 1997; Murillo y col., 1997). Estos descubrimientos indican que los plasmodesmos tienen un importante papel en la coordinación de los procesos fisiológicos y de desarrollo a nivel transcelular (Ding y col., 1988; Lucas y col., 1993a; Lucas, 1995; Mezitt y Lucas, 1996; Ding, 1997; 1998; Jackson y Hake, 1997).

Un plasmodesmo simple es un poro recubierto por la membrana plasmática de las células que conecta. El centro del poro está ocupado por un retículo endoplasmático (RE) que pone en contacto los REs de las células adyacentes y que está recubierto por extensiones regulares de partículas globulares proteicas (3 nm de diámetro). Este complejo membrana-proteína se denomina desmotúbulo. A su vez, el desmotúbulo está recubierto por otra hilera de partículas globulares proteicas (3nm de diámetro) que conectan mediante estructuras filamentosas con las proteínas del desmotúbulo. Además, partículas globulares están embebidas en la cara interna de la membrana plasmática. El pequeño espacio (2.5 nm en diámetro, en tabaco) existente

entre estas dos últimos capas de proteínas constituyen los microcanales acuosos a través de los cuales ocurre el transporte (Ding y col., 1992b). La función de estas proteínas es desconocida pero posiblemente regulen el tamaño de los microcanales por cambios en sus posiciones dentro del plasmodesmo (Citovsky, 1993).

Se ha estimado el límite del tamaño de exclusión molecular (SEL) de los microcanales del plasmodesmo, como de 1.5 a 2 nm en diámetro (750-1000 D) dependiendo de la especie de planta (Terry y Robards, 1987; Wolf y col., 1989). Por tanto este tamaño es más pequeño que el de las partículas virales (10-80 nm en su dimensión más estrecha) o que incluso el ácido nucleico desnudo plegado (10 nm para el RNA del TMV) (Gibbs, 1976). Por ello, el plasmodesmo debe ser modificado durante la infección viral para que la prole viral pueda moverse célula a célula. Para la mayoría de los virus de plantas, si no todos, se asume que este proceso está mediado por proteínas no estructurales codificadas por el virus, denominadas proteínas de movimiento (MPs) (Fenczik y col., 1996; Gilbertson y Lucas, 1996; Oparka y col., 1997). A estas MPs se les ha asignado varias funciones, como son la capacidad de unión a cadenas simples de RNA (Citovsky y col., 1990; 1991; 1992; Osman y col., 1992, Schoumacher y col., 1992; 1994; Li y Palukaitis, 1996), unión a receptores (o sitios diana) en los plasmodesmos (Tomenius y col., 1987; Epel y col., 1996; Oparka y col., 1997; Blackman y col., 1998), y modificación del SEL de los plasmodesmos (Wolf y col., 1989; Derrick y col., 1990; 1992; Ding y col., 1992a; Waigmann y Zambryski, 1995; Angell y col., 1996; Oparka y col., 1997). Se especula que las modificaciones de la estructura de los plasmodesmos pueden estar limitadas a simples reajustes, y/o pérdida de alguno de sus componentes estructurales o por modulaciones de su diámetro en la región reguladora que controla el paso de las moléculas a través del plasmodesmo (Deom y col., 1992). El mecanismo de alteración estructural es desconocido, pero parece que pudieran estar implicadas reacciones de fosforilación-desfosforilación (Citovsky y col., 1993). De hecho, la capacidad del TMV para moverse célula a célula es dependiente de los niveles intracelulares de cAMP, mientras que estos niveles no afectan a la replicación (Atabekov y Taliansky, 1990)

Sin embargo, en contradicción con el dogma de que el plasmodesmo posee un SEL menor de 1 kDa para permitir que las moléculas puedan moverse libremente entre las células de la planta (Tucker, 1982; Goodwin, 1983; Erwee y Goodwin, 1985; Terry y Robards, 1987; Burnell, 1998), se ha demostrado que proteínas con una Mr superior a 50 kDa en hojas sumidero son capaces de atravesar libremente los plasmodesmos (Imlau y col., 1999; Oparka y col., 1999). Durante la transición sumidero-fuente de la hoja ocurren determinados cambios fisiológicos de manera que la hoja deja de importar fuente de carbono para convertirse en exportadora. Esta transición también va acompañada de unos cambios estructurales de los plasmodesmos que pasan de ser simples a ramificados. Los plasmodesmos ramificados que aparecen en las hojas fuente son los que constituyen un centro de control que determina qué tipo de moléculas pueden entrar al floema (Oparka y Turgeon, 1999), mientras que los plasmodesmos simples permitirían una salida indiscriminada del floema en las hojas sumidero facilitando una rápida entrada de macromoléculas a la hoja en crecimiento. A pesar de ello, experimentos en hojas sumidero de tabaco con una contrucción del *Virus X de la patata* (PVX) que posee una proteína de movimiento defectuosa, demostraron que la GFP libre podía atravesar los plasmodesmos simples, pero no el RNA viral. La interacción entre el RNA viral y la MP era requerida en los plasmodesmos simples antes de que ocurriera el movimiento del genoma viral (Oparka y col., 1999).

Aunque el RNA viral no se mueva a través de los plasmodesmos simples en las hojas sumidero, otras observaciones no excluyen la posibilidad de que moléculas de RNA pequeñas (<50 kDa) puedan hacerlo, ya que durante el fenómeno de silenciamiento adquirido sistémicamente, una señal sistémica es transmitida desde las hojas fuente a las hojas sumidero induciendo el silenciamiento de genes en las células de la hoja sumidero (Voinnet y Baulcombe, 1997; Jorgensen y col., 1998). La naturaleza de esta señal es desconocida, pero se ha sugerido que podrían ser RNAs de pequeño tamaño (~25 nt) relacionados con el transgen (Jorgensen y col., 1998).

Las MPs codificadas por diversas familias de virus son funcionalmente intercambiables en muchos casos (DeJong y Ahlquist, 1992; Giesman-Cookmeyer y col., 1995). Así, un virus o una estirpe de virus incapaz de moverse en un determinado huésped puede ser complementado en una coinfección con un virus no relacionado que sí es capaz de moverse en dicho huésped (Atabekov y Taliansky, 1990). El *Virus del mosaico del bromo* (BMV) adquiere la capacidad de moverse en tomate cuando es coinoculado con el TMV (Taliansky y col., 1982). Esta complementación sugiere que virus diferentes pueden seguir pautas comunes en el movimiento intercelular (Carrington y col., 1996). El análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de movimiento de un gran número de grupos diversos de virus de plantas, revelan una significativa relación entre miembros de grupos taxonómicos distintos y predicen un origen común en la evolución para esas proteínas (Melcher, 1990; Koonin y col., 1991).

En algunos virus también se ha descrito la necesidad de la CP para facilitar el movimiento célula a célula (Ver revisión de Gilbertson y Lucas, 1996; van der Kuyl y col., 1991a, b; van der Vossen y col., 1994). Este es el caso del *Virus del mosaico del pepino* (CMV) (Suzuki y col., 1991), el *Virus del grabado del tabaco* (TEV) (Dolja y col., 1994, 1995) y varios potexvirus (Chapman y col., 1992a; Forster y col., 1992, Sit y AbouHaidir, 1993; Rouleau y col., 1994). Sin embargo, el papel preciso de la CP en el proceso del movimiento y si ésta actúa de forma independiente o en cooperación con la MP es desconocido. Para el PVX, que requiere la CP para el movimiento célula a célula (Chapman y col., 1992a, b; Baulcome y col., 1995), se ha demostrado que la CP no juega un papel activo en la modificación del plasmodesmo (Santa Cruz y col., 1998).

A) Mecanismos de dispersión viral a corta distancia

Se han descrito dos tipos principales de mecanismos para el movimiento a corta distancia: el tipo Tobamo, representado por el TMV, en el que gran número de unidades de MP se unen al RNA viral para formar un complejo ribonucleoproteico desencapsidado que después interaciona con el plasmodesmo incrementando su

tamaño de exclusión molecular (SEL) (Wolf y col., 1989). En un segundo mecanismo, el tipo Como, representado por el *Comovirus del mosaico de la carilla* (CPMV), el virus se mueve como virión a través de una modificación extensiva del plasmodesmo o vía síntesis de novo de estructuras tubulares (van Lent y col., 1991).

1- Mecanismo tipo Tobamo

Una de las MPs mejor estudiadas es la proteína de 30K (P30) del TMV. El estudio de sus propiedades ha permitido postular un mecanismo de dispersión viral célula a célula a modo de complejo ribonucleoproteico que es transportado a través del plasmodesmo (Citovsky, 1993; Citovsky y Zambryski, 1995; Zambryski, 1995; Oparka y col., 1997). Se sabe que la MP del TMV tiene la capacidad de unión a ácidos nucleicos de simple cadena de manera cooperativa y no específica de secuencia, con un sitio mínimo de unión de 4-7 nucleótidos por monómero de MP (Citovsky y col., 1990; 1992). Las micrografías electrónicas de estos complejos formados in vitro mostraron que la P30 se une a la molécula de ácido nucleico desplegado formando unos complejos largos y delgados, de 2.0-2.5 nm en diámetro (Citovsky y col., 1992). Una propiedad similar de unión a ácidos nucleicos fue inmediatamente descrita para las MPs del *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), CMV y el *Virus del mosaico necrótico del clavel rojo* (RCNMV) (Osman y col., 1992; Schoumacher y col., 1992; Giesman-Cookmeyer y Lommel, 1993; Li y Palukatis, 1996). Sin embargo, el complejo MP/RNA del RCNMV mantiene una considerable estructura secundaria, en la que la MP está unida a regiones plegadas de la cadena simple de RNA (Fujiwara y col., 1993).

Se ha observado la interacción de la MP del TMV con los elementos del citoesqueleto de protoplastos y de hojas de tabaco infectadas (Mclean y col., 1995; Heinlein y col., 1995; 1998; Más y Beachy, 2000). Muy probablemente, la MP y/o el complejo P30-RNA del TMV interacciona con el citoesqueleto en el citoplasma, y gradualmente se van soltando en respuesta a unas señales no identificadas para que suceda el transporte hacía el plasmodesmo (Ghoshroy y col., 1997). Una regulación

similar ha sido descrita en la entrada al nucleo del factor de transcripción NF-kB (Dingwall, 1991).

Una vez que el complejo llega al plasmodesmo, auque el tamaño estimado del complejo ribonucleoproteico (2.0-2.5 nm de diámetro) es relativamente pequeño (Citovsky y col., 1992), todavía es incompatible con el diámetro del plasmodesmo intacto (1.5 nm) (Wolf y col., 1989), por lo que se requiere una modificación del SEL del plasmodesmo. Se ha demostrado la unión de la MP del TMV a receptores (o sitios diana) en los plasmodesmos (Tomenius y col., 1987; Oparka y col., 1997). Se sabe que la región de alta variabilidad (posición 130-213) del extremo carboxy-terminal de la MP del TMV, un dominio rico en aminoacidos básicos (Saito y col., 1988), es esencial para la interacción con el plasmodesmo (Berna y col., 1991; Waigmann y col., 1994). Este dominio probablemente contiene dos motivos, uno implicado en la unión a receptores del plasmodesmo y un segundo motivo que interacciona con proteínas del plasmodesmo, posiblemente con una especifidad de huésped, produciendo un incremento del SEL del plasmodesmo (Waigmann y col., 1994). Se ha descrito una región similar a ésta de unión a sitios diana en el plasmodesmo para la MP del RCNMV (Fujiwara y col., 1993). Ciertos experimentos han puesto de manifiesto que las MP virales y las proteínas endógenas de la planta interaccionan con un receptor plasmodesmico común (Kragler y col., 1998). También se ha descrito que la MP del TMV puede moverse por ella misma a través de los plasmodesmos para inducir un aumento del SEL en células del mesófilo alejadas (Waigmann y col., 1994). Alternativamente se ha propuesto que la P30 induzca una señal intracelular en lugar de su movimiento célula a célula (Waigmann y Zambryski, 1995).

Una vez que el complejo entra en el plasmodesmo no se sabe si el genoma es transportado como un complejo ribonucleoproteico estable o como un complejo dinámico, en el cual las subunidades de la MP se unen y separan del genoma. Así mismo, el mecanismo que gobierna la liberación o entrega del complejo transportado en las células adyacentes está poco claro (Carrington y col., 1996). Se ha postulado que

una vez en la célula adyacente se produciría el desensamblaje del complejo, posiblemente por un mecanismo similar a la desencapsidación de las partículas virales. Otra alternativa, es que las MP quedaran asociadas a las subunidades del canal, quedando libre la cadena de RNA viral y por tanto la MP permanecería asociada al plasmodesmo manteniendo alterada su permeabilidad (Citovsky y Zambryski, 1991).

2- Mecanismo tipo Como

Un segundo mecanismo de movimiento célula a célula, que implica viriones enteros, es el utilizado por el comovirus CPMV (van Lent y col., 1991). Los estudios de microscopía electrónica de plantas infectadas con CPMV mostraron que las células de tejidos infectados contenían en su interior estructuras tubulares que se extendían sobre la pared celular. Estos túbulos eran muy semejantes a plasmodesmos extendidos y contenían una hilera simple de viriones icosaédricos que parecían moverse de una célula a otra (van Lent y col., 1990; 1991).

El CPMV codifica para dos proteínas de movimiento (58k y 48k) y dos proteínas de cubierta, las cuales son requeridas para el movimiento célula a célula, indicando que el CPMV es transportado como partícula viral (Wellink y Van Kammen, 1989). Aunque estudios de inmunolocalización demuestran que las MPs y las CPs del CPMV están presentes en estas estructuras, los análisis mutacionales muestran que sólo las MPs son necesarias para la formación de los túbulos (van Lent y col., 1990; Kasteel y col., 1993). No está establecido si la CP está asociada a los túbulos o pertenece a las partículas virales (Wellink y Van Kammen, 1989). Los resultados con el *Virus del enrollado de la hoja del cerezo* (CLRV) en la infección de tabaco demuestran la última posibilidad (Sanchez-Pina y col. 2000).

Estas estructuras se ensamblan en el citoplasma de la célula intacta y seguidamente se asocian y extienden muy probablemente a través de plasmodesmos, que parecen sufrir alteraciones, de manera que desaparece el desmotúbulo y las

subunidades proteicas globulares, mientras que la membrana plasmática permanece intacta (Maule, 1991; Dauber, 1992; Deom y col., 1992; Kim y Lee, 1992). Varios virus incluyendo comovirus (van Lent y col., 1990), caulimovirus (Linstead y col., 1988; Perbal y col., 1993), nepovirus (Wieczorek y Sanfaçon, 1993; Ritzenthaler y col., 1995b; Sánchez-Pina y col., 2000), tospovirus (Storms y col., 1995), *Badnavirus del moteado amarillo de la commelina* (CoYMV) (Cheng y col., 1998), y geminivirus (Kim y Lee, 1992) emplean un sistema de transporte célula a célula que implica la formación de túbulos, que se extienden entre el citoplasma de células adyacentes a través de las paredes celulares y/o plasmodesmos.

Una característica sorprendente de las MPs del CPMV, el *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV), *Tospovirus del bronceado del tomate* (TSWV), AMV, BMV y el *Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid* (GFLV), es su capacidad para inducir túbulos en protoplastos aislados y en células de insecto en cultivo. En ambos sistemas, la expresión de la MP resulta en unas protuberancias tubulares de más de 50 µm en longitud, que se extienden por la superficie de la célula (van Lent y col., 1991; Kasteel y col., 1993; 1996, 1997; Perbal y col., 1993; Wellink y col., 1993, Ritzenthaler y col., 1995b; Storms y col., 1995). Esto datos de protoplastos, implican que las MPs de algún modo inducen la formación de plasmodesmos, y no modifican los plasmodesmos ya existentes. Así, la aparición de túbulos no es dependiente de la presencia de pared celular, plasmodesmos u otros productos de genes virales (Perbal y col., 1993; Kasteel y col., 1996; 1997). La demostración de que se pueden inducir túbulos en células de insectos sugiere que las MPs interaccionan fundamentalmente con componentes celulares que están altamente conservados en los reinos animal y vegetal (Kormelink y col., 1994; Storms y col., 1995; Kasteel y col., 1996)

3- Otros mecanismos alternativos

Un mecanismo alternativo del movimiento célula a célula se ha descrito para varios potyvirus y potexvirus, incluyendo el TEV (Dolja y col., 1994), PVX (Oparka y col.,

1996) y el *Virus del moteado de las venas de tabaco* (TVMV) (Rodriguez-Cerezo y col., 1997). Estos virus requieren la CP para el movimiento célula a célula, pero la aparición de túbulos guiando las partículas a través del plasmodesmo no se ha descrito. Una característica de las infecciones con PVX es el incremento del SEL del plasmodesmo (Angell y col., 1996; Oparka y col., 1996). La única proteína del potexvirus que ha sido localizada en el plasmodesmo es la CP (Rouleau y col., 1995; Oparka y col., 1996b; Rodriguez-Cerezo y col., 1997), pero se ha demostrado que la CP del PVX no tiene un papel activo en la modificación del plasmodesmo (Santa Cruz y col., 1998), y son las proteínas TGB del PVX las implicadas en esta modificación (Angell y col., 1996; Santa Cruz y col., 1998). Sin embargo, estas proteínas no muestran localización plasmodésmica (Davies y col., 1993; Hefferon y col., 1997). Aunque el papel preciso de la CP en el movimiento célula a célula del PVX permanece desconocido, la presencia de material fibrilar en el plasmodesmo de células infectadas ha sugerido la posibilidad de que el movimiento intercelular del PVX requiera viriones (Allison y Shalla, 1974; Oparka y col., 1996; Santa Cruz y col., 1998).

También, cabe destacar casos de virus que utilizan más de un mecanismo de movimento célula a célula, como ocurre con el *Geminivirus del mosaico de la Euphorbia* (EMV), para el cual se ha demostrado que en los primeros estadíos de infección el virus utilizaría estructuras tubulares en la hoja inoculada, pero en estados más tardíos de la infección y en hojas sistémicas no se han observado estructuras tubulares y los plasmodesmos aparecen normales (Kim y Lee, 1992). Otro ejemplo, es el caso del CaMV, que usa un mecanismo de complejo ribonucleoproteico en las primeros estadíos de la infección y estructuras tubulares en etapas tardías (Mclean y col., 1993).

1.4.2. Movimiento a larga distancia

Los experimentos clásicos de Samuel (1934) mostraron el patrón de distribución sistémica del TMV en plantas de tabaco y tomate infectadas con el virus, revelando un

movimiento muy rápido del virus primero hacia las raíces y posteriormente hacia el ápice de la planta. Los trabajos posteriores realizados por Bennett (1940) parecían demostrar que la desfoliación total o parcial de una planta alteraba no sólo la distribución del fotoasimilado sino también el patrón de distribución del virus, demostrando que la dispersión viral estaba influenciada por el flujo de metabolitos en la planta. A su vez, los estudios realizados con el TRSV sugerían que el virus alcanzaba las partes más distales de la planta a través del sistema vascular, vía floema (Schneider, 1965).

Más recientemente, Leisner y Turgeon (1993) han puesto de manifiesto que el movimiento viral a larga distancia ocurre vía floema y sigue las pautas del transporte del fotoasimilado. El movimiento a larga distancia requiere que el virus sea capaz de entrar y salir de las células que constituyen el haz vascular, es decir: las células de la vaina (BS), células del parénquima floemático (VP), células acompañantes (CC), y los elementos conductores de la savia (SE) (Carrington y col., 1996). La susceptibilidad de una planta a una infección viral parece estar ligada a la capacidad de un virus de desarrollar funciones que le permitan el acceso al transporte a larga distancia del floema y por tanto al resto de la planta (Gilbertson y Lucas, 1996).

Aunque se conoce bastante sobre el movimiento célula a célula en el tejido del mesófilo, bastante menos se conoce sobre el transporte viral a través de las células del sistema vascular, especialmente los acontecimientos que ocurren en la entrada y salida de los elementos conductores de la savia, sobre todo por la dificultad de su estudio (Gilbertson y Lucas, 1996). En general, la ultraestructura de los plasmodesmos que interconectan las células de la vaina, parénquima floemático y células acompañantes es similar a los que conectan las células del mesofilo. Sin embargo, se sabe que los factores del huésped que interaccionan con las proteínas virales y ácidos nucleicos son diferentes a aquellos que están envueltos en el movimiento célula a célula, por lo que los mecanismos de transporte del movimiento célula a célula y a

larga distancia son distintos (Carrington y col., 1996; Gilbertson y Lucas, 1996; Nelson y van Bel, 1998).

A) Etapas del movimiento a larga distancia

El transporte a larga distancia de virus no restringidos al tejido floemático, es un proceso muy complejo que se puede dividir en varias etapas:

- Traslocación viral entre los tipos celulares asociados a la vena.
- Entrada del virus en los elementos conductores del floema.
- Transporte pasivo junto al fotoasimilado.
- Descarga floemática del virus.
- Nueva translocación viral célula a célula a través de las células asociadas al sistema vascular.

1- Entrada del virus al tejido vascular de la planta: Venas menores

Para que un virus pueda invadir sistémicamente una planta tiene necesariamente que entrar en su sistema vascular. Las venas menores están especializadas en la carga de azúcares para el transporte a larga distancia y por tanto probablemente sean la vía de entrada del virus en el floema (Leisner y Turgeon 1993; Gilbertson y Lucas, 1996). Elevadas concentraciones de azúcares han sido medidas directamente en los complejos células acompañantes-elementos conductores (CC–SE) de venas menores (Haritatos y col., 1996). Leisner y col. (1992) observan que el CaMV invade el sistema vascular a través de las venas menores. Otros estudios demuestran la acumulación de varios Tobamovirus y Potyvirus en venas menores de varios miembros de Solanáceas y Fabáceas (X.S. Ding y col., 1995, 1996, 1998). Además, estas venas menores constituyen más del 90% de la vasculatura total de una hoja en dicotiledóneas y por tanto podrían ser las primeras venas que el virus contacta en su movimiento célula a célula (Horner y col., 1994; X.S Ding y col., 1995; Grusak y col.,

1996). Estas venas menores se modifican irreversiblemente en hojas maduras y pasan de ser importadoras a funcionar únicamente como exportadoras del fotoasimilado (Turgeon, 1986; Schmalsting y Geiger, 1987).

Las venas menores de plantas herbáceas dicotiledóneas están rodeadas por las células de la vaina, las cuales encierran a las células del parénquima floemático, a las células acompañantes y a los elementos conductores de la savia (Fig. 5). En estas venas, existe una red continua de comunicación celular a través de plasmodesmos que las conecta con las células del mesófilo y constituye una ruta simplástica de entrada del virus al tejido floemático (Robards y Lucas, 1990). El número de células en las venas menores, su estructura, así como la estructura de las células acompañantes varía bastante en las diferentes especies (Gamalei, 1989; van Bel, 1993; Grusak y col., 1996; Komor y col., 1996; Turgeon, 1996). Por ello, se cree que no todas las venas menores serían utilizadas para la entrada de virus y que sería suficiente la intervención de una subpoblación de venas menores. Alternativamente se ha sugerido que los virus podrían incluso entrar a través de las venas grandes (Leisner y Turgeon, 1993). Experimentos recientes han demostrado claramente esta posibilidad (Cheng y col., 2000).

Se ha demostrado que los plasmodesmos existentes entre las células de la vaina y las células del mesófilo no suponen una barrera significativa para el movimiento de los virus (Nelson y van Bel, 1998). En plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresaban la MP del TMV, sólo los plasmodesmos que interconectan las células del mesófilo entre sí y las células del mesófilo con las células de la vaina mostraron un incremento en el SEL (Ding y col., 1992a). Estos resultados pusieron de manifiesto que los plasmodesmos entre el resto de las células vasculares requerían componentes adicionales para el transporte molecular. Ciertos resultados observados con virus limitados al floema son consistentes con esta hipótesis, ya que estos virus se acumulan en las células acompañantes y en las células del parénquima floemático,

pero no pasan a las células de la vaina ni al mesofilo (D´Arcy y de Zoeten, 1979; Shepardson y col., 1980; Sanger y col., 1994; van den Heuvel y col., 1995).

Por otro lado, en la mayoría de los estudios realizados en venas menores siempre hay un mayor porcentaje de células del parénquima floemático infectadas con respecto a las células acompañantes (Nelson y van Bel, 1998). En plantas de tabaco infectadas con TMV, sólo se observó el virus en el 10-30% de las células acompañantes comparado con el 60-90% de las células del parénquima floemático a los 3 dpi. Incluso a los 7 dpi, el porcentaje de células acompañantes no era superior al 30% (X.S. Ding y col., 1995). De manera similar, análisis de las venas menores de especies de las familias Solanáceas y Fabáceas infectadas con Tobamovirus y Potyvirus, han puesto de manifiesto que estos virus se acumulan preferentemente en las células del parénquima floemático, y siempre antes de la posible infección de las células acompañantes (Ding y col., 1998).

Es importante resaltar que las células acompañantes de las venas menores tienen una gran variabilidad respecto del número de plasmodesmos que las unen con las células del parénquima floemático y con las células de la vaina (Turgeon y col., 1993). En función de su estructura y del número de plasmodesmos que las conectan con otras células que no sean los elementos conductores de la savia han sido clasificadas en tres grupos (Grusak y col., 1996; Nelson y van Bel, 1998):

Células intermedias. Se denominan así cuando las conexiones plasmodésmicas son altas. Estas células se encuentran esencialmente en cucurbitáceas y contienen laberintos vesiculares que pueden ser del retículo endoplasmático (Gamalei y col., 1994). Estos laberintos vesiculares parecen fluctuar en volumen en función del tránsito del fotoasimilado (Gamalei y col., 1994).

Células acompañantes de paredes lisas. Cuando las conexiones plasmodésmicas entre las células acompañantes y otras células (además de los SEs) son entre 10 y 100

veces menores que las observadas en las células intermedias y poseen paredes celulares lisas. Se dan en las venas menores de muchas plantas de Solanáceas (*Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum*) y en algunos representantes de Fabáceas (*Phaseolus vulgaris*) (Gamalei, 1989; Turgeon y col., 1993; Turgeon, 1996).

Células transferentes. El tercer grupo de células acompañantes apenas tienen conexiones plasmodésmicas con las células de la vaina y el parénquima floemático (aproximadamente 10 veces menos que las observadas en las células acompañantes de paredes lisas) y se caracterizan por presentar invaginaciones de la pared (una pared sin crecimiento que incrementa la superficie de la membrana plasmática) que varían en volumen con el tránsito del fotosintetizado. Se encuentran en representantes de Fabáceas (*Pisum sativum*) y en otras familias (Wimmers y Turgeon, 1991; Gamalei y col., 1992). Son la mayoría de las especies herbáceas de zonas templadas e incluye gran parte de las plantas de cultivo (Gamalei, 1991).

En función de estos diferentes tipos de células acompañantes, se ha descrito que la entrada del fotoasimilado en el complejo SE-CC puede ocurrir o bien por una vía simplástica o bien por vía apoplástica (Gamalei, 1989; Turgeon, 1996). Por tanto, la entrada del virus en el complejo SE-CC dependerá del tipo de carga floemática del fotoasimilado que ocurra en la especie a la que infecta. En plantas con ruta apoplástica la carga se realiza a través de un cotransporte protón-sacarosa (Lucas y Madore, 1988; Turgeon y Beebe, 1991). Esta ruta apoplástica se daría en la mayoría de las plantas que contienen células acompañantes de paredes lisas o células transferentes (Ding y col., 1998). Por el contrario, las plantas que poseen células acompañantes intermedias presentan una vía simplástica para el flujo del fotoasimilado (Turgeon y Beebe, 1991). Además, en algunos casos se ha observado que una misma planta puede usar ambas vías apoplástica y simplástica (Turgeon y Hepler, 1989). Excepcionalmente, en trigo se ha descrito que el fotoasimilado puede pasar directamente del apoplasto al SE (Fritz y col., 1983). Estos SE de paredes delgadas no están asociados a las CCs (Evert y col., 1996) y se ha localizado un transportador de sacarosa en la membrana de los SEs, pero

no en las CCs (Kühn y col., 1997; Lalonde y col., 1999). Aún en el caso de que la vía apoplástica sea la del flujo del fotoasimilado, no se ha descrito en ningún caso que el virus entre en el apoplasto, sino que permanece en el simplasto, y por tanto utilizará otra vía de entrada simplástica al SE para el caso de estas plantas (Nelson y van Bel, 1998).

Tal y como se ha descrito anteriormente en la mayoría de las especies de plantas, las únicas células que contactan con los elementos conductores de la savia son las células acompañantes (Botha y van Bel, 1992). Pero en algunas especies existen conexiones plasmodésmicas entre las células del parénquima floemático y los elementos conductores de la savia (Fisher y Evert, 1982; Evert y Mierzwa, 1986; Wimmers y Turgeon, 1991; Beebe y Evert, 1992). En estas especies se ha postulado que el virus no tendría que infectar las células acompañantes para entrar en los SEs, sino que directamente el virus podría inducir una dilatación del plasmodesmo que hay entre las células del parénquima floemático y los SEs para permitir la entrada del virus en los SEs (Ding y col., 1998). La principal objeción a esta hipótesis reside en el hecho de que las conexiones plasmodésmicas entre las células del parénquima floemático y los SEs son a menudo raras y en algunos casos no se han observado (Gunning y col., 1974; McCauley y Evert, 1989; Grusak y col., 1996). Ding y col. (1998) también discuten la posibilidad de que el virus entre a los SEs a través de venas menores terminales. En estas venas las células del mesófilo o las células de la vaina conectan directamente con los SEs, tal y como se ha descrito para *Beta vulgaris* y *Syringa* (Esau 1967; 1977). Sin embargo, en otras plantas hay pocas venas menores terminales con SEs y en algunas especies apenas existen estas venas (Horner y col., 1994). Por tanto, se necesitan más estudios para determinar si el virus puede acceder a los SEs a través de otras células que no sean las células del parénquima floemático o las células acompañantes (Nelson y van Bel, 1998).

La interacción entre la célula acompañante y el elemento conductor de la savia (SE) es una de las áreas de la comunicación intercelular más interesante e inexplorada,

ya que una célula nucleada (célula acompañante) mantiene viva a su compañera anucleada (SE) durante largos períodos de tiempo (Leisner y Turgeon, 1993; Lucas y Gilbertson, 1994). El mecanismo de entrada viral desde las células acompañantes a los elementos cribosos del floema es hasta el momento desconocido, pero probablemente se realiza a través de una ruta simplástica ya que el plasmodesmo que conecta ambos tipos celulares está especializado en el transporte de macromoléculas y presenta un SEL bastante alto (0.35-1.00 µm) (Kempers y col., 1993; Lucas y Gilbertson, 1994). Esta conexión es diferente a los plasmodesmos normales. En las venas menores existe una especie de complejo poro-plasmodesmo, con un gran poro en el lado del SE y varios brazos del plasmodesmo en el lado de la célula acompañante. El RE está comúnmente asociado a este complejo, ya que en el lado del SE recubre la pared o está cerca del poro, y en el lado de las células acompañantes los desmotúbulos de los brazos del plasmodesmo se extienden a la mitad de la cavidad. Por tanto, la única continuidad entre ambas células es la membrana plasmática (Leisner y Turgeon, 1993; van Bel y Kempers, 1997).

Los posibles mecanismos por los cuales el virus o la molécula de ácido nucleico entra en el SE, son hasta ahora especulativos. Se ha descrito que tal vez el ácido nucleico del virus requiera la formación de un complejo del ácido nucleico con la MP y la CP, el cual se movería a través del plasmodesmo del SE acompañado por factores del huésped. Una vez en el SE, este complejo podría interaccionar con proteínas endógenas del SE para estabilizarlo durante su transporte a larga distancia (Gilbertson y Lucas, 1996). Alternativamente, el complejo MP-ácido nucleico-CP podría entrar en el SE y unirse a una zona del RE del SE donde el virus se encapsidaría. Simultáneamente el transporte de la CP a través del plasmodesmo del SE podría darse con o sin ayuda de factores del huésped y contribuiría a la formación de viriones maduros (Gilbertson y Lucas, 1996).

Observaciones recientes han puesto de manifiesto que la MP del CMV se localiza de manera importante tanto en los plasmodesmos que conectan las células

acompañantes y los SEs como en la cara parietal de los SEs (Blackman y col., 1998). Además, se han observado viririones en esta misma localización de los SEs y en las células acompañantes pero no en los plasmodesmos. En base a éstos y previos resultados se ha propuesto el siguiente modelo para la entrada del CMV en el floema: el CMV se movería célula a célula como una ribonucleoproteína (MP-RNA) (B. Ding y col., 1995; Nguyen y col., 1996; Blackman y col., 1998) atravesando varios tipos celulares sin encapsidarse y una vez en la célula acompañante se ensamblarían los viriones (Blackman y col., 1998). Posteriormente estos viriones se desencapsidarían en estas células acompañantes y formarían un complejo ribonucleoproteico entre el RNA, la CP y la MP que atravesaría el plasmodesmo del SE. Una vez en el SE se separaría la MP del complejo y se encapsidaría el virión en las membranas del RE del SE, formando agregados de partículas vírales rodeados de una membrana, mientras que la MP permanecería rodeando la membrana plasmática del SE donde se localiza el poro (Blackman y col., 1998). Se asume que la CP necesaria para la encapsidación viral, pasa al SE unida al complejo ribonucleoproteíco, pero también se ha postulado que la CP pudiera entrar separadamente en el SE. Los agregados de partículas romperían la membrana y saldrían al flujo del floema, mientras que la MP se acumularía en gran cantidad en el SE, bien porque el SE no tiene maquinaria para degradarla o porque es necesaria para el movimiento junto al fotoasimilado (Blackman y col., 1998).

Esta hipótesis de complejo ribonucleoproteico, es consistente con la observación de que RNAs endógenos de la planta son transportados de las CCs a los SEs. Es el caso de una proteína transportadora de sacarosa (SUT1), cuyo mRNA es sintetizado específicamente en las CCs y transportado a los SEs (Kühn y col., 1997). Dado que el SE carece de ribosomas (Esau, 1969; Sjolund y Shih, 1983; Fisher y col., 1992), se desconoce la razón por la que éste SUT1 mRNA entra en el SE. Una posibilidad sugerida es que fuera transportado como un complejo ribonucleoproteico destinado para su movimiento a larga distancia (Ishiwatari y col., 1998).

En el caso de los virus que inducen la formación de túbulos implicados en el

movimiento célula a célula, se ha detectado su presencia en las conexiones de las células vasculares (VP-CC) en la interacción CLRV-tabaco (Sánchez-Pina y col., 2000), lo que hace sospechar que tal mecanismo de movimiento célula a célula, podría funcionar en estos casos para permitir la entrada de viriones directamente en el SE (Gilbertson y Lucas, 1996). Además, se han detectado partículas vírales intactas del *Virus de la hoja roja de la zanahoria* dentro del complejo poro-plasmodesmo de los SEs de venas menores (Murant y Roberts, 1979), lo que sugiere un tercer mecanismo de entrada de los virus al floema.

Se ha sugerido una última posibilidad de entrada directa de viriones en el SE. Esta resultaría de una alteración en la diferenciación de los SEs y las células acompañantes y/o durante el colapso y muerte celular de células floemáticas. Se ha argumentado que tales alteraciones inducen una respuesta del huésped que podría aislar estas áreas del simplasto de la planta, produciendo una escapada de los viriones en el interior de los SEs funcionales (Gilbertson y Lucas, 1996).

2- Movimiento a través de floema

Una vez que el virus ha entrado en el floema éste es transportado junto al fotoasimilado (Schneider, 1965; Esau y col., 1967), por lo que el virus se mueve a una velocidad comparable a la del flujo de éste (Schneider, 1965). Los primeros estudios realizados en tallos de plantas de tabaco infectadas con el TMV y el PVX revelaron un movimiento rápido de los virus, alcanzándose valores de hasta 8cm/h (Capoor, 1949). Por tanto, el transporte sistémico estaría influenciado por los mismos patrones que regulan el flujo fotosintético (Turgeon y Webb, 1973). La velocidad y dirección de este transporte depende de la fuerza relativa fuente-sumidero, la proximidad de la fuente al sumidero y las interconexiones del sistema vascular (Patrick, 1991). De esta forma, el movimiento del fotoasimilado y del virus estará dirigido preferentemente desde una hoja o tejido maduro (fuente) hacía el tejido joven (sumidero) más cercano, que está creciendo activamente y al que está directamente conectada por el sistema vascular (Leisner y Turgeon, 1993). Así pues, los factores y condiciones que modulan el

desarrollo de la planta condiciona totalmente la forma en la que el virus invade la planta y su distribución final en la misma (ver apartado 1.5).

Una serie de recientes evidencias han puesto de manifiesto que para su movimiento a larga distancia los virus podrían apropiarse de un sistema endógeno de la planta diseñado para el transporte vascular de macromoléculas. Así, se ha demostrado que las plantas pueden emplear el floema para el tránsito de proteínas y/o moléculas de RNA a los distintos órganos para integrar los procesos fisiológicos, tales como la producción de fotoasimilado en hojas fuente y su programa de desarrollo (Lucas y Wolf, 1999). Se ha descrito que varios mRNAs de planta pueden ser transportados largas distancias a través del floema (Sasaki y col., 1998; Xoconostle-Cazares y col., 1999; Citovsky y Zambrisky, 2000). Además del mRNA del transportador de sacarosa SUT1 mencionado anteriormente, se han detectado varios mRNAs en el floema de calabacín tales como el de la tioredoxina h (Sasaki y col., 1998) y el de una proteína, denominada Cm NACP, que está potencialmente implicada en el desarrollo del meristemo ápical (Ruiz-Medrano y col., 1999). El transporte vascular de este mRNA se ha demostrado mediante experimentos de injerto. Además se ha caracterizado recientemente una proteína floemática de calabacín con ciertas similaridades a las MPs vírales que transporta RNAs entre las CCs y los SEs en una forma inespecífica de secuencia (Xoconostle-Cazares y col., 1999). Recientemente se ha puesto de manifiesto que una de las proteínas más abundantes del floema de pepino tiene propiedades de unión a RNA y se ha sugerido su implicación en el transporte floemático de macromoléculas (Gómez y Pallás, 2001; Owens y col., 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que el estado de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) puede ser adquirido mediante injerto por plantas no silenciadas (Jorgensen y col., 1998; Palauqui y col., 1997). Experimentos con plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen de la nitrato (o nitrito) reductasa, demostraban que el silenciamiento post-transcripcional del gen activado en el injerto podía ser transmitido al vástago, mediante una secuencia especifica de RNA que es liberada en

el floema (Palauqui y col., 1997). Resultados similares han sido obtenidos en estudios paralelos con plantas transgénicas que expresaban construcciones vírales, demostrando que la infección viral puede inducir un silenciamiento del gen post-transcripcional y que este estado es transmitido vía floema a las hojas en desarrollo (Lindbo y col., 1993; Ratcliff y col., 1997; Tanzer y col., 1997; Al-Kaff y col., 1998; Ruiz y col., 1998). Puede considerarse por tanto que los virus de plantas han desarrollado estrategias para evitar que sus RNAs sean degradados en el floema por los sistemas de vigilancia de RNAs de la planta (Anandalakshmi y col., 1998; Brigneti y col., 1998; Kaschau y Carrington, 1998). Además, se ha demostrado que ciertos virus, como el CMV, han adquirido la capacidad de bloquear el silenciamiento adquirido sistémicamente dirigido a transcritos virales y endógenos (Beclin y col., 1998). También, un descubrimiento reciente indica que un *Umbravirus*, el *Virus del rosetón del cacahuete*, codifica una proteína que puede facilitar el movimiento de RNA virales heterólogos (Ryabov y col., 1999).

A pesar del gran número de evidencias que ponen de manifiesto que los virus de plantas se traslocan sistémicamente por las mismas rutas que el fotoasimilado, la forma estructural en la que lo hace no está excesivamente estudiada. Aunque para un gran número de virus se ha sugerido que el movimiento en el floema ocurre en forma de partícula viral, estas hipótesis se basan en evidencias indirectas y no concluyentes. En el caso del TMV, el virus vegetal más estudiado, a pesar de que se habían observado partículas virales en los SEs de plantas infectadas (Esau y Cronshaw, 1967), y de que se ha demostrado que requieren la CP funcional y un origen de ensamblaje para que ocurra el movimiento sistémico (Oxelfelt 1975; Saito y col., 1990; Ding y col., 1996), no se conoce con exactitud la forma en que se trasloca floemáticamente el virus. Sólo en el caso del *Virus del mosaico verde moteado del pepino* (CGMMV) se ha demostrado realmente mediante ensayos de protección con RNasa y el análisis directo del floema que el virus se mueve en forma de partícula viral (Simón-Buela y García-Arenal, 1999).

3- Salida del floema

Aunque hay numerosas referencias en la literatura sobre el movimiento de los solutos desde las hojas fuente a las hojas sumidero, se dispone de una menor información sobre la descarga floemática en los tejidos sumideros. Las evidencias fisiológicas indican que la descarga de solutos en tabaco (Turgeon, 1987, 1989) y en caña de azúcar (Schmalstig y Geiger, 1985; 1987) es simplástica, mientras que en maíz parece ser apoplástica (Evert y Russin, 1993) y la importancia de una ruta sobre otra depende de una fuerte regulación del estado fisiológico y desarrollo de la planta (Leisner y Turgeon, 1993). En general la descarga simplástica parece ser la más común (Fisher y Oparka, 1996).

Estudios con plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el PVX, han demostrado que la descarga del virus es simplástica y ocurre a través de las venas de clase III (venas mayores) y no a través de las venas menores (clase IV y V) (Roberts y col., 1997). La infección de las venas de clase IV y V (venas menores) sólo ocurre mediante el transporte célula a célula a través del mesófilo. Esto parece ser debido a que estas venas menores en las hojas jóvenes (sumidero) están en un estado de desarrollo inmaduro y los SE están todavía indiferenciados (Turgeon y Webb, 1976), o tal vez no existe una continuidad simplástica en la unión entre las venas de la clase III y las venas menores (Roberts y col., 1997). Aunque raramente se observan agregados de virus ensamblados en los SE inmaduros, los autores proponen que estos agregados pueden constituir una fuente de infección de nuevos tejidos, una vez que las venas menores comiencen a realizar la carga tras la transición de la hoja de sumidero a fuente (Roberts y col., 1997). Otros experimentos con injertos de plantas transgénicas que expresaban la CP del PVX con vástagos no transgénicos, también demostraban para un mutante del PVX defectivo de la CP, que dicha proteína era translocada a los complejos SE-CC de las venas de la clase III (Santa Cruz y col., 1998).

Durante la carga floemática los plasmodesmos previamente usados en la descarga floemática comienzan a disminuir en número (Ding y col., 1988) y esto se cree que es debido a un aumento de la presión del turgor. La carga continuada induce una presión diferencial entre el complejo SE/CC y las células cercanas que sería suficiente para cerrar los plasmodesmos (Oparka y Prior, 1992). Así durante la fase de importación floemática, la presión de turgor es muy alta en las hojas fuente maduras para suministrar a una determinada hoja sumidero y en cambio es muy baja en los puntos de descarga simplástica, pero a medida que las venas menores maduran y se hacen activas en carga, la presión de turgor aumenta en estas venas dando lugar a un aumento repentino de los niveles de soluto dentro de los complejos SE/CC y el gradiente de presión se invierte a medida que las venas menores van cargando (Roberts y col., 1997). Los plasmodesmos no sólo disminuyen en número durante la transición sumidero-fuente de la hoja, sino que también sufren cambios estructurales ya que pasan de ser simples a ramificados. Los plasmodesmos ramificados que aparecen en las hojas fuente son los que constituyen un centro de control que determina qué tipo de moléculas pueden entrar al floema (Oparka y Turgeon, 1999); mientras que los plasmodesmos simples permitirían una salida indiscriminada del floema en las hojas sumidero facilitando una rápida entrada de macromoléculas a la hoja en crecimiento.

Los virus limitados al floema son de especial interés en el estudio de la salida del virus del floema. Hay algunos virus dentro del grupo de los Geminivirus que están limitados al floema (Goodman, 1981; Harrison, 1985; Kim y col., 1986; Horns y Jeske, 1991;). Estos virus por tanto no se pueden inocular mecánicamente necesitando de un vector que los introduzca en el floema (Matthews, 1991; Schneider, 1965). En la mayoría de los casos sólo invaden los SE/CC y la células del parénquima floemático (Gill y Chong, 1975; Barker, 1987). Ahora bien, en unos huéspedes el virus sólo se mueve en el complejo SE/CC mientras que en otros huéspedes es capaz de invadir también las células del parénquima floemático (Leisner y Turgeon, 1993). Además, se ha comprobado que estos virus inicialmente descritos como limitados al floema en

algunos huéspedes, en otros puede invadir células del mesófilo (Kim y Lee, 1992) y este comportamiento diferencial puede depender del estado de desarrollo de la planta (Wang y col., 1996).

1.4.3. Mecanismos de resistencia al movimiento

Muchos tipos de resistencia natural a virus, que implican una resistencia al movimiento célula a célula, pueden ser debidas a una incompatibilidad entre la proteína de movimiento y los componentes del huésped (plasmodesmos) (Deom y col., 1992). Análisis mutacionales llevados a cabo con la MP del TMV y del *Virus del mosaico del tomate* (ToMV), demuestran la existencia de posibles sitios de interacción y reconocimiento asociados a genes del huésped resistentes. La expresión del gen de la MP del TMV en plantas de *N. tabacum* Xanthi-nc (genotipo NN; caracterizado por el desarrollo de una respuesta hipersensible a la infección del TMV) interfiere con la capacidad de la MP para incrementar el SEL de los plasmodesmos (Deom y col., 1991). En presencia del producto del gen N, la MP del TMV incrementó el SEL sólo hasta 3,9 kDa. Este efecto del gen N desaparece cuando se eliminan los 33 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal (Lucas y Gilberton, 1994). La sustitución de dos aminoácidos en el extremo N-terminal de la MP del ToMV permitió al virus vencer al gen de resistencia del tomate Tm-2 (Meshi y col., 1989). Además, la sustitución de dos aminoácidos en el extremo C-terminal de la MP del ToMV, también permite al virus vencer el alelo Tm-2^2 del gen de resistencia en tomate (Weber y col., 1993). Estos resultados establecen que los productos de ambos genes de resistencia N y Tm-2 (incluyendo Tm-2^2) reconocen y posiblemente interaccionan directamente, o indirectamente, con las MPs virales (Weber y col., 1993).

Otro ejemplo de resistencia al movimiento célula a célula, es el caso de la resistencia de plantas del cultivar Yolo de pimiento frente al *Potyvirus Y de la patata*

(PVY). Esta resistencia está gobernada por un único gen recesivo pvr-2^{1} (Arroyo y col., 1996).

La resistencia de plantas transgénicas que expresan la CP viral del TMV se debe, al menos en parte, a una competición entre la MP (P30) y la CP por la unión al RNA viral. Altos niveles de CP en las células de plantas transgénicas podrían interferir con la unión de la proteína P30 al RNA del TMV, unión necesaria para formar el complejo RNA-P30, sin el cual el RNA del TMV es incapaz de atravesar los plasmodesmos (Abel y col., 1986).

También se ha demostrado que los factores del huésped influyen en el movimiento a larga distancia en distintos virus. Aunque estos factores del huésped no han sido caracterizados, en algunos casos se ha identificado el lugar donde el efecto de restricción del movimiento en la planta se pone de manifiesto. Así, en variedades de soja resistentes al *Virus del moteado clorótico de la carilla* (CCMV), el virus fue detectado en todos los tipos celulares de la hoja inoculada excepto en el tejido vascular (Goodrick y col., 1991). Las células del parénquima vascular (VP) junto a las células de la vaina (BS) o las células acompañantes (CC) junto a las células de la vaina (BS), parecían constituir la frontera, que daba lugar a la restricción del movimiento. Así, identificaron la frontera entre la BS-VP y entre la BS-CC como el lugar en el que actúan dos genes recesivos de resistencia (Goodrick y col., 1991).

La interfase entre BS y células vasculares también ha sido descrita como el sitio de restricción del movimiento sistémico en plantas transgénicas de tabaco, en las cuales el movimiento de CMV fue limitado (Wintermantel y col., 1997), y en la infección de *Capsella bursa-pastoris* por el *Luteovirus del amarilleo occidental de la remolacha* (BWYV) (Sanger y col., 1994).

Estudios de distribución del CMV en variedades resistentes y susceptibles de plantas de pimiento, demuestran que la replicación y el movimiento célula a célula en

la hoja inoculada fueron similares en todas las variedades, y las diferencias estriban en la ausencia de infección vascular o la restricción del virus dentro de los haces vasculares en las variedades resistentes. Por tanto, es la translocación del virus en la entrada o en la salida del sistema vascular lo que está siendo inhibida. Así, en las variedades donde estaba restringida la salida del floema, la infección de peciolos, tallos y raíces fue restringida a uno o dos haces vasculares y no se expandió a tejidos vecinos u a otros órganos de la planta (Dufour y col., 1989).

El estudio de acumulación de dos estirpes, una severa (U1) y la otra suave (M), del TMV en las venas menores de tabaco, demostró que ambas estirpes se acumulaban con tasas semejantes en la hoja inoculada. Sin embargo, había un ligero retraso en la acumulación viral en las hojas superiores y en los haces vasculares de los peciolos de hojas inoculadas en el caso de la estirpe M (Nelson y col., 1993; X.S. Ding y col., 1995). Se observó que había un menor número de células VP y CC en lesiones cloróticas que acumulaban viriones de la estirpe M con respecto a la estirpe U1 (X. S. Ding y col., 1995). Además, se demostró que este retraso en la acumulación del virus M se debía a un impedimento en el movimiento hacia el interior de estas células y no a su incapacidad para replicarse dentro de ellas (X.S. Ding y col., 1995).

En un ecotipo de Arabidopsis, En-2, un aislado del CaMV (CM4-184) no produce infección sistémica, aunque parece replicarse y moverse en la hoja inoculada (Leisner y col., 1993). Estos autores, utilizando la técnica de la hibridación del esqueleto de la planta, encuentran el virus en el peciolo de la hoja inoculada pero no en otras hojas. El carácter de resistencia es segregado en Arabidopsis En-2 como un solo gen dominante (Leisner y col., 1993).

Ciertas variedades de maíz muestran resistencia al movimiento sistémico del *Potyvirus del mosaico enanizante del maíz* (MDMV) controlada por un solo gen dominante (Lei y Agrios, 1986).

En el progreso de la infección de pepino por el *Virus de la aspermia del tomate* (TAV), de nuevo la interfase BS/floema es una barrera para el movimiento sistémico. Esta limitación a la infección sistémica está asociada a la CP del TAV (Thompson y García-Arenal, 1998). CMV y TAV comparten huéspedes sistémicos. Sin embargo, mientras que el CMV infecta sistémicamente pepino, el TAV no lo hace. Coinoculación con ambos virus permitió al TAV invadir la planta. La introducción de mutaciones en la proteína 3a (MP) o en el gen de la CP del RNA3 del CMV, demostraban que la CP es un determinante de especificidad de huésped para el movimiento sistémico en el caso del CMV y TAV en pepino (Taliansky y García-Arenal, 1995); pero el papel de la CP del CMV en promocionar el transporte en la interfase BS/floema permanece sin ser determinado (Thompson y García-Arenal, 1998).

Experimentos similares con el TMV y el *Tobamovirus de las manchas en anillo del Odontoglossom* (ORSV) en *N. tabacum* también demostraban que la CP de los Tobamovirus puede ser requerida para interaccionar con componentes del huésped, posiblemente en los plasmodesmos vasculares, para facilitar la salida o la entrada en el floema (Hilf y Dawson, 1993). Sin embargo, mutantes del TMV carentes de CP son capaces de entrar en las células del parénquima vascular (VP) (Ding y col., 1996). Para el TMV, los factores virales determinantes de la especificidad de huésped serían con mayor probabilidad las proteínas de 126-kDa y/o la proteína de 183-kda implicadas en la replicación viral (X.S. Ding y col., 1995; Derrick y col., 1997).

El BMV es otro virus en el cual se ha demostrado que su CP está implicada en la especificidad de huésped. Delecciones de 7 aminoácidos del extremo N-terminal de su CP, bloquean la infección sistémica del virus en *Chenopodium hybridum*, pero no en cebada, ambos huéspedes sistémicos para el BMV (Flasinski y col., 1995).

También se ha descrito el papel crucial de las MPs de los bromovirus en la especificidad de huésped, mediante el uso de construcciones de híbridos virales en los cuales se intercambiaron las proteínas 3a del BMV y CCMV (Mise y col., 1993).

Callaway y col. (1996) determinaron que la carencia de movimiento por el CaMV en un ecotipo resistente de Arabidopsis está correlacionado con una gran expresión de genes o acumulación de proteínas de los genes de respuesta de defensa general (ej. Proteínas relacionadas con la patogénesis). Por tanto se piensa que un componente viral podría posiblemente interaccionar con un componente del huésped y activar reacciones de defensa. Así, un decrecimiento en el movimiento vascular podría ser debido a una activación de defensa más que a un efecto directo del componente viral en el movimiento vascular (Séron y Haenni, 1996).

1.5. DISTRIBUCIÓN FINAL DEL VIRUS EN LA PLANTA

Se han realizado estudios biológicos sobre las pautas de infección del virus en sus huéspedes susceptibles para un amplio espectro de interacciones virus-huésped. Estos estudios han puesto de manifiesto que la eficiencia de este proceso está sujeta a la influencia de las condiciones ambientales y al estado de desarrollo de la planta entera y de los órganos individuales (Maule, 1991).

1.5.1. Influencia de los factores ambientales en la distribucion final del virus en la planta.

Las condiciones ambientales bajo las cuales las plantas crecen antes de la inoculación, al tiempo de la inoculación, y durante el desarrollo de la enfermedad pueden tener profundos efectos en el curso de la infección. Una planta que es altamente susceptible a un virus determinado bajo ciertas condiciones ambientales, puede ser completamente resistente en otras condiciones (Matthews, 1991). Así, tanto la transmisión, replicación y translocación del virus dentro de la planta, como la susceptibilidad y la expresión de los síntomas, están enormemente afectados por factores tales como la luz, temperatura y aportes de agua, entre otros (Hull, 1989; Cordova y col. , 1991; Matthews, 1991). Aunque son aspectos menos estudiados en la interacción virus-huésped, se han podido obtener algunas generalizaciones. Así, se ha descrito que las plantas crecidas en invernadero eran más susceptibles cuando eran crecidas y manipuladas bajo las siguientes condiciones (Matthews, 1991):

- Suplementos de agua y nutrición mineral que no limiten el crecimiento.
- Intensidades de luz de moderadas a bajas.
- Temperatura en un rango de 18º-30ºC dependiendo del virus y su huésped.
- Inoculación llevada a cabo por la tarde.

a) **Temperatura**

El papel de la temperatura en la distribución final del virus en la planta, ha sido descrito como uno de los factores más importantes en un gran número de interacciones virus-huésped (ej. Myers y col., 1993; Ducasse y Shepherd, 1995; Soler y col.,1998).

En un estudio con diferentes huéspedes para el TSWV, se demostró que la acumulación del virus en las hojas inoculadas (una combinación del efecto de la replicación y el movimiento célula a célula) de todas las plantas observadas fue más alta a regímenes de temperatura bajos (23ºC día, 18ºC noche). Por el contrario, el movimiento a larga distancia se vería favorecido en *Nicotiana tabacum* a altas temperaturas (29ºC día, 24ºC noche), mientras que tuvo poco efecto sobre las especies *Datura stramonium* y *Physalis ixocarpa* (Llamas-Llamas y col., 1998). Resultados similares obtienen Goodman y col., (1986) con el mismo virus en plantas de tomate, describiendo una mayor replicación del TSWV a 20ºC, mientras que los síntomas fueron más severos a 36ºC. También en *N. benthamiana* (Lawson y col., 1994), *N. glutinosa* y *Cucumis sativus* (Hokama y Mondail, 1988) la expresión de los síntomas del TSWV se incrementó a altas temperaturas.

Otros estudios de resistencia al TSWV en variedades de *Capsicum chinese*, donde correlacionan la temperatura y el estado de crecimiento durante la inoculación, mostraron que plantas mantenidas a 30/18ºC (día/noche) desarrollaban síntomas sistémicos independientemente del estado de crecimiento en el momento de la inoculación, mientras que aquellas mantenidas a 25/18ºC (día/noche) sólo mostraban síntomas sistémicos cuando habían sido inoculadas en el estadío de crecimiento de dos hojas, mientras que las inoculadas en el estadío de 4 hojas eran resistentes (Soler y col., 1998).

Resultados similares se han obtenido con el *Virus de la clorosis de las venas del*

cacahuete (PCISV), ya que es sistémico en tabaco y *Datura inoxia* a 33ºC, pero no a 25ºC. Sin embargo, a 25ºC la multiplicación del virus y su productividad es mucho más alta en las hojas inoculadas de dichas plantas (Ducasse y Shepherd, 1995). También un incremento de temperatura desde 25 a 32ºC permitió al CMV infectar sistémicamente variedades de pimiento, que tenían bloqueado el movimiento a través del peciolo de la hoja inoculada (Nono-Womdim y col., 1991).

Existen sin embargo, resultados que demuestran el efecto contrario de la temperatura, como la observación de que el TSWV mostraba síntomas en Ficus a 25ºC y sin embargo desaparecían a 36ºC (Laviña y Batlle, 1993). En Chrysantemo, el TSWV desarrolla síntomas en un rango de 18ºC a 27ºC, pero se observa una mayor incidencia de plantas infectadas a un régimen de temperaturas de 21/16ºC (día/noche) que a 24/18ºC (Allen y col., 1991).

Otros resultados que ponen claramente de manifiesto la influencia de la temperatura son los observados en la infección en cebada por el BMV en plantas crecidas a 24/20ºC (día/noche). En estas condiciones el virus quedaba restringido a las células de la vena, en concreto a las células de la vaina de la vena (BS) y a unas pocas células del mesófilo asociadas a la vena, tanto en las hojas inoculadas como en las hojas sistémicas. Dicha restricción era completamente vencida, y por tanto el BMV se expandía al resto de las células del mesófilo de la hoja, cuando las plantas eran sometidas durante sólo 2 horas a 34ºC, pero no a 30ºC (Ding y col., 1999). Puesto que se conoce que la replicación del BMV en protoplastos de cebada a 24ºC y a 34ºC es equivalente (Kroner y col., 1989), el efecto de la temperatura es atribuible al movimiento viral y por tanto sobre la posible barrera entre las BS y las células del mesófilo (Ding y col., 1999).

Un efecto de la temperatura sobre la funcionalidad de la CP se ha descrito para el RCNMV. En *N. benthamiana* se ha demostrado que la CP del RCNMV es requerida para la infección sistémica cuando las plantas son crecidas a 25ºC, pero esto

no ocurre cuando las plantas son crecidas a 15ºC (Xiong y col., 1993). En *N. clevelandii* la CP es indispensable para el movimiento vascular a ambas temperaturas. Todavía no se comprenden en profundidad los mecanismos moleculares que conllevan estas diferencias en el movimiento vascular.

En cuanto al CarMV, hay pocos datos sobre el efecto de la temperatura y los pocos trabajos que hay son bastantes antiguos. Estos trabajos se basaban en la hipótesis de que los virus de clavel, especialmente el CarMV, podían ser eliminados por calor. Paludan (1964; 1965) sometió varios cultivares de clavel infectados con CarMV a un tratamiento de 37ºC durante 240 días, y así consiguió eliminar el CarMV pero sólo en ciertos cultivares de clavel. Brierley (1964) demostró que el *Virus de las manchas en anillos del clavel* (CRSV), CERV, CarMV y el *Virus latente del clavel* (CLV) podían ser eliminados por un tratamiento a 38ºC durante dos meses. Hakkaart y Jordanova (1968) demostraron que, después de un tratamiento de 38ºC durante 132 días de un cultivar de clavel infectado con CarMV y CERV, el CarMV había sido eliminado pero no el CERV. Además comprobaron que conforme aumentaba la duración del tratamiento aumentaba el porcentaje de plantas sin CarMV, pero a la vez se reducía el número absoluto de plantas ya que se deterioraban por el prolongado tratamiento con calor.

Otros experimentos con el CarMV, demuestran que todas las fases de la infección del CarMV son dependientes de la temperatura, y que la infección es condicionada, en parte, por la temperatura en las fases de pre y post-inoculación (Kemp, 1971). El número, tamaño y tipo de lesión local inducida por el CarMV en hojas inoculadas de *Dianthus barbatus* variaba de manera considerable con la temperatura de pre y post-inoculación. Temperaturas altas (32ºC) en la pre-inoculación tendían a decrecer el número de lesiones. La temperatura de incubación fue la que más influencia tuvo y reguló la expansión de la clorosis. La tasa de virus fue mayor y los síntomas más severos cuando las hojas inoculadas de un clon de *D. barbatus* no hipersensible fueron incubadas continuamente a 21ºC más que a 10ºC o 32ºC (Kemp, 1971).

b) Luz

Se ha demostrado que la intensidad de luz afecta a la capacidad de algunos virus quimera, formados a partir de varias estirpes del CaMV, de infectar sistémicamente a *Nicotiana bigelovii*. Así bajas intensidades de luz (170 µE M^{-2} S^{-1}) permitían una infección sistémica, mientras que no había infección sistémica a altas intensidades de luz (320-550 µE M^{-2} S^{-1}) (Qiu y Schoelz, 1992). Se han identificado unos dominios dentro del gen VI del CaMV que influyen en la infección sistémica dependiendo de la luz (Wintermartel y col., 1993). Se ha postulado que la luz puede cambiar el ambiente celular de tal modo que el producto del gen VI podría ser incapaz de interaccionar adecuadamente con los componentes del huésped, bien por transactivación transcripcional, movimiento vascular o provocando una respuesta de defensa.

En general, el régimen de luz al cual una planta es expuesta inmediatamente antes y después de la inoculación mecánica con un virus, influye en la infección, la multiplicación del virus y la expresión de los síntomas en el huésped. Normalmente un período de penumbra o total oscuridad antes de la inoculación incrementa el número de lesiones, mientras que si el período de oscuridad continúa durante la inoculación el número de lesiones locales decrece (Bawden y Roberts, 1948; Costa y Bennet, 1955; Yarwood, 1957, Huguellet y Hooker, 1966).

Así, estudios con el CarMV en *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa* y *Dianthus barbatus* (Kemp, 1976), demostraron que un tratamiento de oscuridad en la preinoculación promovía gran número de lesiones locales cuando se acoplaba a un siguiente período de luz en la post-inoculación. Un tratamiento de luz en la pre-inoculación reducía el número de lesiones incluso cuando se continuaba con un período de luz post-inoculación. Continua oscuridad durante la incubación con el virus prevenía o retrasaba la aparición de lesiones. En el caso de *Dianthus barbatus*, huésped sistémico del CarMV, un período de oscuridad continua reducía la cantidad de

virus detectable en la hoja inoculada y el virus era limitado a la hoja inoculada o su traslocación a las hojas no inoculadas quedaba retrasada (Kemp, 1976).

1.5.2. Influencia del estado de desarrollo de la planta en la distribución final del virus

El papel del estado de desarrollo de la planta en la infección sistémica ha sido principalmente examinado con el CaMV en nabo (Leisner y col., 1992) o en *A. thaliana* (Leisner y col., 1993), con el CLRV en plantas de tabaco (Más y Pallás, 1996) y con el *Virus del estriado del maíz* (MSV) en maíz (Lucy y col., 1996). Estos estudios demostraron cómo el patrón de distribución del virus estaba influenciado por el estado de desarrollo de las hojas, de forma que el virus accede a los tejidos sumidero a los cuales fluye el fotoasimilado, mientras que aquellos tejidos maduros, que han pasado de ser sumidero a fuente antes de la entrada en el sistema vascular del virus, nunca serían infectados por el virus. Así mismo, estos autores demostraron que la relación filotáctica entre las hojas inoculadas y sistémicas determina qué lado de las hojas llegará a ser infectado primero (Leisner y Turgeon, 1993; Más y Pallás, 1996).

En la transición sumidero-fuente de una hoja, se ha observado que el virus no es capaz de invadir la zona apical de la hoja (fuente), quedando restringido a la zona basal (Leisner y col., 1992; 1993; Roberts y col., 1997) y su capacidad de movimiento célula a célula está también restringida imposibilitando su llegada a la zona apical. La limitación de este movimiento local no se conoce, pero podía estar relacionado con los mecanismos de respuesta de defensa del huésped, que se activan a medida que progresa el movimiento célula a célula del virus (Roberts y col., 1997). Además, se sabe que las hojas jóvenes dejan de importar virus antes de parar la importación de fotoasimilado, luego las zonas de la planta accesibles al virus son incluso más limitadas que las accesibles al fotoasimilado (Leisner y col., 1992).

Por tanto, se ha demostrado que cambios en el desarrollo de una planta tienen un efecto importante en el movimiento a larga distancia del virus. Así, ecotipos de Arabidopsis con floración temprana son resistentes a la infección sistémica del CaMV. Esto es debido a que la parte vegetativa de la planta maduraba muy rápidamente y los tejidos se hacen inaccesibles para el virus incluso cuando las plantas son inoculadas en etapas tempranas en el desarrollo. Sólo cuando estas plantas son crecidas en condiciones de crecimiento subóptimas, su desarrollo es más lento y se hacen más susceptibles al CaMV (Leisner y col., 1993).

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de la MP viral en plantas puede inducir cambios en el metabolismo del carbono y en la distribución del fotoasimilado (Lucas y col., 1993b; Tecsi y col., 1994, 1995, 1996; Olesinski y col., 1995; Herbers y col., 1997; Wolf y Lucas, 1997). En el caso de plantas transgénicas que expresaban la MP del TMV, se observó un efecto significativo sobre la producción de biomasa, que fue mucho más baja en el tallo y en la raíz en comparación con las plantas control (Balachandran y col., 1995). Estos estudios apoyan la hipótesis de que esta influencia en la distribución del fotoasimilado es el resultado de una interacción proteína-proteína dentro del tejido fuente. La MP viral interaccionaría con proteínas del huésped de manera competitiva a nivel del tráfico de macromoléculas a través del plasmodesmo, alterando así el control del metabolismo endógeno (Almon y col., 1997; Wolf y Lucas, 1997).

1.5.3. Tejidos sumideros de la planta

La mayoría de los tejidos de la planta pueden actuar como sumideros, pero algunos son más fuertes que otros. Además, un tejido determinado puede actuar a como sumidero o fuente según el estado de desarrollo de la planta (Leisner y Turgeon, 1993).

La mayoría de los trabajos que estudian la distribución de virus sistémicos por toda la planta, describen que una vez que el virus sale de la hoja inoculada junto al floema entra en el sistema vascular del tallo y se dirige hacia la raíz donde se acumula antes de invadir las hojas jóvenes superiores (Samuel, 1934; Leisner y col., 1992; Más y Pallás, 1996). En el caso de la familia de las Solanáceas, las plantas poseen un floema abaxial y adaxial en las venas de las hojas y del peciolo que se corresponde con el floema externo e interno del tallo, respectivamente (Hayward, 1938; McCauley y Evert, 1988a,b). Se sabe que el floema abaxial es el encargado de la exportación de azúcares desde la hoja (Bonnemain, 1969; Peterson y Currier, 1969; Turgeon y Webb, 1976). En experimentos de infección con el *Virus del moteado del pimiento* (PepMoV) en *Capsicum annum*, se demuestra que el virus es primeramente transportado desde la hoja inoculada hacia la raíz a través del floema externo del tallo y en un punto dado (desconocido) entre el nódulo del cotiledón y la raíz, el PepMoV entra en el floema interno a través del cual rápidamente se transporta a los tejidos jóvenes de la parte superior de la planta (Andrianifahanana y col., 1997). Sin embargo, otros estudios de distribución espacio temporal del *Geminivirus del mosaico enanizante de la judía* (BDMV) en *Phaseolus vulgaris* y *Nicotiana benthamiana*, demuestran que el brote apical de la planta actúa como un fuerte sumidero, mientras que la raíz es raramente infectada (Wang y col., 1996).

Dos tejidos sumideros que son normalmente resistentes a la infección sistémica son el meristemo apical y las semillas, los tejidos vegetativos y sexuales de la planta (Matttews, 1991). El mecanismo que protege estos tejidos no está completamente comprendido (Leisner y Turgeon, 1993).

El área meristemática del brote apical normalmente no es invadida por virus en la mayoría de las combinaciones virus-planta (Matttews, 1991), como ha sido demostrado para el MSV en maíz (Lucy y col., 1996), el BDMV en *P. vulgaris* y *N. benthamiana* (Wang y col., 1996). Puesto que el meristemo no tiene vasculatura, el virus no puede llegar a éste vía floema, y la única vasculatura diferenciada del brote

apical está muy alejada de esta zona. Pero no está claro si esta ausencia de virus refleja una reducción de la eficiencia en la replicación en las células meristemáticas o una restricción activa o pasiva al virus desde el meristemo (Cohen y col., 2000a). Estos ejemplos de ausencia de virus en el meristemo con los virus MSV (Lucy y col., 1996), y el BDMV (Wang y col., 1996), demostraron en ambos casos que el virus se acumulaba en el protofloema del brote apical de la planta. En el MSV se observó que el virus penetra en los haces vasculares de las hojas en desarrollo a partir de aproximadamente el quinto primordio de hoja (plastocron) separado del meristemo (Lucy y col.,1996).

Sin embargo, se han descrito varios casos en los que el virus sí infecta el tejido meristemático del brote apical. Walkey y Webb en 1968, realizaron un experimento en el que observaron al microscopio electrónico homogenados de meristemos apicales de plantas infectadas con varios nepovirus, y demostraron la presencia de partículas e inclusos túbulos del CLRV y del *Virus de las manchas en anillo latentes de la fresa* (SLRSV) y partículas sólo del CMV en el meristemo ápical de distintos huéspedes. Estos resultados son razonados sobre la base de que se trata de infecciones virales muy agresivas donde la tasa de movimiento célula a célula por el virus es probablemente más rápida que el crecimiento del ápice lejos de la infección (Maule, 1999). Recientemente, se ha descrito otro caso de infección del meristemo, con el TCV en *Arabidopsis*, donde construcciones del TCV con la GFP fusionada eran capaces de invadir las células del meristemo en plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresaban la CP del TCV (Cohen y col., 2000a). En este caso, se discute que la presencia de la CP del TCV en las células meristemáticas podría facilitar el movimiento de las construcciones del TCV expresando GFP (Cohen y col., 2000a).

El meristemo apical es una parte integral de cuerpo de la planta y recientes investigaciones sugieren que las partes maduras de la planta afectan a la actividad del meristemo (Poething, 1997; Schiefelbein y col., 1997), a través de señales procedentes de tejidos maduros que son transportadas vía plasmodesmos (Gilbertson y Lucas,

1996). Los meristemos apicales determinan el número y la posición de las células indiferenciadas durante la formación de órganos y su diferenciación final. (Clark, 1997). Por tanto, se ha demostrado que la infección sistémica de un cultivar de patata con una estirpe necrótica del *Virus Y de la patata* (PVY^{NTN}), causante de la enfermedad del las manchas necróticas en anillo del tubérculo de la patata (PTNRD) (Le Romancer y col., 1994), no infectan el meristemo apical de la planta pero sí producen cambios en la estructura y en la actividad mitótica de éste. Estos cambios afectaron sobre todo a la zona periférica del meristemo, la cual está encargada de la inducción de los primordios foliares. Estas alteraciones eran consecuencia de cambios en las pautas de las señales procedentes de tejidos maduros a consecuencia de la infección (Dolenc y col., 2000).

En cuanto a las semillas, la transmisión por semilla ocurre cuando el virus accede al embrión, persiste durante el desarrollo y maduración de la semilla y reaparece como una infección después de la germinación. Pero la invasión directa del embrión después de la fertilización, es una ruta difícil ya que no existe una conexión simplástica entre el embrión y el tejido maternal (Thorne, 1986; Maule y Wang, 1996; Imlau y col., 1999). Así, en la mayoría de las interacciones virus-planta se describe que el virus no infecta el embrión en la semilla, previniendo así la transmisión por semilla (Melcher, 1989; Lartey y col., 1997; Sudarshana y col., 1998; Cohen y col., 2000a). Sin embargo, sí se ha demostrado claramente que el *Virus transmitido por semilla del mosaico del guisante* (PSbMV), altamente transmisible por semilla en guisante, es capaz de entrar en el embrión a través del suspensor que conecta el tejido maternal con el embrión (Wang y Maule, 1994; 1997).

Justificación y objetivos

2. Justificación y objetivos

A efectos prácticos, la importancia de una determinada virosis viene condicionada por la capacidad del virus de invadir sistémicamente la planta. Esta invasión depende tanto de su capacidad para replicarse en células inicialmente infectadas como del movimiento a corta y a larga distancia. Durante el curso de una infección viral sistémica, los virus se replican y posteriormente se mueven de una célula a otra vía plasmodesmos y alcazan las partes distales de la planta a través del sistema vascular. Dado que una infección de este tipo resulta de la participación de tres componentes distintos (virus, planta y factores medioambientales) la distribución final del virus en la planta dependerá no sólo de la *competencia* del virus sino también de la presencia/ausencia de determinados factores del huésped y de las condiciones ambientales en las que ocurra dicha interacción. Durante la última década se han estudiado, con gran profundidad, los factores virales implicados tanto en el movimiento a corta como a larga distancia. Sin embargo, los factores del huésped así como la influencia de las condiciones ambientales en la translocación de los virus han empezado a ser abordados sólo muy recientemente. **El objetivo global de esta memoria se ha centrado en el estudio del movimiento a larga distancia del virus del moteado del clavel (CarMV) y la influencia de determinados factores ambientales en su distribución final en su huésped natural clavel y un huésped experimental, *Chenopodium quinoa*.**

Se ha elegido al CarMV como objeto de estudio por diversas razones complementarias: i) es un virus de gran repercusión económica; ii) es muy estable y posee el menor tamaño de genoma de entre los virus de plantas y iii) se acumula a una concentración elevada en su huésped natural lo que facilita, sin duda, los estudios celulares.

Aunque el mecanismo de expresión de los Carmovirus se conoce con cierta profundidad, los estudios sobre la cinética de la acumulación *in vivo* de los RNAs genómicos, subgenómicos y sus productos de traducción son escasos, especialmente para su miembro tipo, el CarMV. Puesto que el éxito en el establecimiento de una infección viral y su progresión en un huésped susceptible depende en primer lugar de la eficiencia de la expresión espacial y temporal coordinada de los genes virales, se plantea como **primer objetivo: el estudio de la cinética de acumulación y la distribución espacio-temporal de las cadenas positivas y negativas de los RNAs genómico y subgenómicos del CarMV, así como de sus productos de traducción: la proteína de cubierta (CP) y de movimiento (P7) y su localización subcelular.**

En comparación con los numerosos trabajos que hay sobre el movimiento célula a célula, hay significativamente menos estudios que describan el movimiento del virus en el sistema vascular y su acumulación a través de la planta a nivel del tejido. Una de las razones por las cuales ha sido poco estudiado, es la falta de técnicas fiables y sencillas, que permitian una visión macroscópica de la distribución del virus en los tejidos. Por ello, en esta memoria se ha aplicado la técnica de hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido en combinación con las de inmunocitoquímica e hibridación in situ sobre material vegetal incluido en parafina. Por tanto, como segundo objetivo se plantea el estudio del movimiento a larga distancia del CarMV en su huésped natural clavel, mediante un análisis espacio-temporal de las pautas de acumulación del CarMV en la infección sistémica de plantas de clavel inoculadas, así como en su infección natural.

En la mayoría de los casos, la especificidad del virus por un tejido de la planta está determinada por su accesibilidad. Se sabe que la mayoría de los virus utilizan el floema para su transporte a larga distancia, pero existen zonas de la planta como el meristemo apical que al carecer de una vasculatura, no permite la entrada del virus a través del floema, por lo que en la mayoría de los casos estudiados, tanto de virus como de viroides, se describe que no son capaces de infectar el meristemo apical.

Sólo algunos nepovirus han sido descritos con capacidad de infectar el meristemo apical en diferentes huéspedes. Por tanto se plantea como tercer objetivo de nuestro trabajo el estudio de la distribución del CarMV en el brote apical de plantas de clavel y sus limitaciones en la infección del meristemo, tanto de plantas inoculadas como procedentes de una infección natural.

Se ha demostrado para diferentes combinaciones virus-huésped que el movimiento viral a corta y a larga distancia está modulado por los mecanismos de regulación del desarrollo del huésped y los factores ambientales. Las condiciones ambientales antes de la inoculación, en el momento de la inoculación y durante el curso de la infección tienen grandes efectos sobre el desarrollo de la infección. La transmisión del virus, su replicación y su translocación dentro de la planta, así como la susceptibilidad del huésped y la sintomatología, están afectados por la luz, la temperatura y los aportes de agua, entre otros factores. **El cuarto objetivo de este trabajo se basa en el estudio del movimiento a larga distancia del CarMV en la interacción *Chenopodium quinoa*-CarMV, con el fin de determinar los factores ambientales y las barreras celulares o de tejidos que están mediando la infección viral sistémica.**

Capítulo I

Análisis Espacio-Temporal de la Acumulación de los RNAs y Proteínas de Cubierta y Movimiento (p7) del *Virus del moteado del clavel* (CarMV) en *Chenopodium quinoa*.

1. INTRODUCCIÓN

El *Virus del moteado del clavel* (CarMV) es el miembro tipo del género Carmovirus perteneciente a la familia Tombusviridae de virus de plantas. Es un virus icosaédrico de 30 nm de diámetro, que posee un genoma monopartito de RNA de sentido positivo y simple cadena con un tamaño aproximado de 4 Kb. El análisis de su genoma revela la presencia de cinco marcos de lectura abierta (ORFs) ("open reading frames"). El ORF más cercano al extremo 5´ (p27) y su producto de lectura a través ("read through") (p86), parecen ser, por homología con el *Virus del arrugamiento del nabo* (TCV) (White y col., 1995), esenciales para la replicación del genoma. El ORF más próximo al extremo 3´ codifica para la CP de 38-kD (Morris y Carrington 1988; Russo y col., 1994). En la parte central del genoma se sitúan dos pequeños ORFs solapantes (p7 y p9) que, según lo descrito para el TCV (Hacker y col., 1992; Li y col., 1998), se asume que se requieren para el movimiento célula a célula. Recientemente, trabajos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto que la p7 del CarMV tiene propiedades de unión a RNA (Marcos y col., 1999; Vilar y col., 2001). Análisis de complementación han demostrado que estas dos proteínas deben actuar en trans para mediar en el movimiento célula a célula (Li y col., 1998). La proteína p8 del TCV (equivalente a la p7 del CarMV) se ha localizado en las fracciones particuladas de un extracto proteico de plantas infectadas indicando su posible asociación a estructuras membranosas (Li y col., 1998). Además de su asociación a dichas estructuras membranosas, en la mayoría de los casos, las proteínas de movimiento virales muestran una cinética transitoria acorde con su función temprana en el ciclo de infección [ej: la MP del *Virus del mosaico de la alfalfa* (AlMV), (Berna y col., 1986), *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) (Deom y col., 1990), *Virus del mosaico necrótico del clavel rojo* (RCNMV) (Osman y Buck, 1991) y *Virus del mosaico del pepino* (CMV) (Vaquero y col., 1996)].

Al igual que el resto de los virus de RNA multicistrónicos, el CarMV traduce los ORFs que no son 5´ proximales a través de RNAs subgenómicos 3´coterminales. Así,

tanto la CP como las proteínas p7 y p9 se sintetizan a través de dos RNAs subgenómicos de 1,5 y 1,7 Kb, respectivamente.

Se han descrito dos modelos distintos para la síntesis de los RNAs subgenómicos. En el primero de ellos, dichos RNAs se obtendrían a través de un mecanismo de iniciación interna a partir de secuencias promotoras localizadas en la cadena negativa de longitud completa [ej. *Virus del mosaico del bromo* (BMV) (Miller y col., 1985); AIMV (Gargouri y col., 1989); *Virus del mosaico amarillo del nabo*, (van der Kuyl y col., 1990)]. En el segundo mecanismo, descrito en los coronavirus (Spaan y col., 1983; Baric y col., 1985; Lai y col., 1984; Lai,1990; Zhang y col., 1994) se postula que los RNAs subgenómicos se sintetizarían mediante transcripción discontinua a partir de un cebador guía. En el caso mejor estudiado dentro del grupo de los Carmovirus, el TCV, un virus estrechamente relacionado con el CarMV, se ha puesto de manifiesto que las secuencias promotoras de los RNAs subgenómicos no se encuentran localizadas en éstos por lo que su replicación no sería presumible, a priori (Wang y Simón, 1997) y se ha postulado, por tanto, un mecanismo de iniciación interna. En general, existen pocos datos *in vivo* en el grupo de los *Carmovirus* acerca de la cinética de acumulación de las cadenas positivas y negativas de los RNAs genómicos y subgenómicos y de sus productos de traducción, que pudieran dar algunas evidencias, aunque indirectas, sobre el mecanismo de síntesis de los RNAs subgenómicos. En este capítulo, además de abordar esta cuestión, se estudia la distribución espacio-temporal de las cadenas positivas y negativas de los RNAs del CarMV y la localización subcelular de la p7 y CP sintetizadas a partir de los RNAs subgenómicos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento e inoculación

Las semillas de *Chenopodium quinoa* fueron germinadas en una cámara de cultivo con un ciclo de luz de 16 h, temperaturas durante el día y la noche de 25ºC y 18ºC, una humedad relativa durante el día y la noche de 70% y 80%, respectivamente y con una irradiación de 210 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. Transcurrida una semana, el semillero fue transplantado a macetas que se mantuvieron en cámara de cultivo hasta que las plantas alcanzaron el estado de seis hojas. Como fuente de inóculo se utilizó el aislado "Dixie" del *Virus del moteado del clavel* (CarMV-Dix), obtenido y clonado biológicamente con anterioridad a partir de una infección natural de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*, cv. Dixie) (Sánchez-Navarro y col., 1996). El virus se propagó y purificó a partir de plantas de *Chenopodium quinoa*, como se describe en Díez y col., (1998). Las inoculaciones se realizaron con 20 µg/ml de virión purificado en tampón fosfato potásico 20 mM (pH 7.0) y utilizando carborundum como agente abrasivo para dañar la superficie de la hoja. Se inocularon dos hojas por planta, la tercera y cuarta hoja verdadera. Tras la aplicación del inóculo, las hojas se lavaron suavemente con agua. Los controles de plantas sanas fueron inoculados con tampón.

2.2. Fraccionamiento subcelular

Se obtuvieron fracciones subcelulares de hojas de plantas inoculadas y no inoculadas de *Chenopodium quinoa* a diferentes días post-inoculación (dpi) (2, 4, 9), esencialmente mediante el procedimiento que describe Donald y col. (1993) y Más y col. (2000). En este proceso 1 g de tejido fue homogeneizado con nitrógeno líquido y resuspendido en 4 ml del tampón de extracción de proteínas (sacarosa 400 mM, Tris-HCl 100 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, glicerol al 10%, ß-mercaptoetanol 10 mM, phenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, pH 7.5). El homogeneizado fue filtrado a través de una malla de nylon y el filtrado se centrifugó a 1000xg durante 10 min con lo que se

obtuvo la fracción P1 (enriquecida en plastidios y núcleos) y el sobrenadante S1. Después la fracción S1 fue centrifugada a 30000xg para separar la fracción citosólica (S30, sedimento) de la fracción membranosa (P30). La fracción de la pared celular (CW) se obtuvo a partir de los restos de la filtración que quedaron sobre la malla de nylon. Estos restos se lavaron con el tampón de extracción de proteínas anterior conteniendo un 2% de Tritón X-100 en repetidos ciclos de centrifugación (10000xg) y resuspensión (3-4 veces). Los sedimentos P1 y P30 se resuspendieron en 200 µl de tampón Laemmli 1x individualmente, mientras que la fracción CW se resuspendió en 400 µl de tampón Laemmli 1x debido a la dificultades para resuspender el sedimento. El sobrenadante S30 fue ajustado al tampón Laemmli 1x con el 5x de este mismo tampón. Estas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blotting, tal y como se describe en el apartado 2.3. Los resultados fueron densitometrados.

2.3. Análisis tipo Western de proteínas

Se tomaron muestras de hoja sana e inoculada de *Chenopodium quinoa* a diferentes dpi (1-10), que fueron procesadas para el análisis tipo Western como se describe previamente (Balsalobre y col., 1997; Marcos y col., 1999). Para ello, las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 18% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970). Así 1 gr de tejido de cada muestra fue homogeneizado con nitrógeno líquido, resuspendido en 1 vol de tampón Laemmli (glicerol 10%, ß-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Tris-HCl 0.125 M, 0.1% SDS pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%) y se desnaturalizaron a 100ºC durante 3 min. A continuación, las electroforesis se realizaron en geles discontinuos compuestos de un gel concentrador (250 µl de acrilamida:bisacrilamida al 40%, 500 µl de Tris-HCl 0.5 M, 0.4% SDS pH 6.8, 1.25 ml de agua) que se polimerizó con 20 µl de persulfato amónico al 10% (p/v) y 2 µl de Temed (Sigma) y un gel separador (2,25 ml de acrilamida:bisacrilamida al 40%, 1.25 ml de Tris-HCl 1.5 M, 0.4% SDS, pH 8.8, 1.45 ml de agua) al que se le añadieron para la polimerización 50 µl de persulfato amónico

al 10% (p/v) y 2 µl de Temed (Sigma). Las electroforesis se realizaron en tampón TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3, SDS 0,1%) a 200V durante 1 h.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell, Inc., Keene, NH), usando los sistemas MiniPROTEAN II y MiniTransblot cell (BioRad Lab., Hercules, CA, USA). La electrotransferencia fue llevada a cabo en 10 mM CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic-acid) (Sigma, St. Luis, Mo., USA) pH 11.0, 3 mM DTT (dithiothreitol, Sigma), 0.02% de SDS y 20% de methanol, durante 2 h a 100V. La inmunodetección de la CP y MP del CarMV se realizó, en primer lugar, bloqueando los sitios inespecíficos de unión, incubando las membranas con 2% de BSA en TBST (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) durante 45 min. Como anticuerpos primarios se utilizarón dos anticuerpos: un anticuerpo contra viriones del CarMV que fue amablemente proporcionado por los Drs. J.A. Daròs y R. Flores (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Valencia) diluido 1:5000 en 2% de BSA en TBST y un anticuerpo contra la p7 del CarMV (Marcos y col., 1999) diluido 1:10.000. Después de 1 h y 15 min de incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron en TBST (3 x 10 min) y se incubaron durante 45 min con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) diluido 1:10.000 en 2% de BSA en TBST. Para el revelado de la membrana, después de repetir los lavados en TBST y dos lavados de 5 min en el tampón de equilibrado (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9.5), se añadió el substrato quimioluminiscente CDP-Star™ (Boehringer Mannheim, Alemania) diluido 1:100 en el tampón de equilibrado. Las membranas se incubaron en oscuridad durante 5 min en 5 ml de solución/100 cm^2 de membrana. Posteriormente, tras retirar el substrato, se expuso frente a una película Kodak X-Omat AR durante 15-60 min.

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos primarios, se utilizaron extractos de proteínas totales de planta sana, proteína p7 purificada (Marcos y col., 1999) y proteína de cubierta del CarMV obtenida a partir de virión purificado en

tampón Laemmli 1x y calentando a 100ºC durante 3 min. Las bandas de proteínas obtenidas en las películas fueron densitometradas.

2.4. Análisis Northern-blot

2.4.1. Obtención, separación y transferencia de preparaciones de ácidos nucleicos totales de material vegetal a membranas de nylon.

Se tomaron muestras de hoja sana e inoculada de *Chenopodium quinoa* a diferentes horas post-inoculación (0-36) y dpi (1-11), que fueron procesadas para la obtención de sus ácidos nucleicos totales tal y como se describe en Verwoed y col, (1989). Para ello las muestras se homogeneizaron con nitrógeno líquido en un mortero, después se añadió 1 vol de tampón extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1%, LiCl 100 mM) y 1 vol de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a 80ºC. El homogenado se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y se extrajo la fase acuosa a la que se añadió 1 vol de 4 M LiCl y se incubó en un baño de hielo a 4ºC durante al menos 8 h. Tras una centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min, el sedimento se precipitó en etanol y se resuspendió en un volumen apropiado de agua estéril y se almacenó a –20ºC hasta su uso posterior. Este sedimento contenía preferentemente los RNAs de mayor tamaño mientras que el sobrenadante contenía mayoritariamente el DNA y los RNAs de pequeño tamaño y de alta estructura secundaria. Cantidades equivalentes de estos RNAs totales fueron desnaturalizados, según el método de McMaster y Carmichel (1977), mediante su incubación a 55ºC durante 1 hora con 3 vol de una mezcla desnaturalizante compuesta de 50 µl de dimetilsulfóxido, 20 µl de glioxal desionizado y 14 µl de Hepes 10x (Hepes 0.2 M, EDTA 10 mM, pH 7.0). Estos RNAs desnaturalizados se separaron en un gel de agarosa-Hepes al 1% (Pallás y col., 1992), a una intensidad de corriente constante no superior a 15 mA durante aproximadamente 3 horas. Tras la electroforesis, los geles se incubaron con una solución de NaOH 50 mM durante 15 min y se neutralizaron con ácido acético/acetato sódico 50 mM durante otros 15 min. A continuación los RNAs se

transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) por capilaridad en tampón 10x SSC (NaCl 1.5 M, citrato sódico 0.15 M pH 7.0), siguiendo el protocolo estándar descrito por Sambrook y col. (1989). Después de mantener la transferencia durante 8-12 h, se lavaron las membranas brevemente en 2x SSC y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 min para después fijar los RNAs a las membrana mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 min utilizando un transiluminador (Vilbert Lourmat).

2.4.2. Síntesis de las sondas positiva y negativa de RNA del CarMV marcadas con digoxigenina.

La síntesis de las sondas de RNA del CarMV marcadas con digoxigenina fue llevada a cabo como se describe en Pallás y col. (1998). Se utilizaron dos sondas diferentes del CarMV marcadas con digoxigenina (Fig. 1), con el fin de detectar la acumulación del RNA genómico y los RNAs subgenómicos de polaridad positiva y negativa del CarMV. Para detectar las cadenas de polaridad positiva se sintetizó una sonda a partir del clon pCarM Ec3 (Marcos y col., 1999), correspondiente al extremo 3´del genoma del CarMV de aproximadamente 1 Kb, que no contiene la secuencia entera de la proteína de cubierta (CP). Mientras que para detectar las cadenas de polaridad negativa se utilizó otro clon distinto, el pCarM CP, que se corresponde con la secuencia de la CP sin el extremo 3´del RNA genómico del CarMV.

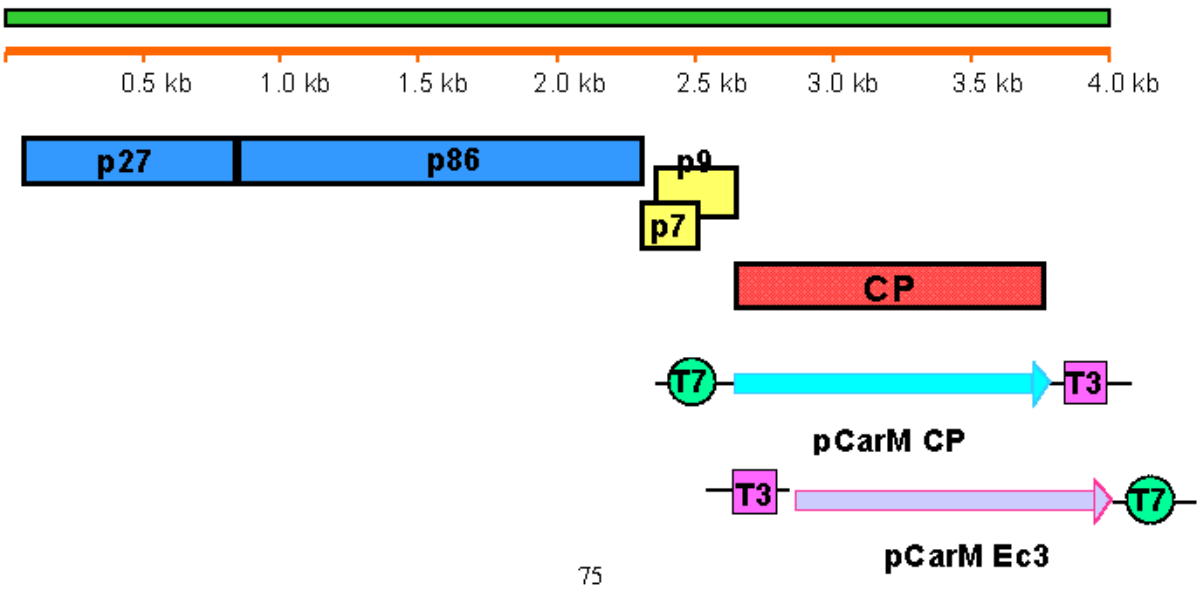


FIGURA 1. Representación esquemática de la localización en el genoma del CarMV de los clones utilizados para la síntesis de las sondas que reconocen las cadenas positivas (pCarM Ec3) y negativas (pCarM CP) de los RNAs del CarMV. El rectángulo verde representa el RNA genómico del CarMV completo, con una escala donde se sitúan debajo mediante rectángulos mayores las proteínas que codifica el genoma en su posición exacta en el RNA. Las barras con punta de flecha representan los clones a partir de los cuales se síntetizan las sondas utilizadas, se sitúan en la posición y longitud exacta que contienen del genoma. Obsérvese cómo el clon pCarM CP contiene la secuencia completa de la CP, mientras que el clon pCarM Ec3 contiene la secuencia incompleta de la CP y el extremo 3´del RNA genómico. Ambos clones son de igual tamaño, aproximadamente 1Kb.

La síntesis de estos clones se realizó amplificando fragmentos de DNA utilizando como molde el RNA genómico del CarMV, mediante una estrategia de transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando los cebadores específicos. Dichos fragmentos se insertaron en el plásmido vector Bluescript II KS +/- (Stratagene Inc.), obteniéndose así los plásmidos pCarM Ec3 (Marcos y col., 1999) y pCarM CP. Estos plásmidos contienen los promotores para las polimerasas de RNA de los fagos T3 y T7 a ambos lados del inserto del virus. La linearización de los plásmidos se realizó con la enzima Eco RI para el clon pCarM Ec3 y con la Pst I para el clon pCarM CP. Esta última enzima deja extremos protuberantes y por ello el plásmido digerido resultante fue tratado después con la DNA polimerasa T4 y una mezcla de dNTPs 1 mM, antes de su purificación. Tras purificar los plásmidos digeridos mediante doble extracción fenólica y precipitación con etanol, se realizó la reacción de transcripción utilizando 1 µg del plásmido linearizado y añadiendo 2 µl de la mezcla de nucleótidos 10 x (ATP, CTP, GTP 10 mM, UTP 6,5 mM, dig-UTP 3,5 mM, Boehringer Mannheim), 2 µl del tampón de transcripción 10 x (Tris-HCl 400 mM, pH 8.0 (20ºC), $MgCl_2$ 60 mM, dithiothreitol (DTT) 100 mM, espermidina 20 mM) (Boehringer Mannheim), 40 U de inhibidor de RNasa (Promega) y 40 U de la RNA polimerasa del fago T7 (Boehringer Mannheim) en un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 37ºC durante 1 h y 30 min. Por último, antes de precipitar las sondas en etanol se trataron con DNasa RQ1 (Promega) durante 15 min a 37ºC, para

eliminar el plásmido linearizado. La concentracción de las sondas se comprobó mediante un gel de agarosa-TAE al 1%.

2.4.3. Hibridación y detección inmunológica.

La hibridación molecular utilizando sondas marcadas con digoxigenina, su posterior detección inmunológica y su revelado quimioluminiscente se realizó siguiendo esencialmente el protocolo descrito por Pallás y col. (1998). En primer lugar, se realizó un bloqueo de los sitios inespecíficos de unión, incubando las membranas de nylon en un horno de hibridación (*Hybridiser HB-2D, Techne*) a 68ºC durante 2-3 h con la solución de prehibridación (5 ml/100 cm^2 de membrana) compuesta de 50% de formamida desionizada, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM, pH 7.0), N-lauroilsarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v) y 2x agente bloqueante (Boehringer Mannheim). 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-RNA (50-100 ng/ml). Las membranas se incubaron en dicha solución a 68ºC durante al menos 8 h. Tras realizar la hibridación, las membranas se lavaron 2x 5 min a temperatura ambiente con 2x SSC y SDS 0,1 % y a continuación 2x 15 min a 68 ºC con 0,1x SSC y SDS 0,1 %.

La detección inmunológica se realizó incubando las membranas 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 (Boehringer Mannheim) al 1% 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 un anticuerpo anti-digoxigenina unido a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim), diluido 1:10.000 en la solución de bloqueo. Para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron 2x 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, $MgCl_2$ 50 mM, pH 9.5). Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente.

El revelado quimioluminiscente. de las membranas se realizó utilizando el substrato quimioluminiscente Lumigen CSPD ® [Tropix,, (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro) triciclo[3.3.1.1^{3,7}] decano}-4-il) fenil fosfato) (Boehringer Mannheim)]. Las membranas se incubaron en oscuridad en una bolsa de plástico con una dilución del substrato 1:100 en el tampón de equilibrado, durante 5 min. Después de retirar el substrato se incubaron durante 15-20 min a 37ºC, para después exponer las membranas frente a una película Kodak X-Omat AR durante aproximadamente 15 min. Adicionalmente, se realizaron exposiciones más largas de 2-3 h. Las bandas de RNA obtenidas fueron cuantificadas por densitometría de las películas.

En cuanto a los controles de la hibridación, se utilizaron extractos de RNA totales de planta sana, el RNA viral y los transcritos fríos (sin digoxigenina) de cada una de las polaridades. La extracción del RNA viral se realizó mediante el procedimiento de la proteinasa K basado en Carrington y Morris (1994). Para ello el virus purificado fue incubado con proteinasa K (4 mg/ml) en tampón (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.6) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.5% durante 1 h a 37ºC y los RNAs se obtuvieron mediante doble extracción fenólica y se precipitaron en etanol. Los transcritos fríos de las dos polaridades se obtuvieron a partir del clon pCarM CP. La polaridad positiva se obtuvo por digestión del plásmido con la enzima de restricción Pst I y transcripción con la RNA polimerasa del fago T7, mientras que la polaridad negativa se obtuvo con la enzima de restricción Xba1 y la RNA polimerasa del fago T3.

2.5. Hibridación *in situ*

2.5.1. Fijación e inclusión de las muestras

Muestras de hojas de *Chenopodium quinoa* sanas e inoculadas con el CarMV a diferentes dpi (4, 6 y 11) fueron fijadas e incluidas en parafina (Fig. 2). La fijación fue llevada a cabo en fijador Karnovsky (Karnovsky, 1965) constituido por una mezcla de p-

formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2) durante 4 horas a 4ºC y la infiltración se realizó a vacío durante 3 min. A continuación, las muestras fueron lavadas en el mismo tampón, deshidratadas en una serie progresiva de alcohol terbutílico e infiltradas e incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sherwood Medical Co., St Louis, Mo. USA). Se obtuvieron secciones de 8-10 µm de los bloques de parafina con un microtomo rotatorio Reichert-Jung 2030. Las secciones fueron adheridas a portaobjetos, previamente recubiertos con un adhesivo (TESPA, 3-amino-propil-trietoxi-silano) (Sigma), por calentamiento a 40ºC sobre una placa calefactora.

2.5.2. Hibridación *in situ*

Las secciones adheridas a los portaobjetos fueron desparafinadas con xilol (2x 5 min cada uno) e hidratadas a través de una serie decreciente de etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 30%) hasta agua. Antes de la incubación con la sonda estas secciones fueron pretratadas con 0.2 M HCl durante 20 min, lavadas en agua destilada, tampón 2x SSC (1x SSC es 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato sódico, pH 7.0) y de nuevo agua destilada, 5 min en cada lavado. A continuación fueron incubadas con proteinasa K (1 µg/ml en 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8.0) durante 30 min a 37ºC y después se lavaron en PBS (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7.0) durante 2 min. La proteinasa K fue bloqueada con glycina (2 mg/ml) en PBS durante 2 min y de nuevo se realizaron dos lavados en PBS de 30 segundos cada uno. Posteriormente las muestras fueron fijadas en paraformaldehido al 4% durante 12 min y lavadas durante 5 min en PBS dos veces. Seguidamente las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol y secadas al aire.

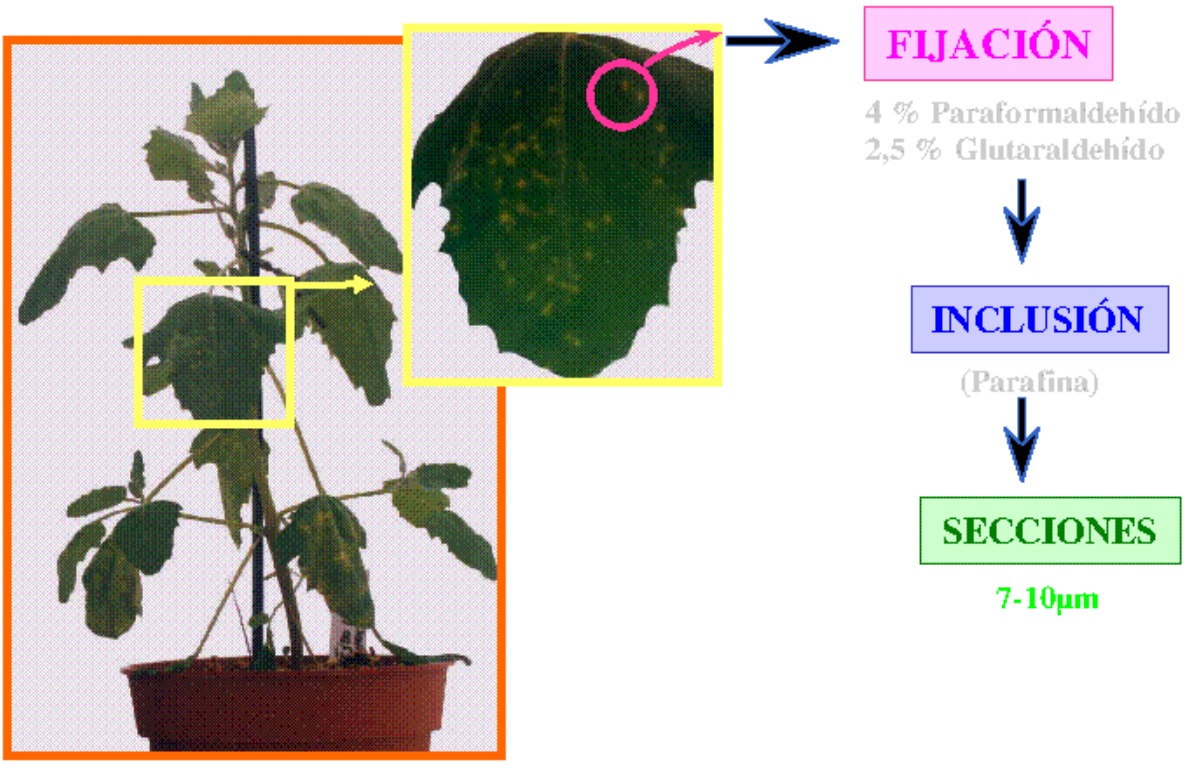


FIGURA 2. Representación esquemática del procesamiento del material vegetal para la hibridación *in situ*. En las fotografías se muestra una planta de *C. quinoa* inoculada con CarMV a 6 dpi. **(IL)** hoja inoculada.

La solución de hibridación contenía un 50% de formamida desionizada, 6x SSC, 3% de SDS, 0.1 mg/ml de t-RNA de levadura y una concentración de sonda de 200 ng/ml. Se realizó una prehibridación de una hora con la misma solución de hibridación pero sin sonda y sin t-RNA de levadura, a 55ºC. Se utilizaron las dos sondas descritas en el apartado 2.4.2. del northern-blot, para localizar las cadenas positivas y negativas del genoma del CarMV. Antes de usar las sondas fueron desnaturalizadas durante 3 min a 80ºC y después se incubaron en hielo. La hibridación fue llevada a cabo en cámara húmeda a 55ºC durante toda la noche. A continuación, tras dos lavados de 5 min cada uno en 2x SSC y 0.1% de SDS a temperatura ambiente y dos lavados más en 0.2x SSC y 0.1% de SDS de 10 min cada uno a 55ºC, las secciones se tamponaron 5 min en tampón TBS (100 mM Tris-HCl y 400 mM NaCl, pH 7.5) y fueron pre-incubadas en una solución bloqueante que contenía 0.5% de BSA/TBS durante una hora. La sonda hibridada fue

detectada por incubación con un anticuerpo de oveja anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) a una dilución 1:500 en 0.5% de BSA en tampón TBS durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en TBS y un lavado de 15 min en el tampón de equilibrado (100 mM Trish-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5).

Para la detección colorigénica, las secciones fueron incubadas con NBT-BCIP (cloruro de azul de nitrotetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Boehringer Mannheim) a una dilución 1:50 en el tampón de equilibrado. La reacción se llevó a cabo durante aproximadamente 30 min y fue parada con agua destilada. A continuación, las secciones fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 95%, 100%), inmersas en xilol y montadas, usando Merckoglas (Merck, Darmstad, Alemania) como montante. Las secciones fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio óptico DMRB LEITZ (Leica microsistemas S.A., Barcelona). La película fotográfica utilizada fue de 100 asa de la marca Kodak.

La especificidad de las sondas se comprobó mediante la utilización de varios controles: planta inoculada con tampón libre de virus y planta infectada sin incubar con las sondas.

3. RESULTADOS.

3.1. Cinética de la acumulación de la CP, MP y los RNAs virales del CarMV en hojas inoculadas de *Chenopodium quinoa*.

Plantas de *Chenopodium quinoa* con dos semanas de edad fueron inoculadas con CarMV y con tampón. Se tomaron muestras a diferentes días post-inoculación (dpi) de las hojas inoculadas para hacer un estudio de la cinética de acumulación de la CP, MP y los RNAs virales del CarMV.

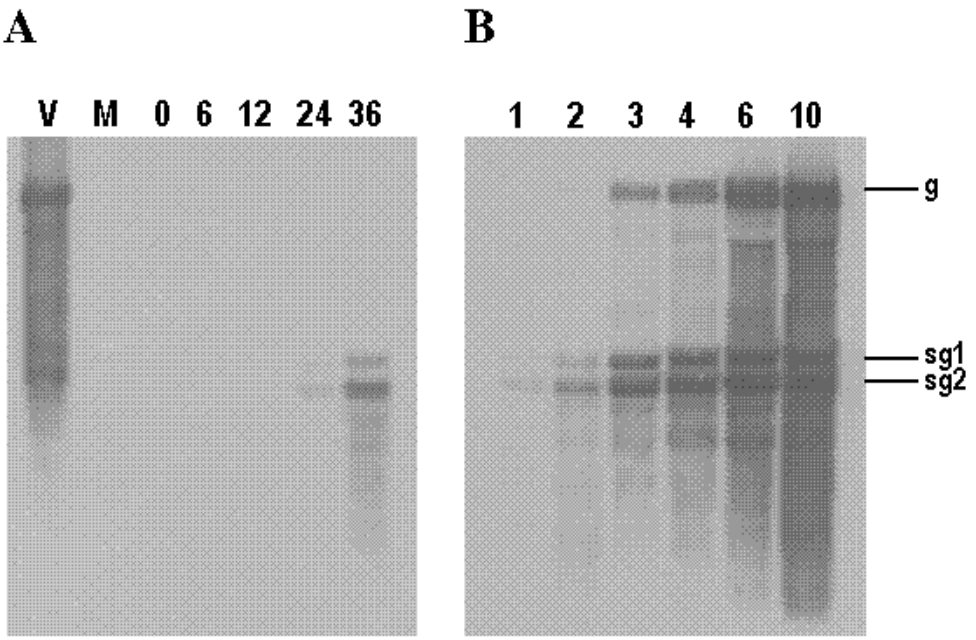


FIGURA 3. Cinética de acumulación del RNA genómico y los RNAs subgenómicos del CarMV. Análisis tipo Northern-blot de extractos de RNA totales de hoja inoculada de *Chenopodium quinoa* a diferentes horas (A) y días post-inoculación (B). Las membranas fueron hibridadas con una sonda de RNA marcada con digoxigenina que reconoce las cadenas positivas, correspondiente al extremo 3´ del RNA genómico del CarMV (clon pCarM Ec3). **(V)** RNA viral purificado a partir de virión como control positivo. **(M)** Extracto de RNA totales de hoja de plantas inoculadas con tampón. **(g)** RNA genómico del CarMV. **(sg1)** RNA subgenómico 1 de 1,7 Kb que dirige la traducción de la p7 del CarMV. **(sg2).** RNA subgenómico 2 de 1,5 Kb que dirige la traducción de la CP del CarMV. Obsérvese cómo los RNAs subgenómicos se acumulan antes que el RNA genómico y que el **sg2** se acumula más que el **sg1** en los primeros dpi. **(0-36)** hpi y **(1-10)** dpi.

Los análisis de Northern-blot (Fig. 3) mostraron una banda de hibridación muy débil correspondiente a la longitud del RNA genómico viral (4003 nt) a los 2 dpi en hojas inoculadas, mientras que a partir de 3 dpi en adelante se observó un notable aumento (Fig. 3B). Los RNA subgenómicos sin embargo fueron detectados en estadíos más tempranos en la infección (24 horas post-inoculación) (Fig. 3A). A 24 h post-inoculación el RNA subgenómico más pequeño de aproximadamente 1.5 kb que dirige la traducción de la CP, mostró una mayor acumulación (2 veces más) que el RNA subgenómico de 1.7 kb que dirige la traducción de la p7. Los niveles de acumulación de los subgenómicos continuaron aumentado en los siguientes dpi, pero entre 4-6 dpi

comenzaron a estabilizarse, mientras que el RNA genómico se encontraba en la etapa de aumento más acusado (Fig. 4). En los últimos estadíos de la infección (6-10 dpi), los niveles de acumulación de los RNAs subgenómicos se habían igualado y el RNA genómico superaba los niveles de acumulación de los RNAs subgenómicos (Figs. 3B y 4).

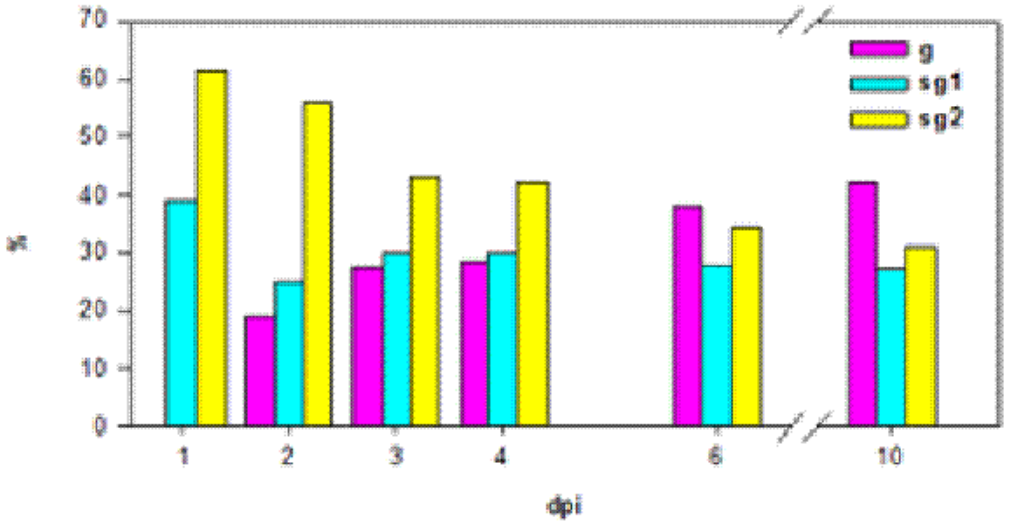


FIGURA 4. Acumulación relativa del RNA genómico y los RNAs subgenómicos del CarMV a diferentes días post-inoculación. (g) RNA genómico del CarMV. **(sg1)** RNA subgenómico 1 de 1,7 Kb que dirige la traducción de la p7 del CarMV. **(sg2).** RNA subgenómico 2 de 1,5 Kb que dirige la traducción de la CP del CarMV.

Mediante los análisis de Western-blot (Fig. 5) se observó que la cinética de acumulación de la CP y MP del CarMV eran muy similares. Ambas proteínas fueron detectadas en las hojas inoculadas en estadíos muy tempranos de la infección, a 2 dpi (Fig. 5A y B, carril 2), momento en el que aún no son visibles las lesiones cloróticas en las hojas inoculadas. Estas proteínas continuaron acumulándose durante todo el tiempo del experimento, hasta los 10 dpi. No obstante, el incremento de la

acumulación de la MP fue mucho más importante en los últimos estadíos de la infección (6-10 dpi) (Fig. 6A), mientras que el de la CP fue más uniforme desde los primeros estadíos (Fig. 6A). Así entre 4-6 dpi el incremento de la CP fue menor que el de la MP (Fig. 6A). A 10 dpi ambas proteínas alcanzaron su máximo (Fig. 6A). La fiabilidad de los análisis serológicos anteriores queda reflejada por la ausencia de las bandas con movilidad electroforética similar a la MP o CP en los extractos de hoja de plantas inoculadas con tampón (Fig. 5, carril M).

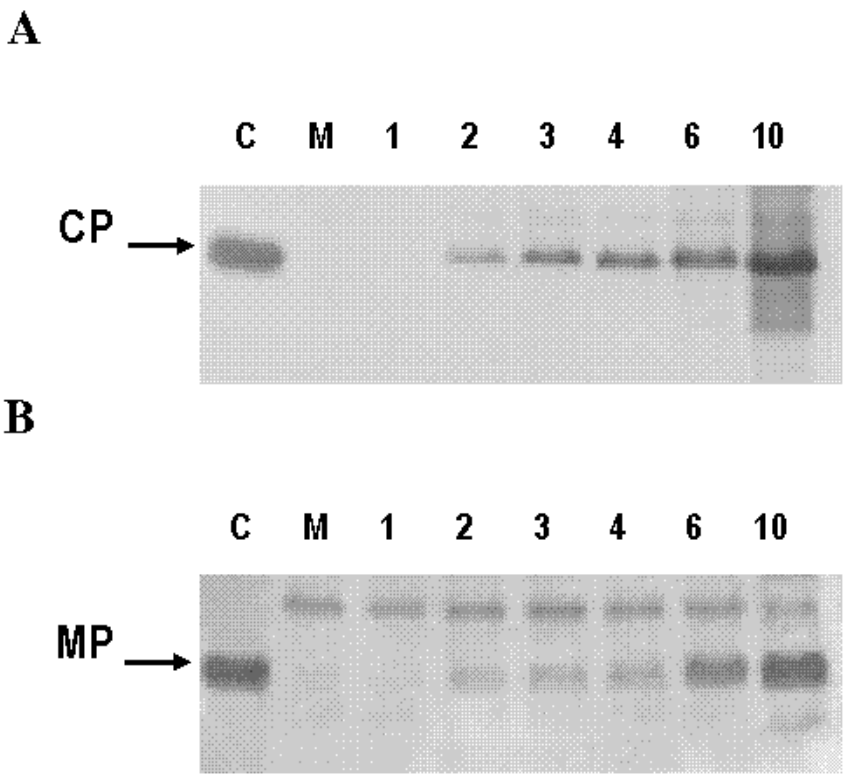


FIGURA 5. Cinética de la acumulación de la CP (A) y la MP p7 (B) del CarMV. Extractos de proteínas totales de hoja inoculada de *C. quinoa* a diferentes días post-inoculación se analizaron mediante Western-blot. (C), controles positivos correspondientes a proteína de viriones purificados **(CP)** y proteína p7 purificada **(MP). (M)** extracto de proteínas de planta inoculada con tampón. **(Carriles 1-10),** extractos de proteínas totales a diferentes días post-inoculación (1-10 dpi). Obsérvese cómo ambas proteínas aumentan su concentración a mayor dpi.

Al comparar las cinéticas de acumulación de la CP y el RNA subgenómico que dirige su traducción, se observó un comportamiento paralelo (Fig. 6B). Sin embargo, el análisis comparado de la cinética de acumulación de la MP y su RNA subgenómico reflejó un patrón de acumulación diferente, en el que una primera fase rápida de acumulación del mRNA no se correlacionó con la correspondiente acumulación de la MP (Fig. 6C). Estos resultados parecerían sugerir, aunque no lo demuestran de manera definitiva, que la expresión de la MP estuviera regulada a nivel de la traducción, mientras que la expresión de la CP estaría regulada a nivel de la transcripción.

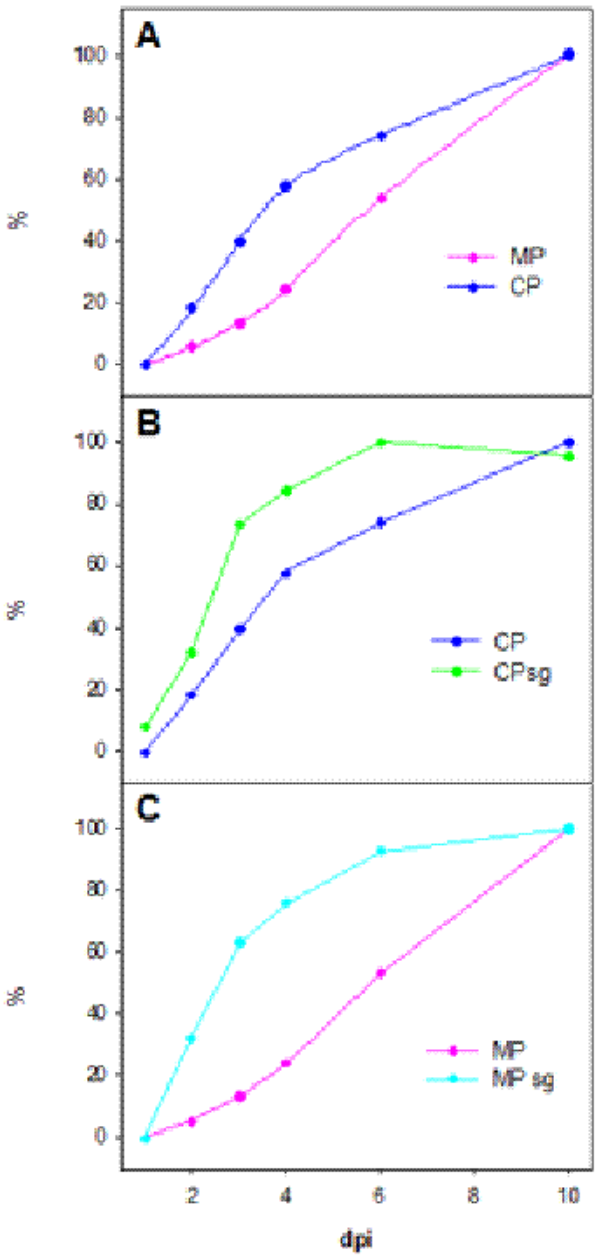


FIGURA 6. Comparación de las cinéticas de acumulación entre la CP y MP del CarMV (A), así como las cinéticas de acumulación de cada proteína con la de su correspondiente RNA subgenómico (B y C).

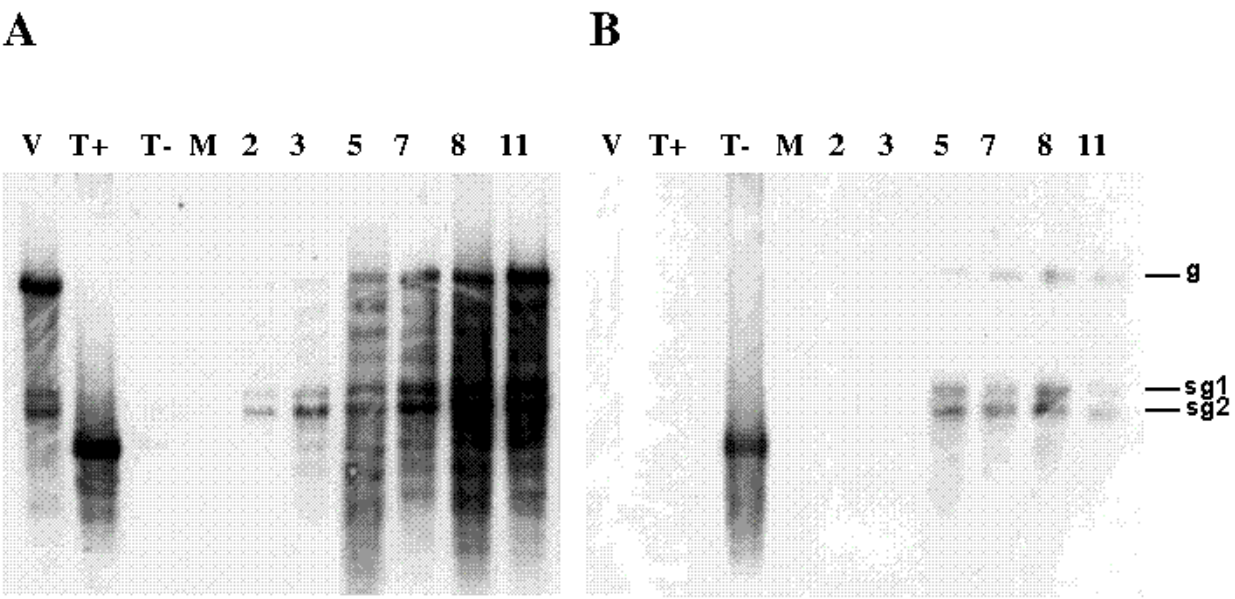


FIGURA 7. Cinética de acumulación de las cadenas positivas (A) y negativas (B) del RNA genómico y los RNAs subgenómicos del CarMV. Extractos de RNA totales de hoja inoculada de *C. quinoa* a diferentes dpi fueron sujetos a análisis tipo Northern-blot. El análisis de las cadenas positivas se realizó mediante la utilización de la misma sonda mencionada en la figura 3 que reconoce las cadenas positivas de RNA del CarMV, sintetizada a partir del clon pCarM Ec3 que contiene el extremo 3´del RNA genómico del CarMV, mientras que para el análisis de las cadenas negativas se utilizó una sonda sintetizada a partir del clon pCarM CP que no contiene el extremo 3´del RNA genómico. Su síntesis se describe en el apartado 2.4.2. **(V)**, RNA viral purificado a partir de virión. **(T+)**, transcrito frío de polaridad positiva del RNA genómico del CarMV sintetizado a partir del clon pCarM CP. **(T-)**, transcrito frío de polaridad negativa del RNA genómico del CarMV sintetizado a partir del clon pCarM CP. **(M)**, Extracto de RNA totales de hojas de plantas inoculadas con tampón. **(g)**, RNA genómico del CarMV. **(sg1)**, RNA subgenómico 1 de 1,7 Kb que dirige la traducción de la p7 del CarMV. **(sg2)**, RNA subgenómico 2 de 1,5 Kb que dirige la traducción de la CP del CarMV. **(2-11)**, dpi. Obsérvense las diferencias de concentración entre las cadenas positivas y las negativas de los RNAs virales. La especificidad de las sondas correspondientes se evaluó utilizando transcritos de ambos polaridades y el RNA viral.

Se procedió entonces a estudiar el patrón de acumulación de las cadenas de RNA negativas y su comparación con las positivas (Fig. 7). La especificidad de la sonda

positiva que reconoce las cadenas negativas fue demostrada al no hibridar con los RNAs purificados a partir de partículas virales ni con el transcrito frío positivo (Fig. 7B, V y T+). La sonda negativa que reconoce las cadenas positivas tampoco hibridó con el transcrito frío negativo (Fig. 7A, T-). Extractos de ácidos nucleicos totales de plantas de *C. quinoa* infectadas se dividieron en dos alícuotas y se analizaron de forma paralela mediante Northern-blot. Un primer análisis cuantitativo puso de manifiesto que las cadenas de polaridad positiva se acumularon del orden de 100 veces más que las correspondientes negativas. Además, la cinética de acumulación fue claramente diferente. Así, mientras que las formas positivas presentaron una cinética creciente a lo largo de los diferentes días en los que se tomaron las muestras, las formas negativas alcanzaron un máximo a 8 dpi que fue seguido por un marcado descenso en los niveles de acumulación (Fig. 7B, carriles 8 y 11). Al igual que lo observado para las formas positivas en los primeros estadíos de la infección, los niveles de acumulación de los RNA subgenómicos son mayores que los del genómico pero a diferencia de lo observado para las cadenas positivas los niveles de acumulación del RNA genómico en los estadíos tardíos de la infección no superan los de los RNAs subgenómicos (Fig. 7).

3.2. Fraccionamiento subcelular

La localización subcelular de la CP y MP fue estudiada en las hojas de *Chenopodium quinoa* inoculadas con CarMV a 2, 4 y 9 dpi mediante análisis Western-blot (Fig. 8). La CP fue detectada a 2 dpi principalmente en el citosol aunque también fue encontrada en la fracción membranosa (Fig. 8A, carriles S30 y P30, 2 dpi), pero no fue detectada en la pared celular (Fig. 8A, carril CW, 2 dpi). El análisis densitométrico, junto con las correcciones oportunas derivadas de la cantidad de muestra cargada en el gel para cada fracción, puso de manifiesto que el contenido de CP en la fracción S30 fue 11 veces mayor que la cantidad de CP detectada en la fracción P30 (Fig. 9A). A 4 dpi la cantidad de CP incrementó en todas las fracciones y fue detectada también en la pared celular (Fig. 8A, 4 dpi). La cuantificación de este Western-blot, demostró que el contenido de CP en S30 fue 9 y 12 veces mayor que la cantidad de CP detectada en las fracciones P30 y CW, respectivamente (Fig. 9A). A 9 dpi el contenido de CP en la

fracción S30 fue 12 y 18 veces mayor que la cantidad de CP detectada en P30 y CW, respectivamente, por lo que el incremento en la fracción S30 fue más importante que en las otras fracciones (Fig. 9A). Estos resultados indican que la CP es principalmente citosólica y que una fracción minoritaria se encuentra asociada a la fracción membranosa y a la pared celular.

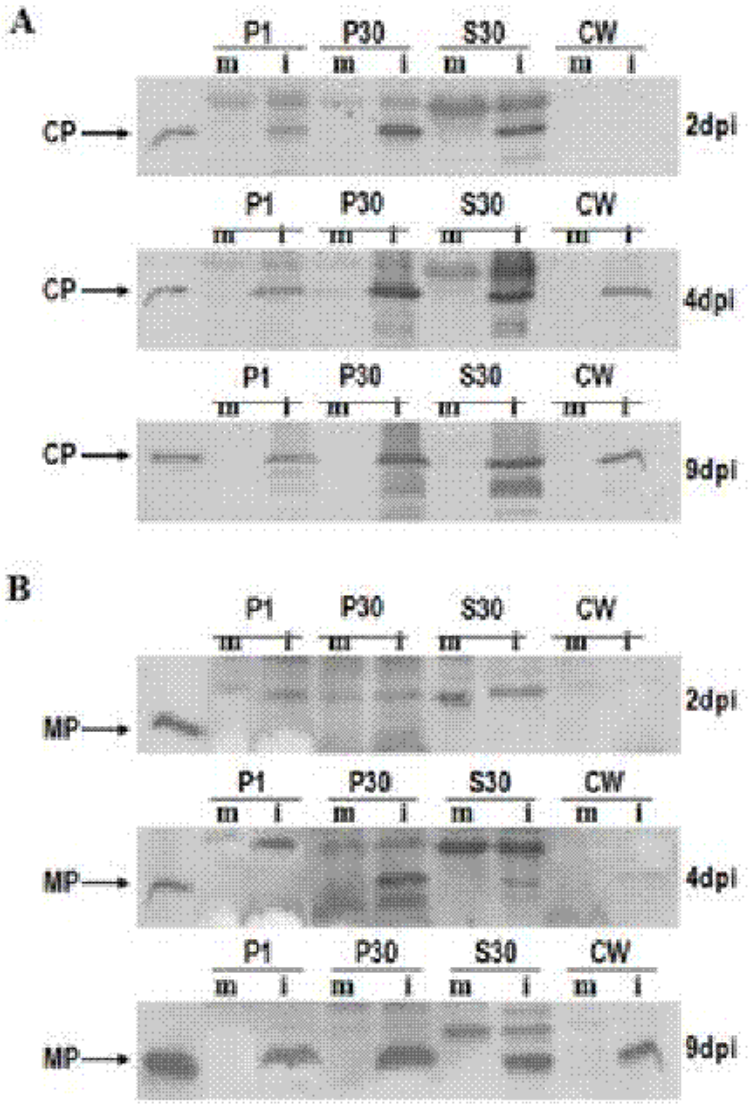


FIGURA 8. Localización subcelular de la CP (A) y MP (p7) (B) del CarMV mediante fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y análisis Western-blot de hoja inoculada de plantas de *C.quinoa* a 2, 4 y 9 dpi. (P1) fracción enriquecida en plastidios y núcleos. **(P30)** fracción membranosa. **(S30)** fracción citosólica. **(CW)** fracción de la pared celular. **(m)** fracción de planta sana inoculada con tampón. **(i)** fracción de hoja inoculada. **(CP)** virión purificado. **(MP)** proteína p7 purificada. La cantidad de proteínas totales aplicada en la fracción S-30 fue 10 veces menor que en las otras fracciones.

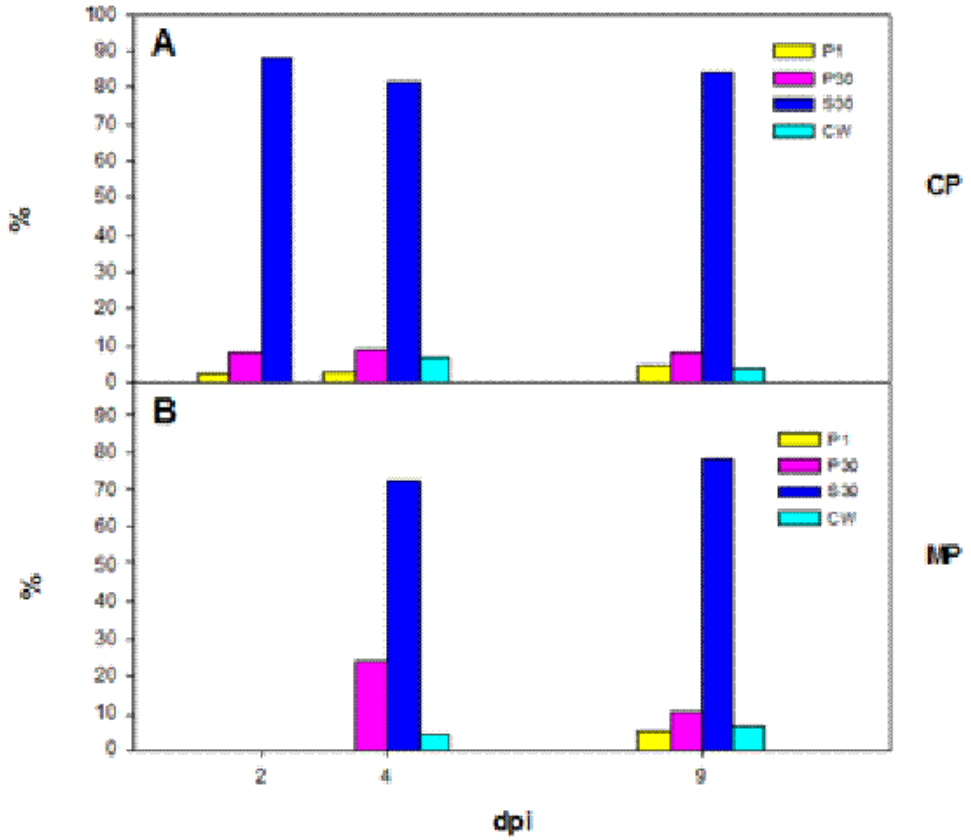


FIGURA 9. Acumulación relativa de la CP (A) y MP (p7) (B) del CarMV en las distintas fracciones obtenidas en el fraccionamiento subcelular a diferentes dpi. (P1) fracción enriquecida en plastidios y núcleos. **(P30)** fracción membranosa. **(S30)** fracción citosólica. **(CW)** fracción de la pared celular.

Los mismos extractos proteicos se utilizaron para analizar, de forma paralela, la localización subcelular de la MP o p7 (Fig. 8B). A 2 dpi, a diferencia de la CP, la p7 sólo se detectó de manera muy débil en la fracción P30 (Fig. 8B, 2 dpi), mientras que a partir de los 4 dpi, se detectó claramente en las fracciones P30 y S30 y muy tenuemente en la fracción de la pared celular (Fig. 8B, 4 dpi). La cuantificación con el densitómetro de este Western-blot y las correcciones posteriores, demostraron que el contenido de MP presente en la fracción S30 fue 3 y 20 veces mayor que la cantidad de MP detectada en las fracciones P30 y CW, respectivamente (Fig. 9B). A 9 dpi, la p7 fue detectada claramente en todas las fracciones (Fig. 8B, 9 dpi), Pero el incremento fue

cuantitativamente más significativo en la fracción CW. El contenido de MP en la fracción S30 fue 7.6 y 12.5 veces mayor que la cantidad de MP detectada en las fracciones P30 y CW, respectivamente (Fig.9B). Los resultados anteriores ponen claramente de manifiesto que, en los primeros estadíos de la infección, la p7 se localiza preferencialmente en el citosol y fracción membranosa, mientras que en estadíos posteriores un porcentaje significativamente importante se localiza en la pared celular.

La presencia de la CP y MP en la fracción P1 enriquecida en núcleos y plastidios puede ser debida a una contaminación por otros componentes subcelulares.

3.3. Análisis espacio-temporal de la distribución de las formas de polaridad positiva y negativa mediante hibridación *in situ*.

La distribución espacial de las cadenas de RNA positivas y negativas del CarMV a distintos tiempos se estudió mediante la hibridación *in situ* con sus respectivas sondas. Al igual que los análisis tipo Northern, los estudios de hibridación *in situ* pusieron de manifiesto que las cadenas de RNA positivas se acumulaban mucho más que las cadenas negativas, independientemente del día post-inoculación analizado (Fig. 10). Aunque esta técnica no permite un análisis cuantitativo fiable, sí se puso claramente de manifiesto que la cantidad de tejido afectada por la infección aumentaba progresivamente con el tiempo (Fig.10). Las cadenas positivas del RNA viral se observaron abarcando la totalidad de la zona sintomática mientras que el resto de la sección de hoja aparece libre de infección (Fig.10A, B y E), lo que pone de manifiesto la especificidad de la reacción. Dentro del síntoma todos los tipos celulares de la hoja (epidermis, parénquima en empalizada, mesófilo lagunar y haces vasculares) aparecen infectados. Análisis comparado de cortes seriados hibridados con la sonda que reconoce las cadenas negativas, puso claramente de manifiesto que la parte central de los síntomas aparecía libre de marca, observándose la señal de hibridación casi exclusivamente en los extremos de las lesiones ocasionadas por el virus. La zona central libre de señal aumentó progresivamente de tamaño de manera paralela al

aumento del diámetro de la lesión (Fig. 10C, D y F). En la mayoría de los casos, los extremos de las lesiones o frente de infección se veían parcialmente conectados a través del mesófilo lagunar y la epidermis del envés indicando además de la progresión radial del virus, una progresión desde la epidermis del haz hacia el envés (Fig. 10C, D y F). El análisis comparado de la acumulación de cadenas positivas y negativas en venas principales incluidas en una lesión local puso de manifiesto una señal de hibridación de las cadenas positivas del RNA viral muy intensa sobre el tejido floemático y el parénquima asociado a la vena (Fig. 11A), mientras que no se observó señal de hibridación de las cadenas negativas del RNA viral en cortes seriados en el tejido floemático y sólo presentó una débil señal en alguna célula del parénquima asociado a la vena (Fig. 11B). En el caso de venas principales no asociadas a lesiones cloróticas que mostraban una señal de hibridación de las cadenas positivas del RNA viral muy intensa sobre el tejido floématico, parénquima asociado a la vena y tejido de hoja que rodea la vena (Fig. 11C), tampoco mostraron, en cortes seriados, señal de hibridación de las cadenas negativas en el tejido floemático; sólo alguna célula del parénquima asociado a la vena, de la epidermis y del mesófilo lagunar del tejido de hoja que rodea la vena mostró una débil señal (Fig. 11D).

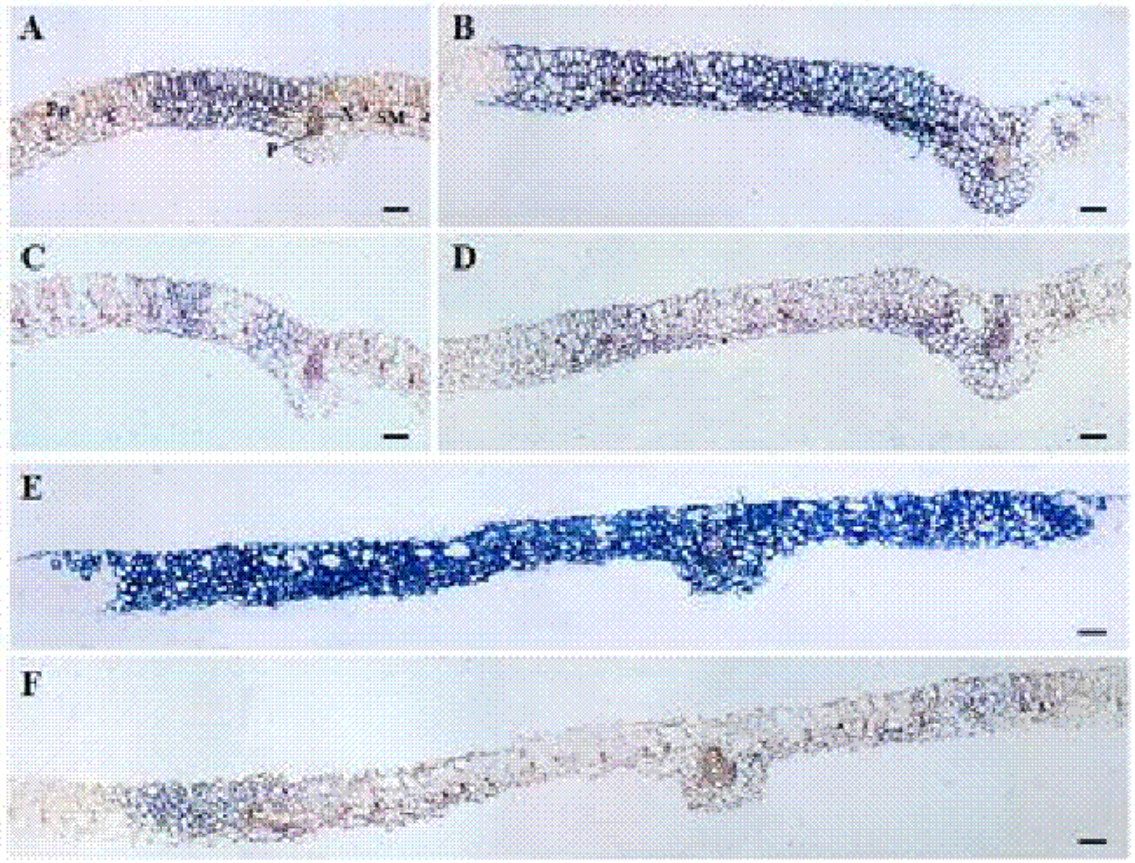


FIGURA 10. Análisis espacio-temporal de las cadenas positivas (A, B y E) y negativas (C, D y F) del RNA viral del CarMV por hibridación *in situ* al microscopio óptico en secciones transversales de hoja inoculada de plantas de *C. quinoa* a 4 (A y C), 6 (B y D) y 11 (E y F) días post-inoculación. Las sondas utilizadas para la detección de las cadenas positivas y negativas del RNA viral del CarMV fueron las mismas que se utilizaron en el análisis tipo Northern-blot, (pCarM Ec 3 y pCarM CP). Las zonas infectadas aparecen de color azul. Obsérvese cómo las cadenas negativas se acumulan en mucha menor cantidad que las cadenas positivas y cómo los síntomas abarcan mayor sección en la hoja a medida que aumentan los dpi. Las cadenas negativas se localizaron en los extremos de los síntomas, unas células anteriores al frente de infección, dejando la zona central de los síntomas libres de cadenas negativas. **(Pp)**, parénquima en empalizada. **(SM)**, mesófilo lagunar. **(P)**, tejido floemático. **(X)**, elementos conductores del xilema. Barra=10

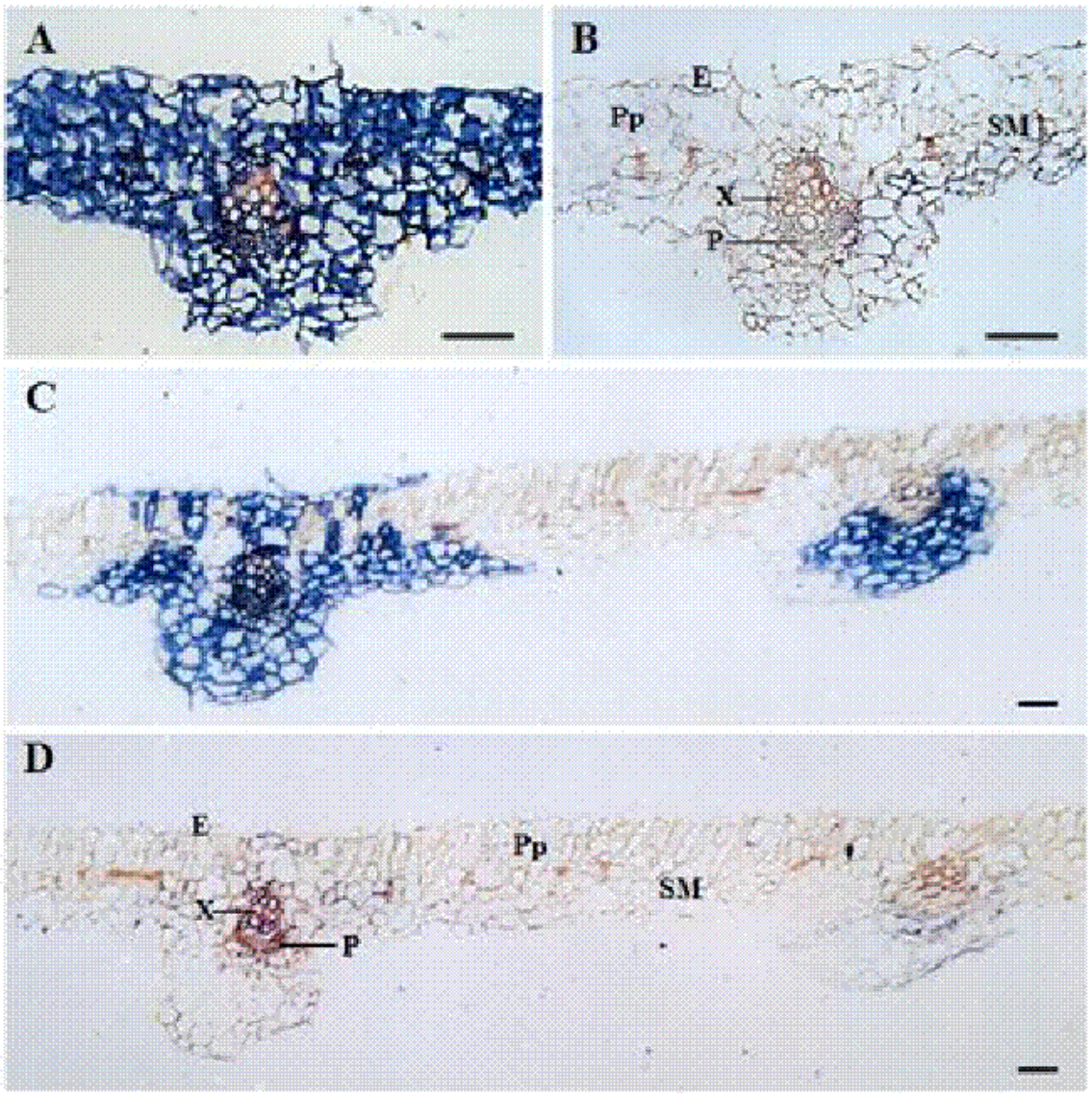


FIGURA 11. Análisis espacial de las cadenas positivas (A, y C) y negativas (B y D) del RNA viral del CarMV por hibridación *in situ* al microscopio óptico en secciones transversales de venas principales que se localizan en el interior de una lesión clorótica (A y B) y fuera de ellas (C y D), en hoja inoculada de plantas de *C. quinoa*. Obsérvese cómo en todos los casos de venas principales analizadas el tejido floemático **(P)** aparece libre de señal de hibridación de las cadenas negativas del RNA viral. **(E)**, epidermis. **(Pp)**, parénquima en empalizada. **(SM)**, mesófilo lagunar. **(X)**, elementos conductores del xilema. Barra=100 µm.

4. DISCUSIÓN

El éxito en el establecimiento de una infección viral y su progresión en un huésped susceptible depende esencialmente de la eficiencia de la expresión espacial y temporal coordinada de los genes virales. La mayoría de los virus con genoma de RNA de sentido positivo expresan sus genes 3´terminales a través de la síntesis de RNAs subgenómicos. Aunque el mecanismo de expresión de los Carmovirus se conoce con cierta profundidad (Morris y Carrington, 1988; Russo y col., 1994), los estudios sobre la cinética de la acumulación *in vivo* de los RNAs genómicos, subgenómicos y sus productos de traducción son escasos, especialmente para su miembro tipo, el CarMV.

Los estudios de la cinética de acumulación de las cadenas positivas del CarMV mediante análisis Northern de extractos de ácidos nucleicos totales obtenidos a partir de plantas de *C. quinoa* infectadas con CarMV, pusieron de manifiesto que los RNAs subgenómicos aparecieron con anterioridad al genómico y que sus niveles de acumulación fueron mayores que éste en los estadíos tempranos de la infección (2-5 dpi) (Fig. 3). Además, el subgenómico que dirige la traducción de la CP se acumuló dos veces más que el subgenómico que dirige la traducción de la MP en estos primeros estadíos (Fig. 3 y 4). Una cinética similar se ha observado en protoplastos infectados con el TCV (Wang y Simon, 1997). Una expresión diferencial en uno o más RNAs subgenómicos ha sido previamente descrita en protoplastos transfectados con el TNV-A (estirpe A del *Virus de la necrosis del tabaco*) (Meulewaeter y col., 1992). En el caso del TMV, el RNA subgenómico que codifica la MP de 30 kDa (P30) sólo fue detectado hasta 10 h post-inoculación, mientras que el subgenómico de la CP fue detectado de manera continua (Watanabe y col., 1984). Se propuso entonces que la MP del TMV tenía que ser expresada pronto en la infección, con el fin de competir eficientemente con la CP por su unión al RNA del TMV para formar los complejos ribonucleoproteicos P30-RNA del TMV y posibilitar su transporte célula a célula (Citovsky y Zambryski, 1991).

La acumulación diferencial de los RNAs subgenómicos de la MP (p7) y de la CP del CarMV en los primeros estadíos de la infección podría ser resultado de una diferente afinidad de los promotores de los subgenómicos por la RNA polimerasa que resultaría en una acumulación diferencial en etapas tempranas de la infección. Alternativamente, la mayor acumulación del RNA subgenómico más pequeño podría explicarse si tenemos en cuenta que en la síntesis de cadenas negativas la replicasa procede desde el extremo 3´hacia el 5´y que inmediatamente tras la síntesis del promotor subgenómico, una proteína se asociara a dicho promotor. Ello serviría como una etiqueta para atraer otras moléculas de replicasa para iniciar la síntesis de las formas positivas de los RNAs subgenómicos. Si esta unión fuera relativamente rápida o hubiera cantidades limitantes de moléculas de replicasa, siempre se vería favorecida la síntesis de los subgenómicos más 3´distales (en las cadenas positivas) tal y como ha sido propuesto por Miller y Koev (2000).

La comparación de las cinéticas de acumulación de la CP y p7 con sus respectivos RNAs subgenómicos (Fig.6B y C) , puso de manifiesto que, a diferencia de lo que ocurre con la CP, la expresión de la MP no sigue una cinética paralela a la expresión de su RNA mensajero lo que sugiere que la p7 podría estar regulada a nivel de la traducción, mientras que la expresión de la CP podría estar controlada a nivel de la transcripción. Una regulación traducional de la MP ha sido también propuesta para el CMV (Vaquero y col., 1996), mientras que en el caso del TMV la expresión diferencial de la MP está regulada a nivel de la transcripción (Lehto y col., 1990).

Diferentes mecanismos se han propuesto para la síntesis de los RNAs subgenómicos (ver revisión de Miller y Koev, 2000). En el primero de ellos, inicialmente descrito para el BMV (Miller y col., 1985), los RNAs subgenómicos se sintetizarían mediante un mecanismo de iniciación interna a partir de las cadenas negativas de longitud completa. En el segundo mecanismo, descrito para los coronavirus, los RNAs subgenómicos se producirían mediante terminación prematura de las cadenas negativas en su proceso de síntesis a partir de las cadenas positivas (Sit y col., 1998).

En el caso de los Carmovirus se ha propuesto el primero de estos mecanismos para el TCV (Wang y Simon, 1997) en base, fundamentalmente a la demostración de que las secuencias promotoras de la síntesis de los RNAs subgenómicos no se encuentran en las formas positivas de éstos. Las bases mecanísticas del modelo de iniciación interna no precisan de la existencia de formas negativas de longitud completa de los RNAs subgenómicos de tal manera que se ha argumentado que su detección sea precisamente un indicativo de mecanismo de terminación prematura. En el caso del CarMV hemos puesto claramente de manifiesto la existencia de dichas formas en tejido infectado de *C. quinoa* aunque su cinética de acumulación es cualitativa y cuantitativamente diferente a la de las cadenas positivas. Así, las cadenas negativas se acumularon 100 veces menos que las positivas, y mientras que estas últimas siguieron una progresión creciente a lo largo de los diferentes días de la infección, las cadenas negativas comenzaron a decaer en los estadíos tardíos (Fig. 7). La observación de que las formas negativas del CarMV no se encapsidan pudiera explicar la diferente cinética observada entre las cadenas positivas y negativas de tal manera que las cadenas negativas estarían más expuestas a procesos de degradación celular. Una situación similar ha sido observada en protoplastos transfectados con el necrovirus TNV-A (Meulewaeter y col., 1992) y el TMV (Ishikawa y col., 1991). Para el *tombusvirus del arrugamiento moteado de la alcachofa* (AMCV) no se detectó una diferencia cuantitativa entre las formas positivas y negativas y su cinética de acumulación fue paralela en ambos casos (Tavazza y col., 1994).

El análisis de los patrones de expresión de las dos proteínas CP y p7 del CarMV en hojas inoculadas de *Chenopodium quinoa*, mostró que ambas proteínas se detectaron inicialmente a 2 dpi y alcanzaron su máximo a 10 dpi. No obstante, la cinética de acumulación de cada una de ellas fue diferente (Figs. 5 y 6A). Así, la CP se acumuló de manera progresiva a lo largo de los días analizados mientras que la MP, tras una acumulación inicial baja, aumentó de manera significativa entre los días 4 y 6 post-inoculación. Con algunas excepciones, la mayoría de las MPs virales presentan una expresión transitoria *in vivo* que ha sido justificada por su implicación en los

primeros estadíos de la infección, tal y como ocurre para el AIMV (Berna y col., 1986), TMV (Deom et al., 1990), RCNMV (Osman y Buck, 1991) y CMV (Vaquero y col., 1996). Sin embargo, la p7 del CarMV no presentó dicha expresión transitoria al no observarse una caída durante los días de infección analizados (Fig. 5B). Ello no contradice la posible implicación de la p7 en el movimiento célula a célula dado que una cinética similar se ha descrito para otras MPs bien caracterizadas como son la del *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) (Perbal y col., 1993) y la del *Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid* (GFLV) (Ritzenthaler y col., 1995a). Es posible que la p7 del CarMV pudiera formar un complejo con otras proteínas virales y/o del huésped que la hicieran menos accesible a la degradación y la direccionaran hacia la pared de la célula. En este sentido es interesante resaltar que, aunque la mayor parte de la p7 del CarMV presenta una localización citosólica, la proporción de proteína que se detecta en la pared celular va aumentando con los días de infección (Figs. 8B y 9B). La detección preferencial de la p7 del CarMV en la fracción citosólica (S30) contrasta de manera sorprendente con la detección de la homóloga p8 del TCV, la cual fue detectada exclusivamente en las fracciones particuladas de tejido infectado de Arabidopsis (Li y col., 1998). Aunque ambas proteínas son estructural y funcionalmente muy similares, la p8 del TCV presenta una singularidad que podría explicar la diferente localización subcelular descrita: presenta dos señales de localización nuclear (NLS), una del tipo SV-40 y otra de tipo bipartito. La funcionalidad de la NLS bipartita ha sido puesta claramente de manifiesto por Cohen y col., (2000b), lo que explicaría su localización diferencial con la p7 del CarMV. Los datos de localización subcelular de la p7 del CarMV en la pared celular y en la fracción membranosa (P30) son coherentes con la supuesta implicación de la MP en el movimiento célula a célula. En general, se ha demostrado que todas las proteínas de movimiento o aquellas que presuntamente lo son están asociadas a estas fracciones, ejemplo de ello son: la proteína de 48K del *Virus del mosaico de la carilla* CPMV (Wellink y col., 1987); la MP del TMV (Moser y col., 1988; Cooper y Dodds, 1995); la supuesta MP (43K) del *Virus del moteado del trébol rojo* (RCMV) (Shanks y col., 1989); las proteínas de 46K del *Virus de los anillos negros del tomate* (TBRV) (Demangeat y col., 1992) y del *Virus del mosaico cromado de*

la Vid (GCMV) (Hibrand y col., 1992); la proteína P7a del TNV (Drouzas y col., 1996); la proteína 28K del *Potexvirus del mosaico del bambú* (BaMV) en una infección de *N. benthamiana* (Chang y col., 1997); la proteína 3a del BMV (Fujita y col., 1998); la supuesta MP (P8) del TCV (Li y col., 1998).

Sin embargo, la proteína p7 (MP) del CarMV es, tal y como se ha descrito anteriormente, principalmente citosólica, ya que fue encontrada en grandes cantidades en la fracción soluble S30. Resultados similares se han descrito para otras MPs, como la P38 del GFLV (Ritzenthaler y col., 1995a) o la MP P1 del CaMV (Perbal y col., 1993) que son principalmente citosólicas pero también se han encontrado asociadas a la pared celular y a la fracción membranosa. Así mismo, la proteína de 26K del *Potexvirus del mosaico del foxtail* (FMV) fue detectada principalmente en la fracción soluble (Rouleau y col., 1994). La expresión no transitoria, su aparente estabilidad y su localización principalmente citosólica constituyen características únicas para una MP, sólo compartidas con la p38 del GFLV, que hace sospechar otras funciones de la p7 del CarMV alternativas al movimiento célula a célula.

En cuanto a la CP del CarMV también fue detectada principalmente en el citosol (más del 80%) a diferentes dpi (Figs. 8A y 9A), como ha sido descrito para la CP de 56k del GCMV (Hibrand y col., 1992) y la CP del *Virus del mosaico rayado de la cebada* (BSMV) (Donald y col., 1993). Aunque la CP del CarMV fue detectada en todas las fracciones, las cantidades detectadas en las P1, P30 y CW fueron más bajas. También la CP del BSMV (Donald y col., 1993) y la CP del *Virus del rosetón del cacahuete* (PCV) (Erhardt y col., 1999) fueron detectadas en todas las fracciones, pero la CP del PCV fue particularmente abundante en las fracciones membranosa y citosólica (Erhardt y col., 1999).

Finalmente, los análisis de hibridación *in situ* al microscopio óptico pusieron de manifiesto una localización espacio-temporal distinta para las cadenas positivas y

negativas del CarMV en tejido infectado (Fig. 10). La zona central de la lesión local provocada por el virus no presentaba señal de cadenas negativas, mientras que las cadenas positivas fueron claramente detectadas. Por tanto, aunque la progenie del genoma viral del CarMV mostró una acumulación uniforme a lo largo de todo el síntoma, la replicación parece estar espacialmente regulada, de manera que ésta se localizó detrás del frente de infección, es decir, en los extremos del síntoma. Esta es la primera evidencia histológica en Carmovirus de la distribución diferencial de las cadenas positivas y negativas. La localización de las cadenas negativas en los extremos del síntoma sugiere fuertemente un requerimiento de la replicación para el movimiento célula a célula. Resultados similares habían sido descritos para el *Virus transmitido por semilla del mosaico del guisante* (PSbMV), cuya replicación era restringida a 10-12 células detrás del frente de infección en cotiledón de guisante inmaduro infectado (Wang y Maule, 1995). Estudios subcelulares de las MPs fusionadas a la GFP (Huang y Zhang, 1999; Széczi y col., 1999), o por inmunomicroscopía electrónica (Roberts y col., 1998), demuestran que la MP es diferencialmente localizada dentro de las células cabeza junto al avance de infección o detrás de la misma, lo que es consistente con la sincronización de replicación y movimiento descrita en el presente trabajo.

No obstante, la carencia de señal de cadenas negativas en la zona central del síntoma se puede deber a que el virus deja de replicarse en la zona de infección ya pasada, incluso cuando las células aún permanecen vivas y todavía desarrollan sus funciones. Esta situación se ha relacionado, por su semejanza, con el estado de "persistencia" descrito en algunas infecciones de virus animales, donde el virus reside en las células pero no parece replicarse (Aranda y Maule, 1998). Se cree que este estado está relacionado con el silenciamiento génico post-transcriptional (PTGS) inducido por muchos virus (Ratcliff y col., 1997; 1999).

En cuanto a la replicación en el sistema vascular, nuestros resultados demostraron que tras analizar venas mayores con señal hibridación de las cadenas

positivas en el tejido floemático, localizadas tanto en el interior de un síntoma como fuera de él (Fig. 11), no mostraron señal de hibridación de las cadenas negativas en el tejido floématico. Por lo tanto, se sospecha que no habría replicación en el tejido floématico, aunque un estudio más detallado al microscopio electrónico sería necesario para confirmar estos resultados, ya que recientemente se ha descrito que el *Viroide del tubérculo fusiforme de la patata* (PSTVd) es capaz de replicarse en las células acompañantes y células del parénquima floématico de plantas de tomate (Zhu y col., 2001).

Capítulo II

Bases Celulares de la Traslocación y Distribución Final del *Virus del moteado del clavel* (CarMV) en su huésped natural.

1. INTRODUCCIÓN

El clavel es una especie que se cultiva en todo el mundo, multiplicándose normalmente mediante propagación vegetativa (Zandwort, 1973; Nakano y col., 1994). Su cultivo se ve particularmente afectado por una serie de enfermedades de origen viral que limitan de manera muy significativa su comercialización. Para la producción de material vegetal es imprescindible aplicar unos controles exhaustivos de ausencia de virus. Según la legislación de la UE, el control sanitario de enfermedades virales en clavel se basa en la ausencia de *Virus del moteado del clavel* (CarMV). Ello es fundamentalmente debido a que es el virus más fácilmente transmisible de entre los que infectan este cultivo y constituye pues un excelente indicador del estado sanitario del material vegetal. El CarMV se transmite fácilmente por vía mecánica, al realizar pinzados y recolectar la flor (Devergne, 1988; Batllè y Laviña, 1992) y por *Aphis gossypii* (Singh y Singh, 1989). Tras la termoterapia y el cultivo de meristemos apicales se producen un importante número de escapes que lo hacen difícil de eliminar (Maia y col., 1969; Hollings y col., 1972).

Aunque el virus sólo induce un moteado suave en especies del género Dianthus (Hollings y Stone, 1970), se ha demostrado que su presencia puede tener un efecto perjudicial en la producción de flor cortada debido al efecto sinérgico que provoca en infecciones mixtas (Brierley, 1964; Hakkaart, 1964; Hollings y col., 1977). Se ha descrito que también produce una disminución del vigor de las plantas, un descenso en la producción de las flores y pérdidas importantes durante el enraizamiento de los esquejes (Brige y col., 1990; Batllè y Laviña, 1992). Resulta ser pues un virus de extraordinaria repercusión económica.

El CarMV es el miembro tipo del género *Carmovirus* perteneciente a la familia *Tombusviridae* de virus de plantas. Es un virus icosaédrico de 30 nm de diámetro, que posee un genoma monopartito de RNA de simple cadena de sentido positivo de aproximadamente 4 Kb. El análisis de su genoma revela la presencia de cinco marcos

de lectura abierta (ORFs) ("open reading frames"). El ORF más cercano al extremo 5´ (p27) y su producto de lectura a través ("read through") (p86), se cree que son, por homología con el *Virus del arrugamiento del nabo* (TCV), esenciales para la replicación del genoma (White y col., 1995). El ORF más próximo al extremo 3´ codifica para la CP de 38-kDa (Morris y Carrington 1988; Russo y col., 1994). Los dos ORFs del solapamiento interno (p7 y p9) se supone, como se ha demostrado para el TCV (Hacker y col., 1992; Li y col., 1998), que dichas proteínas son requeridas para el movimiento célula a célula, y se ha demostrado en el caso de la p7 que tiene propiedades de unión a RNA (Marcos y col., 1999; Vilar y col., 2001).

El establecimiento por parte de un virus, de una infección sistémica, requiere diferentes procesos esenciales tales como replicación, movimiento a corta distancia de una célula a otra vía plasmodesmos y a larga distancia a través del sistema vascular (Citovsky, 1993; Lucas y Gilbertson, 1994). Las funciones virales y del huésped requeridas para el movimiento a larga distancia son diferentes a aquellas necesarias para el movimiento célula a célula (Maule, 1991; Carrington y col., 1996; Gilbertson y Lucas, 1996). Durante los últimos años se ha puesto claramente de manifiesto que en la invasión de las partes distales de la planta los virus siguen un patrón del tipo "fuente-sumidero" similar al observado en la translocación de los fotoasimilados (Leisner y col., 1992; Andrianifahanana y col., 1997; Roberts y col., 1997). Un creciente número de evidencias han revelado que los virus utilizan un sistema endógeno de la planta en el que residiría la función de translocación de macromoléculas y permitiría integrar distintos procesos fisiológicos (Lucas y Wolf, 1999; Thompson y Schulz, 1999). Se han descrito recientemente diferentes proteínas del huésped que pudieran estar implicadas en el transporte de macromoléculas (Xoconostle-Cazares y col., 1999; Gomez y Pallás, 2001; Owens y col., 2001). Como resultado de estas observaciones no es sorprendente que el estado de desarrollo de la planta condicione de manera significativa la distribución final del virus en la misma (Leisner y col., 1993; Más y Pallás, 1996; Sudarshana y col., 1998). Además, se ha observado que los distintos factores ambientales (luz, temperatura, etc.) que influyen en la translocación del

fotoasimilado condicionan también la distribución final del virus en la planta (Ducasse y Shepherd, 1995; Ding y col., 1999; García-Castillo y col., 2001 y capítulo III). Aunque en la actualidad se dispone de un conocimiento bastante profundo sobre la invasión de los virus en los distintos tejidos y órganos de la planta, la distribución en los tejidos meristemáticos está menos estudiada. En los recientes trabajos en los que se ha abordado esta cuestión, se ha puesto de manifiesto que en la mayoría de los casos tanto virus como viroides, no son capaces de infectar el meristemo apical (ej: Al-Kaff y Covey, 1996; Lucy y col., 1996; Wang y col., 1996; Sudarshana y col., 1998; Zhu y col., 2001). Sólo en el caso del TCV y utilizando plantas transgénicas que expresan su CP inoculadas con una construcción en la que la CP se reemplazó con la GFP, se observó la expresión de la proteína fluorescente en el meristemo (Cohen y col., 2000a) y se ha propuesto por tanto que este virus invadiría el meristemo apical.

En este trabajo se realiza un análisis espacial y temporal de las pautas de acumulación del CarMV en la infección sistémica de plantas de clavel inoculadas, así como su infección natural, demostrando la influencia del estado de desarrollo de la planta y la filotaxis en la susceptibilidad a la infección viral. Especial atención se ha prestado a la acumulación y distribución del CarMV en los tejidos sumideros y sus limitaciones en la infección del meristemo del brote apical.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Virus y material vegetal.

El aislado "Dixie" del virus del moteado de clavel (CarMV-Dix) fue obtenido de una infección natural de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*, cv. Dixie) (Sánchez-Navarro y col., 1996). El CarMV-Dix fue clonado biológicamente, propagado y purificado en plantas de *Chenopodium quinoa* tal y como se describe en Díez y col., (1998). Las plantas de clavel saneadas mediante cultivo de meristemos, fueron proporcionadas por la empresa Barberet y Blanc, S.A. Durante todo el período de

experimentación las plantas fueron mantenidas en los invernaderos de la empresa con un intervalo de temperaturas de 35-40ºC día /12-15ºC noche y una irradiación variable entre 300-650 mol fotones m^{-2} s^{-1}. Después de un mes y medio desde el enraizamiento de los esquejes de clavel, las plantas fueron inoculadas con 20 µg/ml de virión purificado en tampón fosfato potásico 20 mM (pH 7.0) y utilizando carborundum como agente abrasivo para dañar la superficie de la hoja. En los estudios de movimiento y distribución del virus, la inoculación se realizó en una hoja por planta en la zona apical de la misma. Tras la aplicación del inóculo, las hojas se lavaron suavemente con agua. Como controles se utilizaron plantas sanas inoculadas con tampón.

2.2. Hibridación "Tissue-Printing"

Las hibridaciones "tissue-printing" o impresiones de tejido (Fig. 1) se realizaron siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Song y col., (1993) y Más y Pallás, (1995). Para ello, con el fin de determinar el inicio y rutas de la infección sistémica se realizaron, utilizando cuchillas estériles, secciones transversales de la base de la hoja inoculada, del tallo y hojas sistémicas por debajo y por encima de la hoja inoculada, así como de la hoja paralela a la hoja inoculada y de raíz a diferentes días post-inoculación (5, 7, 10, 12, 14, 17 y 33 dpi). La superficie de corte de estas muestras fue directamente presionada sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) durante aproximadamente 15-30 segundos. Los ácidos nucleicos unidos se fijaron a la membrana mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 minutos. La prehibridación, hibridación y la detección inmunológica se realizaron, tal y como se ha descrito en el apartado 2.4.3. del capítulo I. Las membranas se hibridaron con una sonda de RNA marcada con digoxigenina (Pallás y col., 1998) correspondiente al extremo 3´del RNA genómico del CarMV (clon pCarM Ec3, Marcos y col., 1999), cuya síntesis se describe en el apartado 2.4. 2. del capítulo I.

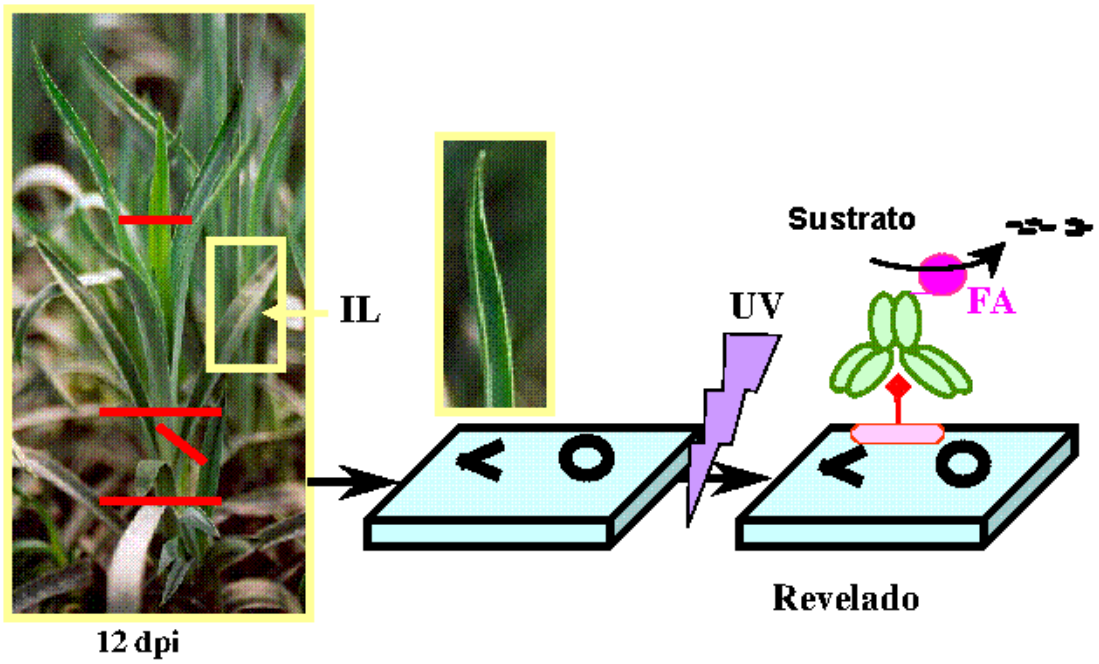


FIGURA 1. Representación esquemática del proceso de hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido. En la fotografía se muestra una planta de clavel infectada con CarMV, donde se ha señalado la zona de inoculación mediante un recuadro amarillo y mediante líneas rojas se señalan las zonas de la planta que se han seccionado para la hibridación "tissue-printing". (IL), hoja inoculada. Las cajas azules representan la membrana de nylon sobre la que se presiona la superficie de corte de los tejidos seccionados. El rectángulo rosa representa la sonda marcada con digoxigenina que es reconocida por un anticuerpo unido a fosfatasa alcalina (FA), que actúa sobre un sustrato quimioluminiscente cuya emisión se registra en una película autorradiográfica.

2.3. Hibridación Dot-blot

Para comprobar los días post-inoculación (dpi) necesarios para que el virus pasara de la hoja inoculada al resto de la planta, se tomaron muestras de hojas sistémicas de las plantas de clavel 20 días después de haber cortado la hoja inoculada a diferentes días post-inoculación. Estas muestras fueron procesadas mediante un análisis de detección rutinario descrito por Sánchez-Navarro y col. (1996). Así, las muestras fueron homogeneizadas en un volumen igual de citrato sódico 50 mM pH 8.5 a 4ºC en bolsas de plástico con un homogeneizador manual. Los homogenados fueron depositados sobre membranas de nylon, cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), mediante bastoncillos de algodón estériles que previamente se habían

impregnado con el homogenado y que se presionaron suavemente sobre las membranas hasta que las muestras difundían concéntricamente. Estas membranas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 min para después fijar los RNAs mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 min utilizando un transiluminador (Vilber Lourmat). Posteriormente estas membranas fueron tratadas tal y como se describe en el apartado anterior 2.2.

2.4. Inmunocitoquímica

Con el fin de identificar los tipos celulares que aparecían infectados en las secciones transversales de hoja, tallo, meristemo apical y raíz que habían sido utilizadas en las impresiones de tejido, secciones inmediatamente anteriores a las transferidas fueron fijadas e incluidas en parafina (Fig. 2) tal y como se describe en el apartado 2.5.1 del capítulo I. Se obtuvieron secciones de 8-10 µm de los bloques de parafina con un microtomo rotatorio Reichert-Jung 2030 que fueron adheridas a portaobjetos previamente recubiertos con un adhesivo (TESPA, 3-amino-propil-trietoxi-silano) (Sigma) por calentamiento a 40ºC sobre una placa calefactora. Estas secciones fueron desparafinadas con xilol (2x 5 min cada uno) e hidratadas a través de una serie decreciente de etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 30%) hasta agua. A continuación fueron tratadas con PBS (135 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 8 mM Na_2HPO_4, 2.7 mM KCl, pH 7.2), tres veces durante 5, 10 y 15 min, respectivamente. Posteriormente, fueron preincubadas en una solución bloqueante que contenía 5% de BSA (albúmina de suero bovino) en PBS durante 20 min. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo contra viriones del CarMV (amablemente proporcionado por los Drs J.A. Daròs y R. Flores, IBMCP, Valencia). Las secciones pasaron directamente de la solución bloqueante a la solución con el anticuerpo primario diluido 1:6000 en 1% BSA/PBS, donde se incubaron toda la noche a 4ºC. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 min en PBS y fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo unida a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) a una concentración de 7 U/ml en 1% de BSA/PBS. Los excesos de

anticuerpo no unido o unido inespecíficamente se eliminaron realizando 4 lavados de 5 min y un lavado de 15 min en el tampón de equilibrado (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5). La detección colorigénica, de las secciones y su montaje se realizó tal y como se describe en el apartado 2.5.2 del capítulo I para la hibridación *in situ*. Se llevaron a cabo una serie de controles para comprobar la especificidad de la reacción inmunocitoquímica con muestras de plantas inoculadas con tampón y muestras infectadas que no eran incubadas con el anticuerpo primario o secundario. La reacción resultante fue examinada y fotografiada en un microscopio óptico DMRB LEITZ (Leica microsistemas S.A., Barcelona, España). La película fotográfica utilizada fue de 100 asa de la marca Kodak.

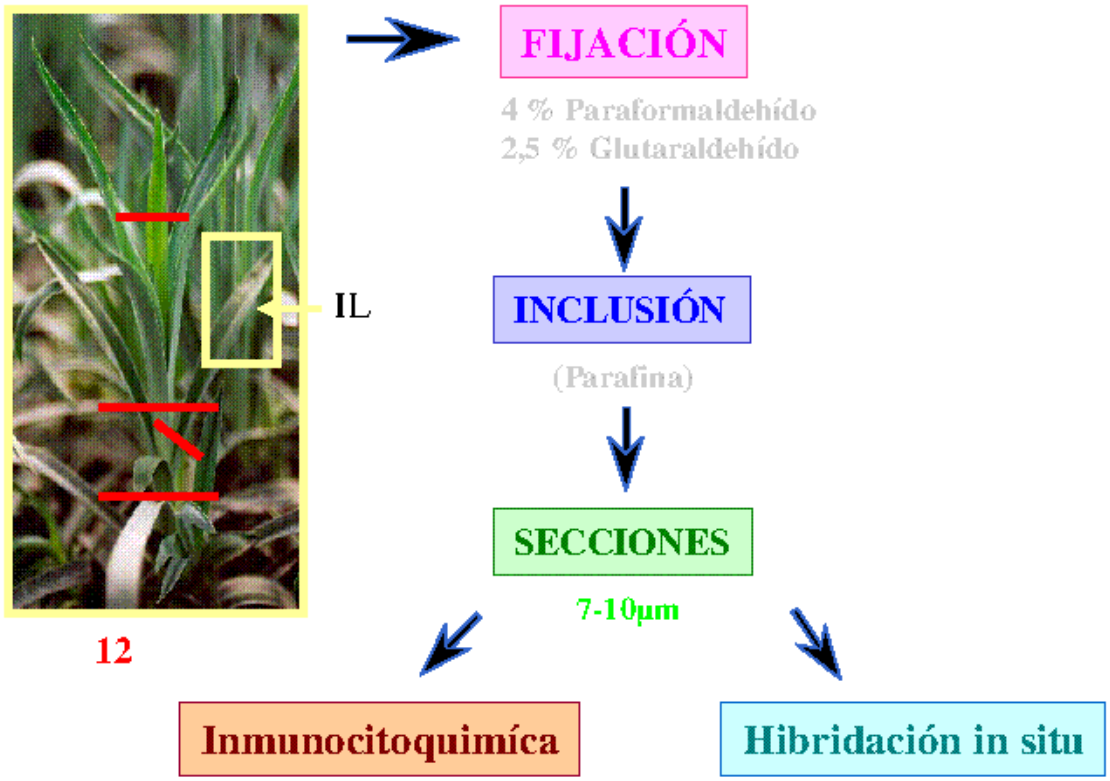


FIGURA 1. Representación esquemática del procesamiento del material vegetal para la inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. **En la fotografía se muestra una planta de clavel infectada con CarMV, donde se ha señalado la zona de inoculación mediante un recuadro amarillo y mediante líneas rojas se señalan las zonas de la planta que se han seccionado para incluir en parafina y seguidamente utilizadas para realizar indistintamente una reacción inmunocitoquímica o de hibridación *in situ*. (IL), hoja inoculada.**

2.5. Hibridación *in situ*

Las mismas muestras utilizadas para la inmunocitoquímica fueron utilizadas para la hibridación *in situ* mediante secciones seriadas adheridas a portaobjetos (Fig. 2). Estas secciones fueron pretratadas antes de la hibridación e hibridadas tal y como se describe en el apartado 2.5.2 del capítulo I. Como sonda se utilizó el RNA correspondiente al extremo 3´del RNA genómico del CarMV marcado con digoxigenina (clon pCarM Ec3, Marcos y col., 1999), cuya síntesis se describe en el apartado 2.4.2. del capítulo I. Se realizaron varios controles para comprobar la especificidad de la sonda, con muestras de planta sana y muestras infectadas que no eran incubadas con la sonda. La reacción resultante fue examinada y fotografiada en un microscopio óptico DMRB LEITZ (Leica microsistemas S.A., Barcelona, España). La película fotográfica utilizada fue de 100 asa de la marca Kodak.

3. RESULTADOS

3.1. Distribución espacio-temporal del CarMV en plantas de clavel

El CarMV no produce por sí sólo ningún tipo de sintomalogía manifiesta en clavel, por lo que era necesario la aplicación de una técnica, como la hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido (Fig. 1) (Más y Pallás, 1995) que nos permitiera observar en qué tejidos de la planta se acumulaba el virus. Mediante esta técnica hemos podido estudiar la distribución espacio-temporal del CarMV en plantas de clavel.

Los datos de la hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido (Fig. 3A) a 7 dpi mostraron una débil señal en la base de la hoja inoculada, que se manifestaba como un punto en la parte central de la hoja (Fig. 3A, IL 7dpi), mientras que el resto de la planta (hojas sistémicas, tallo y raíz) aparecían libres de señal (Fig. 3A, UL, PL, US, LS y R, 7 dpi). Esta señal tan localizada se observó del mismo modo en la base de la hoja

inoculada de plantas analizadas a 10 y 12 dpi, si bien ya era una señal más fuerte (Fig. 3A, IL 10 y 12 dpi) y el resto de tejidos comenzaban a ser invadidos por el virus, observándose señal en tallo, raíz y hoja sistémicas (Fig. 3A, US, LS y R, 10 y 12 dpi y UL, 12 dpi).

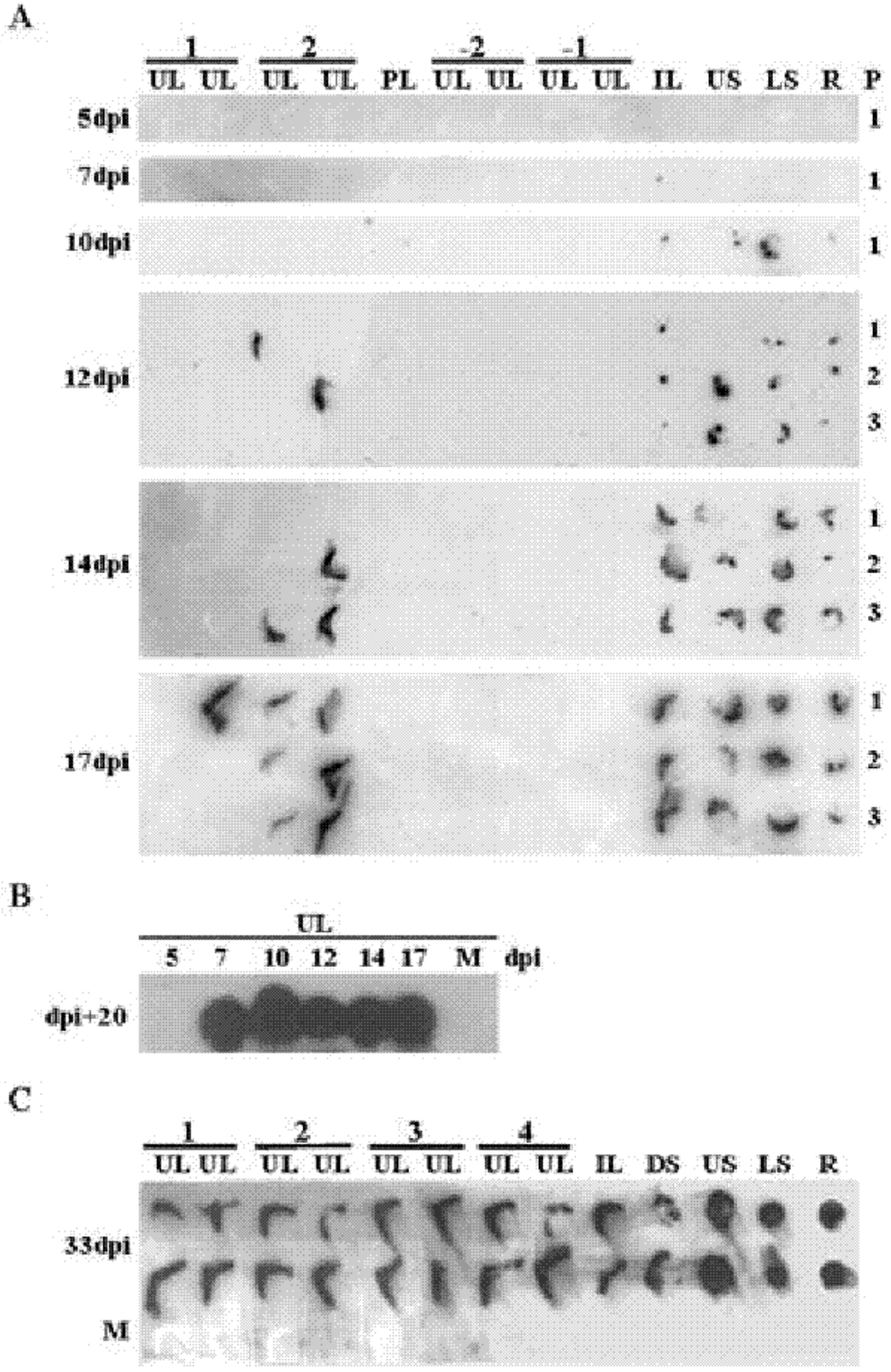
El mínimo número de días necesario para que el virus entrara en el sistema de transporte vascular de la planta y pudiera invadirla sistémicamente, se estudió mediante experimentos en los que se seccionaba la hoja inoculada a diferentes dpi y se analizaban hojas sistémicas a 20 dpi. Así, se pudo comprobar que cuando se seccionaba la hoja inoculada a 5 dpi el virus no era capaz de invadir sistémicamente la planta mientras que si lo era sí se hacía a los 7 dpi (Fig. 3B).

La hoja de clavel es una hoja de tipo lineal con forma de quilla que carece de peciolo (Fig. 4A). En un corte transversal de la misma se observa que consta de un sólo haz central o haz principal de mayor tamaño y numerosos haces secundarios de menor tamaño que aparecen distribuidos en el resto de la hoja (Fig. 4B). Los resultados de la inmunocitoquímica para las secciones realizadas en la base de la hoja inoculada a 12 dpi, (que es la misma hoja de la planta 2 analizada en las impresiones de tejido; Fig. 3A, IL 12dpi), mostraban una señal localizada a modo de punto central, que reveló ser una clara señal de infección del haz central de la hoja (Fig. 4C), mientras que el resto de la hoja junto con los haces secundarios aparecían libres de infección (Fig. 4B). En este haz central, la señal se localizó en grupos de células floemáticas y en células del parénquima de la hoja asociadas al haz vascular que rodean estos grupos (Fig. 4C y D).

Los estudios del tallo de plantas de clavel mediante el análisis de las impresiones de tejido (Fig. 3A), mostraron que una vez que el virus salía de la hoja inoculada y alcanzaba el tallo seguía dos direcciones, una ascendente y otra descendente, para llegar a los tejidos sumideros de la planta que son el meristemo del brote apical y la raíz. La primera señal en tallo aparecía en los análisis de las impresiones de tejido a 10 dpi y tanto el tallo por debajo como por encima de la hoja

inoculada mostraban infección (Fig. 3A, US y LS 10 dpi). La señal de infección en tallo era, al igual que en la base de la hoja inoculada, una señal muy puntual y estaba localizada en una zona lateral del mismo. En las impresiones de tejido a 12 dpi se siguió observando esta señal lateral y puntual en tallo (Fig. 3A, US y LS 12 dpi.). Con el fin de identificar qué tipos celulares aparecían infectados en estas señales puntuales, se realizaron los experimentos de inmunocitoquímica en secciones de tallo por encima y por debajo de la hoja inoculada (Fig. 5) correspondientes a la planta 1 de las impresiones de tejido a 12 dpi (Fig. 3A, US y LS 12 dpi). El análisis inmunocitoquímico del tallo por encima de la hoja inoculada, cuya impresión de tejido no mostró ningún tipo de señal (Fig. 3A, US 12 dpi), mostró un único grupo muy reducido de células infectadas en todo el tallo (Fig. 5A, B y C), que estaban muy cerca del tejido floemático y que correspondían a células del parénquima de la corteza asociado al tejido vascular (Fig. 5C). Igualmente se analizó el tallo por debajo de la hoja inoculada de esta misma planta 1 y se observó que el virus sólo se localizaba en dos zonas muy puntuales de un lateral de tallo, que se correspondían con los dos puntos observados en las impresiones de tejido (Fig. 3A, LS 12 dpi), mientras que el resto del tallo aparecía libre de infección (Fig. 5E). Estos dos grupos de células que aparecían infectados están constituidos por células del tejido floemático y del parénquima de la corteza que lo rodea (Fig. 5E), mientras que el resto de tejidos del tallo como son la epidermis, corteza, tejido xilemático y médula aparecían libres de infección (Fig. 5D y E).

FIGURA 3. Análisis temporal mediante hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido de la acumulación del RNA viral del CarMV en hojas inoculadas y sistémicas, tallos y raíces de plantas de clavel infectadas (A y C) y determinación del mínimo número de días necesarios de presencia del virus en hoja inoculada para desarrollar una infección sistémica (B). (A), obsérvese cómo las hojas sistémicas que se localizan por debajo de la hoja inoculada **(-2 y –1UL)** en ningún caso aparecen infectadas, al igual que ocurre con la hoja paralela a la hoja inoculada **(PL)** y cómo la señal en la hoja inoculada **(IL)** no aparece hasta los 7 dpi. **(B),** análisis mediante hibridación tipo "dot-blot" de tejido sistémico a 20 dpi después de haber eliminado la hoja inoculada a los dpis indicados; obsérvese cómo la primera señal de infección aparece a 7 dpi al igual que ocurre en **(A)** indicando que el virus sale de la hoja inoculada entre los 5 y 7 dpi. **(C),** obsérvese el aumento en la acumulación del RNA viral en todos los tejidos en comparación con estadios más tempranos en la infección **(A). (1UL),** primer par de hojas por encima de la hoja inoculada; **(2UL),** segundo par de hojas por encima de la hoja inoculada; **(3UL),** tercer par de hojas por encima de la hoja inoculada; **(4UL),** cuarto par de hojas por encima de la hoja inoculada; **(PL),** hoja paralela a la hoja inoculada; **(-2UL),** segundo par de hojas por debajo de la hoja inoculada; **(-1UL),** primer par de hojas por debajo de la hoja inoculada; **(IL),** hoja inoculada; **(DS),** sección de tallo por debajo del brote apical seccionado; **(US),** tallo por encima de la hoja inoculada; **(LS),** tallo por debajo de la hoja inoculada; **(R),** raíz. **(P),** número de planta. **(M),** planta inoculada con tampón.


A
1
2
-2
-1
UL UL UL UL PL UL UL UL UL IL US LS R P
5dpi
7dpi
10dpi
12dpi
14dpi
17dpi
1
2
3
B
UL
5 7 10 12 14 17 M dpi
dpi+20
C
1
2
3
4
UL UL UL UL UL UL UL UL IL DS US LS R
33dpi
M

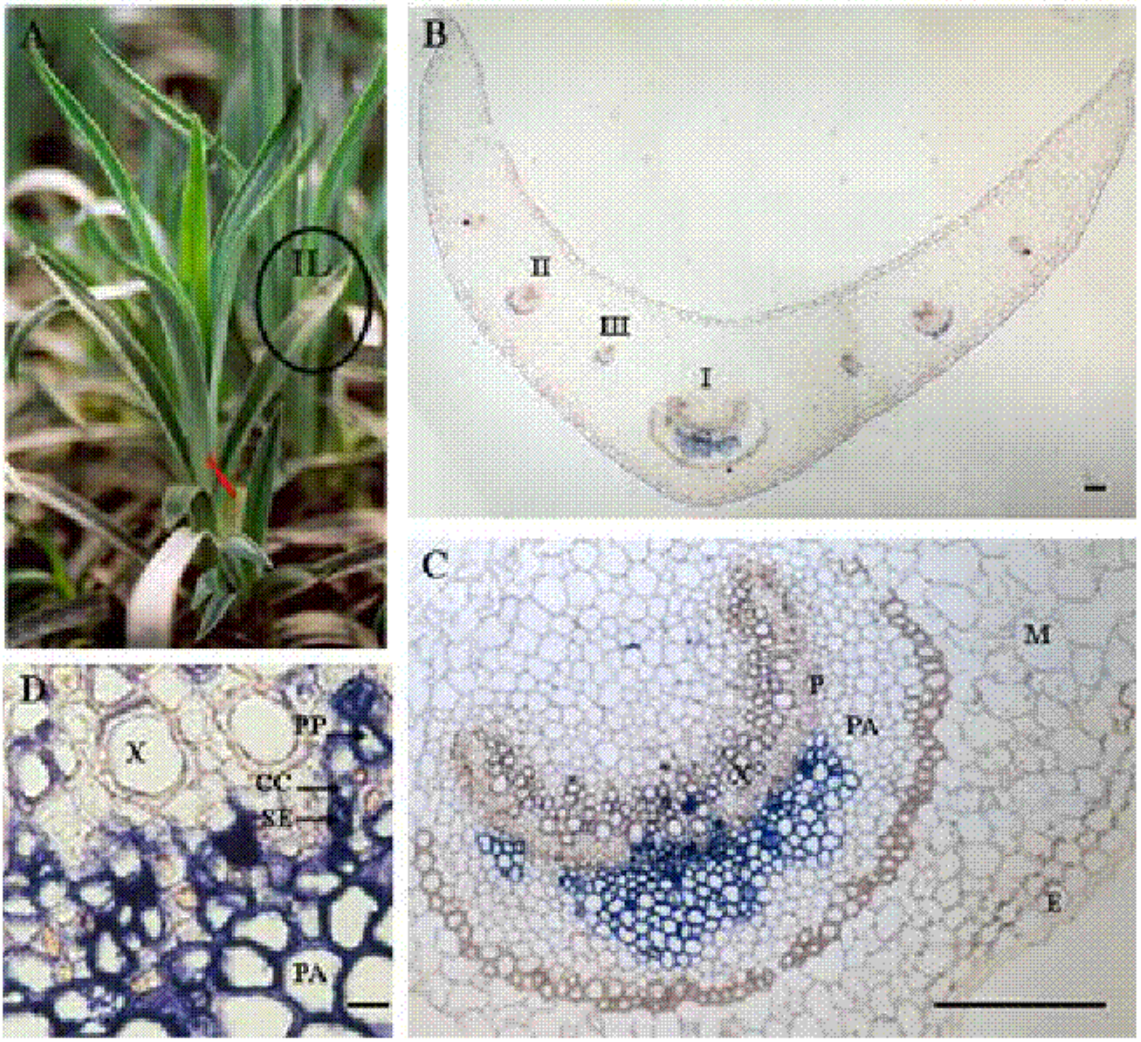


FIGURA 4. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de la base de la hoja inoculada de clavel a 12 dpi. Las zonas infectadas por el virus se identifican por el color azul de la reacción inmunocitoquímica. (A), fotografía de una planta de clavel donde se señala con un círculo la zona de inoculación de la hoja y mediante una línea roja la zona por donde se seccionó para su estudio inmunocitoquímico. **(B),** sección transversal de la base de la hoja inoculada donde se observa su forma típica de quilla con un haz central de mayor tamaño (haz de orden I **(I)**) y numerosos haces laterales más pequeños (haces de orden II **(II)** y III **(III)**). Obsérvese cómo la reacción inmunocitoquímica solamente se localiza en el haz central de la hoja. **(C),** haz central de esta hoja inoculada. Obsérvese cómo la señal de infección sólo se localiza sobre el tejido floemático **(P)** y el parénquima de la hoja asociado al haz vascular **(PA)** que rodea a éste. **(D),** detalle del tejido floemático de este haz central donde se observan infectados elementos conductores de la savia **(SE),** células acompañantes **(CC)** y células del parénquima floemático **(PP). (IL),** hoja inoculada; **(E),** epidermis; **(M),** mesófilo; **(X),** xilema. Barra=100 µm. En **(D)** barra=10 µm.

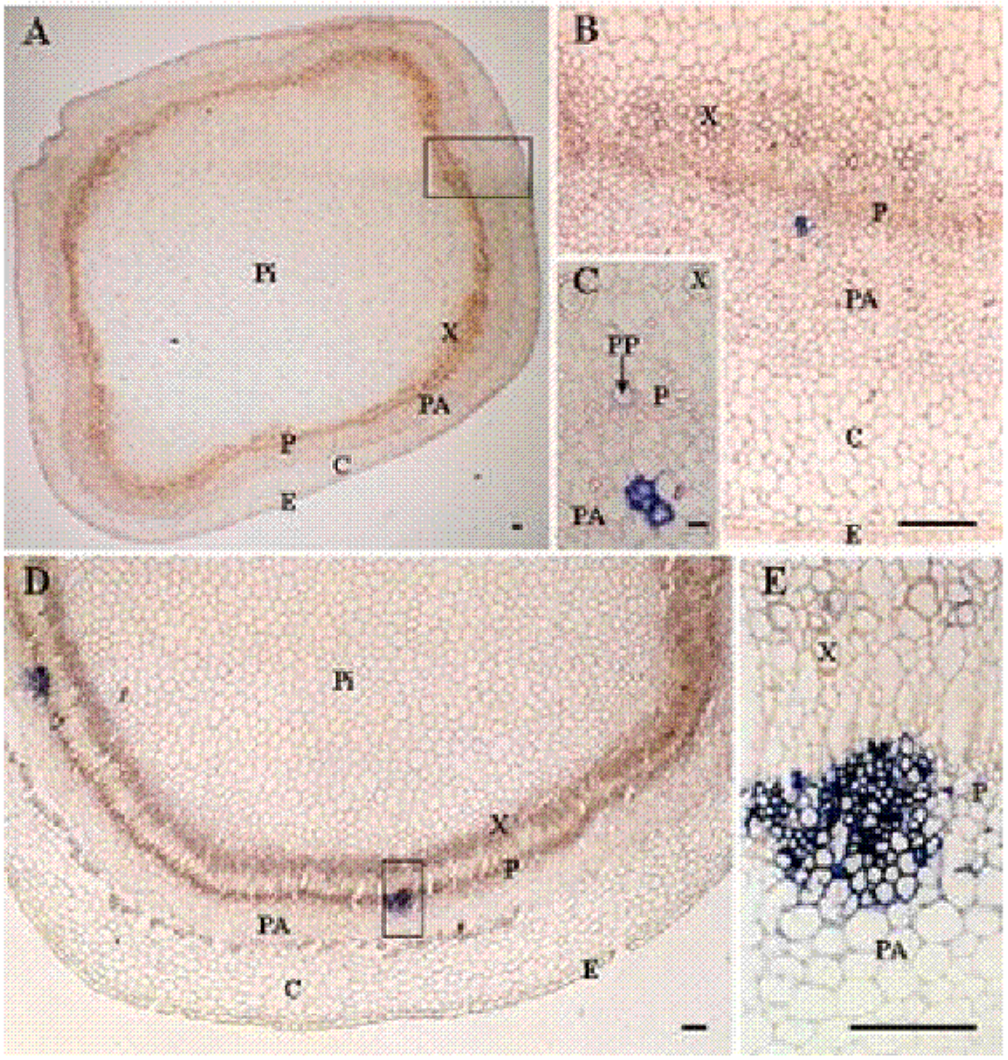


FIGURA 5. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en una sección transversal del tallo por encima (A-C) y por debajo (D y E) de la hoja inoculada de una planta de clavel a 12 dpi. (A), sección transversal del tallo por encima de la hoja inoculada, donde se observa la morfología de éste y se distinguen las diferentes capas de tejidos: epidermis **(E)**, corteza **(C)**, parénquima de la corteza asociado al tejido vascular **(PA)**, tejido floemático **(P)**, xilema **(X)** y médula **(Pi)**. En el tallo se observa sólo un reducido grupo de células infectadas, lo que se ve más claramente en la siguiente micrografía **(B)** que corresponde a la zona del recuadro. **(C)**, detalle de este grupo de células infectadas donde se identifican como células del parénquima de la corteza asociado al tejido vascular **(PA)**, y se localizan muy próximas al tejido floemático **(P)**, donde se ha señalado una célula del parénquima floemático **(PP)**. **(D)**, sección transversal del tallo por debajo de la hoja inoculada donde se observan sólo dos grupos de células infectadas en un lateral. **(E)**, detalle del grupo del recuadro, donde se observa infectado el tejido floemático **(P)** y algunas células del parénquima de la corteza asociado al tejido vascular **(PA)**. Barra=100 µm. En **(C)** barra=10 µm.

Las primeras hojas sistémicas con señal de infección aparecen en las impresiones de tejido a 12 dpi y se correspondían con el segundo par de hojas por encima de la hoja inoculada (Fig. 3A, 2UL,12 dpi). Las hojas localizadas por debajo de la hoja inoculada no eran infectadas por el virus ni siquiera en estadíos posteriores de infección (Fig. 3A, –2 y –1UL). Este último resultado, claramente refleja el paralelismo de las rutas de invasión del virus con el flujo del fotoasimilado, cuyo patrón está condicionado así mismo por las relaciones fuente-sumidero. Estas hojas más maduras dejaron de ser sumidero antes de que el virus pudiera llegar a ellas y al igual que ocurre con la hoja paralela a la hoja inoculada (Fig. 3A, PL), el virus no puede llegar a ella vía floema.

En los estadíos tempranos de la infección (12 dpi) se observó que la señal de infección que aparecía en las hojas sistémicas de las impresiones de tejido se localizaba sólo en un lado de la hoja (Fig. 3A, 2UL 12 dpi). Cuando realizamos el análisis inmunocitoquímico de secciones de la hoja sistémica de la planta 1 de las impresiones de tejido a 12 dpi (Fig. 6), se observó que efectivamente el virus sólo se localiza en el lateral del haz central coincidiendo con el lado de infección de la hoja, mientras que el lado contrario estaba libre de señal (Fig. 6A). Además, la señal de infección se localizaba principalmente en los haces secundarios de la hoja, mientras que el haz principal apenas presentaba infección (Fig. 6A y C). En cuanto a los haces secundarios (Fig. 6C, D y E) mostraron señal de infección en las células del floema, en el parénquima de la hoja asociado al haz vascular y en el parénquima del xilema, así como, en algunas células del mesófilo cercanas a ellos (Fig. 6D y E). Por tanto, la descarga floemática y del virus en la hoja sistémica es llevada a cabo por los haces secundarios.

Esta respuesta asimétrica de la infección tanto en hojas sistémicas como en el tallo, es consecuencia de la disposición filotáctica de las hojas respecto a la hoja inoculada, de manera que sólo se infecta el lado del tallo que coincide con la inserción de la hoja inoculada y lo mismo ocurre con las hojas sistémicas en los estadíos

tempranos de la infección en los que sólo se infecta el lado de la hoja que conecta con el floema infectado del tallo y que coincide con la posición de la hoja inoculada en la planta.

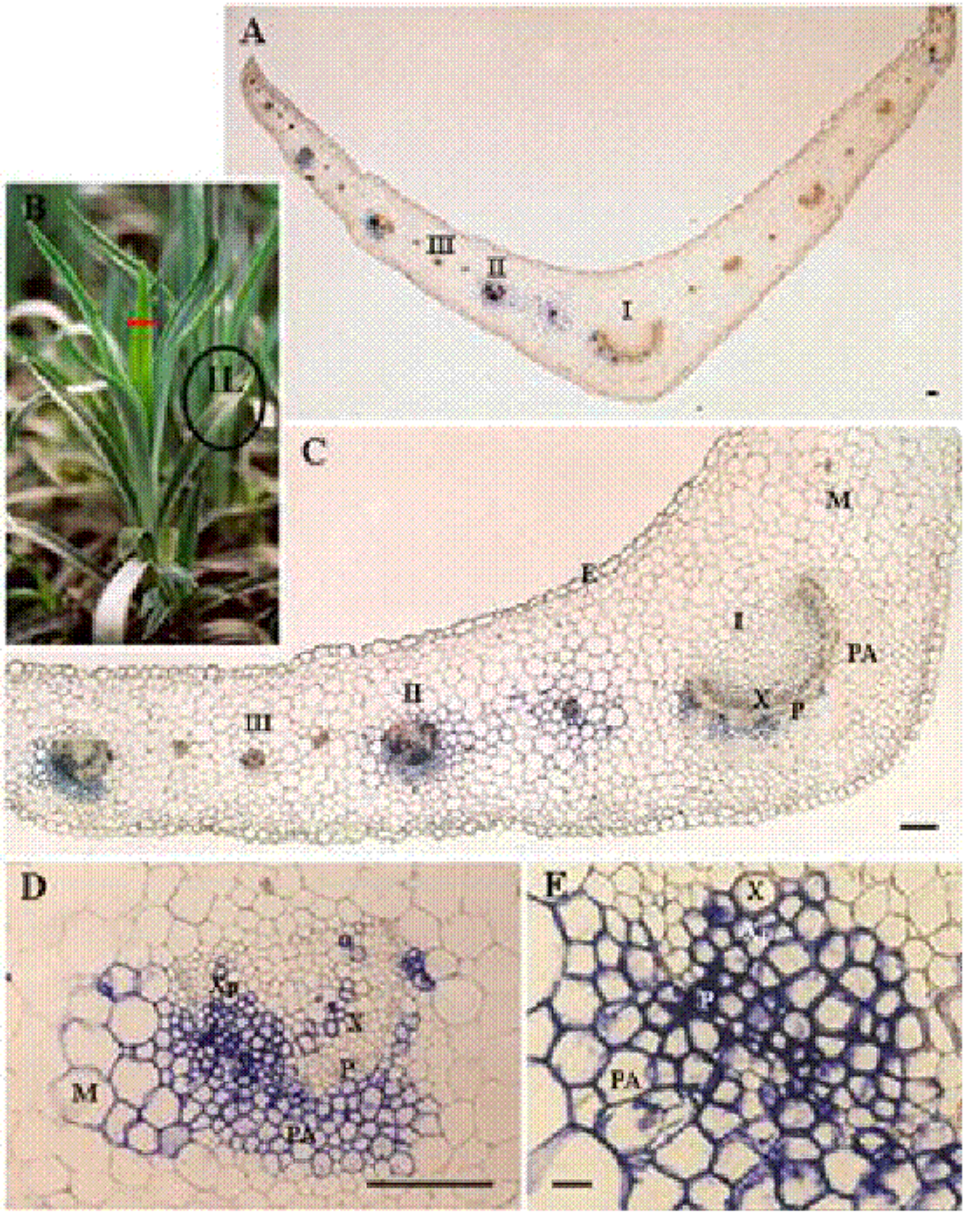


FIGURA 6. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en una sección transversal de hoja sistémica de una planta de clavel a 12 dpi. (A), obsérvese cómo la reacción sólo se localiza en el lado izquierdo de la hoja. **(B),** fotografía de una planta de clavel donde se señala la hoja inoculada con un círculo y la posición de la hoja sistémica utilizada para este estudio inmunocitoquímico con una línea roja. **(C),** zona lateral izquierda de la hoja sistémica donde se observa cómo la reacción se localiza preferentemente en los haces secundarios de orden II **(II)** y sólo la parte izquierda del haz central **(I)** presentó señal de infección. **(D),** haz de orden II mostrando infectados el tejido floemático **(P),** el parénquima asociado al tejido vascular **(PA),** el parénquima del xilema **(Xp)** y algunas células del mesófilo **(M). (E),** detalle del haz de orden II anterior, donde se observan a mayores aumentos los tejidos vasculares infectados. **(IL),** hoja inoculada; **(III),** haz de orden III; **(X)** xilema. Barra=100 µm. En **(E)** barra=10 µm.

En estadíos posteriores (14-17 dpi), se observó que la señal de infección aumentaba en todos los tejidos infectados de la planta de clavel (Fig. 3A, 14 y 17 dpi). Así, la respuesta observada en la hoja inoculada no aparece en las impresiones de tejido como un sólo punto, sino que la señal se extendía a otros haces vasculares y a células del mesófilo, tal y como se pudo observar tras los análisis de inmunocitoquímica (Fig. 7A y B). De la misma manera, en las hojas sistémicas la infección se extiende a todos los haces vasculares y prácticamente a todas las células del mesófilo y a gran parte de la epidermis de la hoja, como se observó en el estudio inmunocitoquímico de una hoja sistémica a 17 dpi (Fig. 7C y D). El tallo sigue manteniendo una asimetría en la señal de infección; a 14 dpi, el virus aún no se extiende a otros tejidos dentro del tallo, sino que, como demostraron los resultados de la inmunocitoquímica, aparecieron más focos de infección a modo de grupos de células que afectaban sólo al tejido floemático y al parénquima de la corteza asociado al tejido vascular, (Fig. 8A-C) y son necesarios más días post-inoculación (17 dpi) para encontrar tejidos como la epidermis, corteza y médula infectados, aunque manteniendo siempre su asimetría (Fig. 8D y E).

Se necesitan estadíos muy tardíos de infección para llegar a conseguir una infección viral como se muestra en "las impresiones de tejido" a 33 dpi, donde todas las posibles hojas sistémicas están muy infectadas, así como los tallos y raíces (Fig. 3C). Esta infección se asemejaría a una infección viral natural, donde el tallo y la hoja presentan una reacción más generalizada del virus invadiendo prácticamente todos los tipos celulares de la hoja (epidermis, mesófilo y haces vasculares) (Fig. 9A-C) y del tallo (epidermis, corteza, parénquima de la corteza asociado al tejido vascular, floema, cámbium y parénquima del xilema) con la excepción de los elementos conductores del xilema (Fig. 9D y E). Por tanto, el virus viaja igualmente por floema en la infección natural. En el caso de la infección natural hay que tener en cuenta la posible participación de un vector biológico (*Aphi gossypii*) a través de la raíz, que hasta el momento no ha sido estudiado y que posiblemente descargaría el virus directamente

en el tejido vascular, acelerando todos los procesos de infección y causando por tanto una infección muy elevada y mayoritaria.

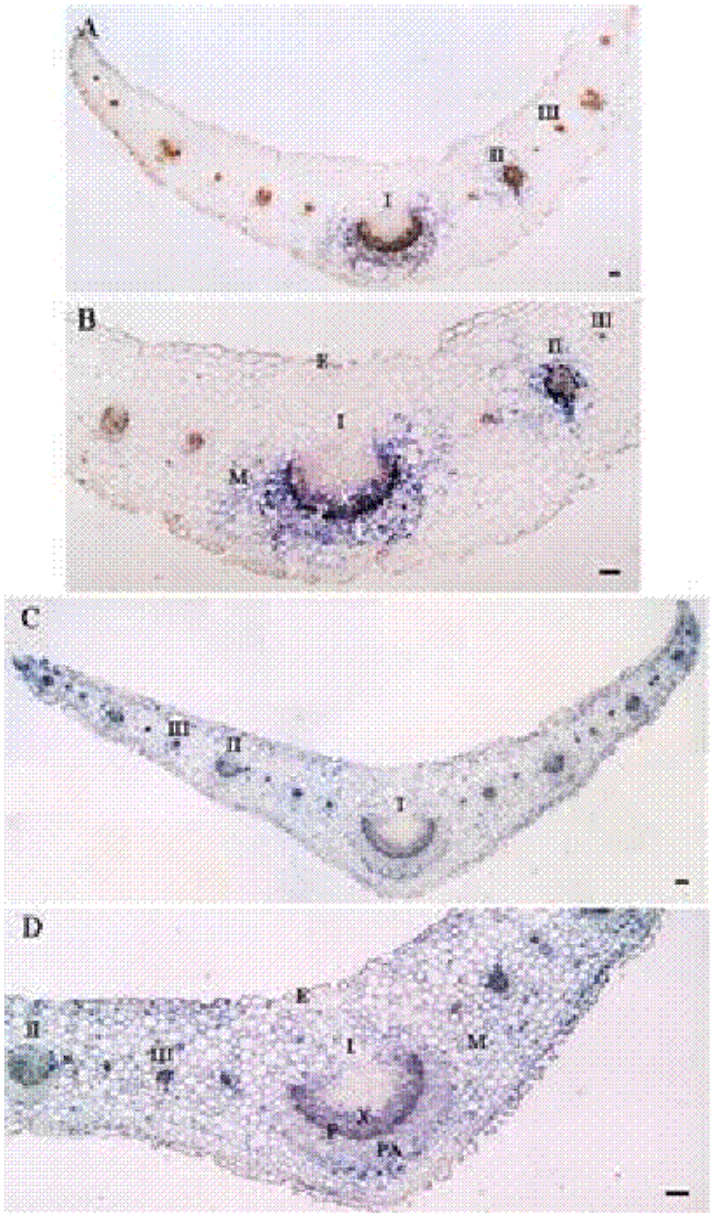


FIGURA 7. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de hoja inoculada a 14 dpi (A y B) y hoja sistémica a 17 dpi (C y D) de plantas de clavel. (A), obsérvese cómo en la hoja inoculada la señal de infección aparece sobre el haz central **(I)** y un haz lateral de orden II **(II). (B),** detalle de la zona infectada de la micrografía anterior donde se observa cómo la señal de infección afecta al tejido floemático **(P)** y al parénquima de la hoja asociado al haz vascular **(PA)** del haz central **(I),** a algunas células del mesófilo **(M)** y al haz de orden II **(II). (C),** obsérvese cómo en la hoja sistémica la señal de infección afecta a todos los haces vasculares y prácticamente a todo el mesófilo y gran parte de la epidermis **(D),** un mayor aumento de la zona central de la hoja anterior donde se observa cómo la señal de infección en el haz central **(I)** afecta al tejido floemático **(P),** al parénquima asociado al tejido vascular **(PA)** y al parénquima del xilema que rodea los elementos conductores del xilema **(X). (III),** haz de orden III; **(E),** epidermis;. Barra=100 **µm.**

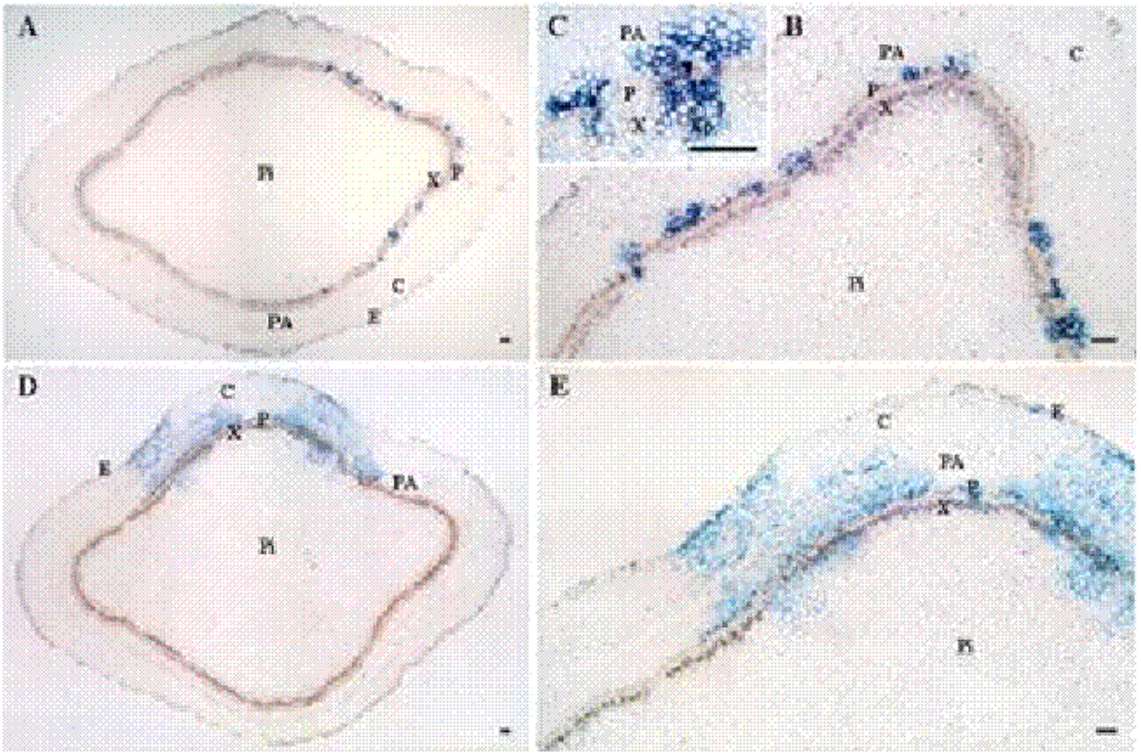


FIGURA 8. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales del tallo por encima de la hoja inoculada de plantas de clavel a 14 dpi (A-C) y 17 dpi (D y E). (A), obsérvese cómo la señal de infección sólo se localiza en la mitad derecha del tallo. **(B),** un mayor aumento de la zona infectada del tallo anterior donde se observa cómo la señal de infección aparece a modo de grupos individuales que afectan al tejido floématico **(P). (C),** detalle de dos grupos celulares infectados del tallo anterior que incluyen al tejido floemático **(P),** las células del parénquima de la corteza asociado al tejido vascular **(PA)** y algunas células del parénquima del xilema **(Xp). (D),** Obsérvese cómo a pesar de lo avanzado de la infección la señal sólo se localiza en la parte central superior del tallo. **(E),** un mayor aumento de la zona infectada del tallo anterior donde se pone de manifiesto cómo la señal de infección es más homogénea que la del tallo a 14dpi **(A-C)** y afecta a algunas células de la epidermis **(E),** a la corteza **(C),** al parénquima de la corteza asociado al tejido vascular **(PA),** al tejido floemático **(P)** y a algunos grupos de células de la médula **(Pi)** cercanos al tejido xilemático **(X).** Barra=100 µm.

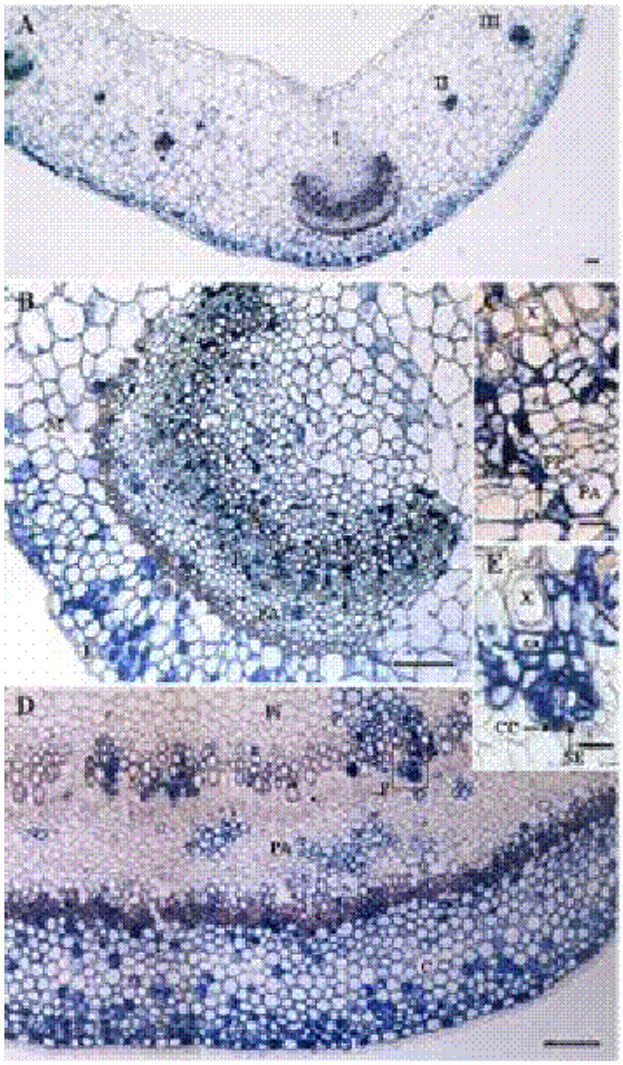


FIGURA 9. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de hoja (A-C) y tallo (D y E) de plantas de clavel con infección natural. (A), obsérvese cómo la señal de infección afecta a todos los haces vasculares y prácticamente a todos los tejidos de la hoja. **(B),** un mayor aumento del haz central **(I)** de la hoja anterior donde se observan infectados el tejido floemático **(P),** el parénquima de la hoja asociado al haz vascular **(PA),** el parénquima del xilema que rodea los elementos conductores del xilema **(X),** el mesófilo **(M)** y la epidermis **(E). (C),** detalle del tejido floemático del recuadro del haz anterior, donde se ha señalado una célula del parénquima floemático **(PP)** no infectada junto a la que se encuentra un grupo de células infectadas que se corresponden con elementos conductores de la savia **(SE)** y células acompañantes **(CC). (D),** obsérvese cómo aparece infectada toda la corteza **(C)** y la epidermis **(E),** grupos de células del parénquima de la corteza asociado al sistema vascular **(PA),** del tejido floemático **(P)** y la médula **(Pi). (E),** detalle de un grupo de células infectadas del tejido floématico donde se localizan células del parénquima floemático **(PP),** elementos conductores de la savia **(SE)** y células acompañantes **(CC). (ca)** cambium. Barra=100 µm. En **(C y E)** barra=10 µm.

3.2. Tejidos sumideros

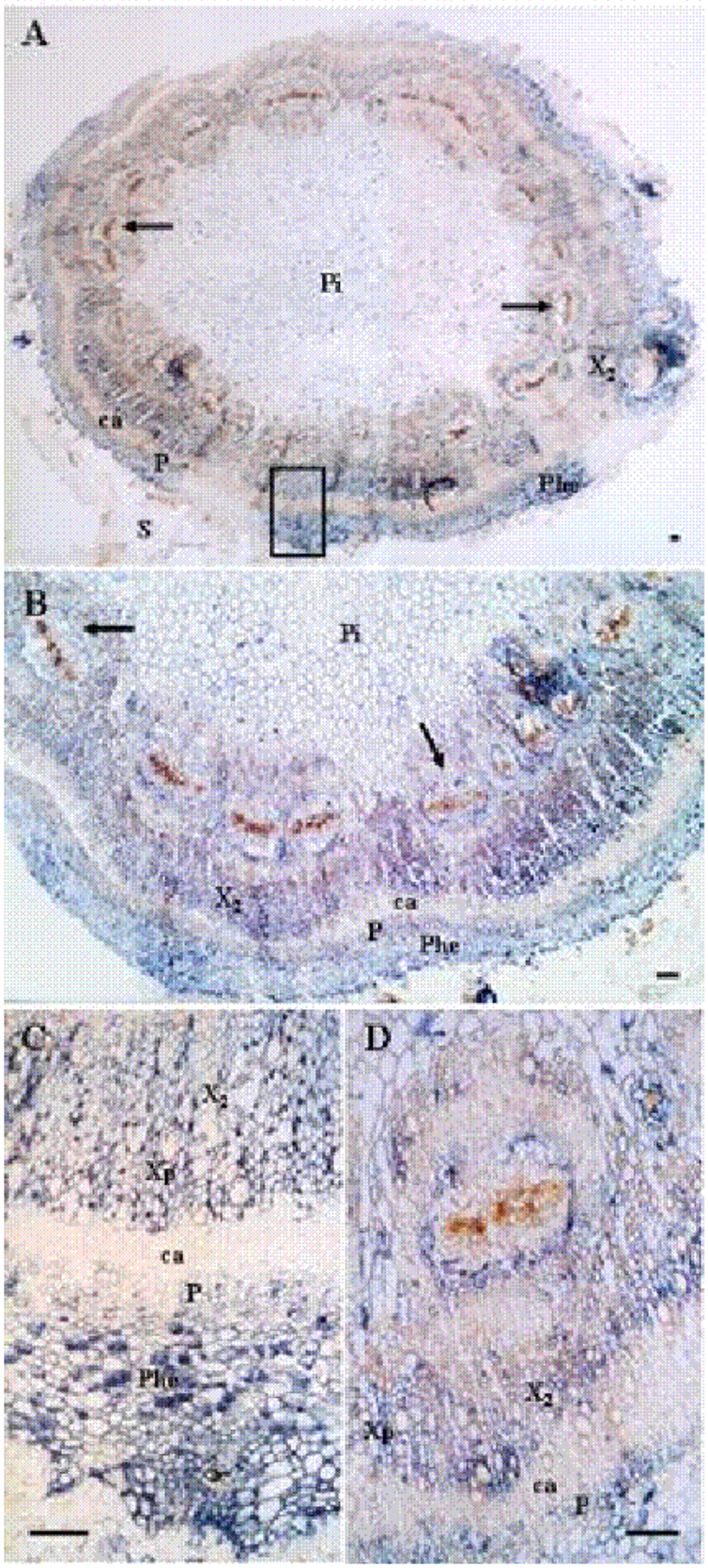
a) Raíz

Todas las plantas infectadas utilizadas en este estudio, tanto las inoculadas con preparaciones de virus purificado como las que presentaban una infección natural, proceden de esquejes y por tanto no desarrollan una raíz central sino raíces laterales o adventicias a partir del tallo subterráneo, mediante un tratamiento hormonal. La primera señal de infección en raíz apareció en las impresiones de tejido a 10 dpi aunque era una señal muy débil y muy localizada (Fig. 3A, R 10 dpi) que fue aumentando y extendiéndose con el paso de los días post-inoculación (Fig. 3A, R 12, 14 y 17 dpi). El tallo subterráneo de clavel tenía un crecimiento secundario, ya que secciones transversales mostraban la presencia de felógeno, tejido meristemático semejante al cámbium que genera una felodermis hacia el interior del tallo donde se ubica el floema y un suber hacía el exterior del mismo con células lignificadas que se van desprendiendo (Fig. 10A-C). Además, se observaron unas unidades estructurales concéntricas rodeando toda la médula del tallo localizándose entre el xilema secundario (Fig. 10A, B y D). Creemos que estas unidades aparecen como consecuencia del tratamiento hormonal y parecen contribuir a la formación de raíces adventicias en la médula, pero no se han realizado estudios celulares suficientes que puedan corroborar estas suposiciones. Las raíces laterales se forman en la felodermis, observándose acumulos de células en proliferación en esta capa (Fig. 10A y C). Los estudios inmunocitoquímicos del tallo subterráneo a 14 dpi demostraron que el virus infectaba sólo uno o dos grupos de células floemáticas junto con algunas células de la felodermis (datos no mostrados). Sólo cuando realizamos el estudio inmunocitoquímico a 29 dpi obtuvimos una señal de infección que afectaba a gran parte de los tejidos del tallo subterráneo (Fig. 10); observándose como la mayor parte del suber de la raíz, que prácticamente no presentaba infección, se había desprendido quedando algún resto de células unidas al felógeno. La infección se concentraba en la felodermis, que junto con el floema aparecían formando una capa azul que rodeaba

todo el tallo subterráneo prácticamente de manera continua, aunque en ocasiones era interrumpida por zonas libres de infección (Fig. 10A, B y C). Entre el xilema secundario y el floema aparece una capa de células pequeñas en el cámbium (ca en Fig. 10) que no presentaba infección. Por el contrario, el parénquima, que rodea el xilema secundario, y la médula aparecían completamente infectados por el virus (Fig. 10A y B). También se observaron en la felodermis zonas de proliferación celular infectadas que son las que dan lugar a las raíces laterales (Fig. 10C).

Cuando se realizaron secciones transversales de raíces laterales y adventicias con crecimiento secundario procedentes de una infección natural tomadas al azar (Fig. 11A y B), se observó cómo el suber también se iba desprendiendo, apenas presentaba infección y sólo algunos grupos de células aparecían infectadas. Las primeras capas de células de la felodermis y algunas células del felógeno eran las únicas células que aparecían infectadas rodeando toda la raíz. Sólo en un lateral de la raíz se observó un grupo de células floemáticas con intensa reacción positiva (Fig.11A y B), aunque también se observaron algunas células infectadas del tejido floemático alrededor de toda la raíz. En esta misma región lateral de la raíz, debajo de este grupo floemático infectado, también presentaron infección un grupo de células del parénquima del xilema (Fig. 11A y B). Además, se analizaron raíces laterales o adventicias con crecimiento primario (Fig. 11C), cuyas secciones transversales mostraron una epidermis que rodeaba a la corteza y a la endodermis, que a su vez rodean al cilindro vascular muy reducido donde se ubicaban el floema y el xilema rodeados por el periciclo. En este caso la infección se limitó al cilindro vascular, afectando al tejido floématico y al periciclo y alguna célula de la endodermis (Fig. 11C).

Figura 10. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de un tallo subterráneo de plantas de clavel a 29 dpi. (A), obsérvese cómo parte del suber **(S)** se ha desprendido y apenas aparece infectado. Cerca de la médula **(Pi)** entre el xilema secundario **(X_2)** aparecen numerosas unidades estructurales concéntricas que rodean todo el tallo subterráneo **(^)**. **(B),** parte lateral de este tallo subterráneo donde se observa cómo la felodermis **(Phe)** junto con el tejido floemático **(P)** aparecen infectados formando una franja azul que circunda todo el tallo. **(C),** detalle del área recuadrada en **(A)** mostrando el tejido floemático **(P)** y la felodermis **(Phe)** infectados, separados del parénquima xilemático **(Xp)** que también está infectado, por el cámbium **(ca)** en el que no se detecta infección viral. Obsérvese una proliferación celular **(Φ)** en la zona de la felodermis **(Phe)** que dará lugar a una raíz lateral. **(D),** detalle de una unidad estructural, donde se observa su localización entre el xilema secundario **(X_2)** cercano a la médula. Barra=100 µm.


A
Pi
X2
ca
P
Phe
S
B
Pi
X2
ca
P
Phe
C
X2
Xp
ca
P
Phe
D
X2
Xp
ca
P

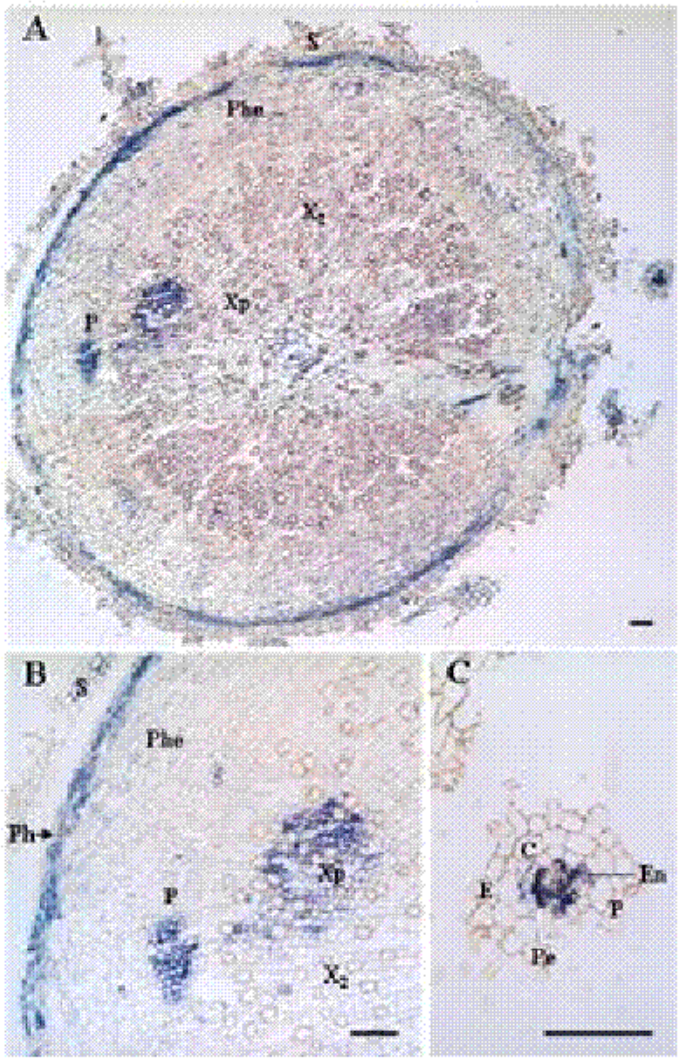


FIGURA 11. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de raíces laterales y adventicias con crecimiento secundario (A y B) y primario (C) de plantas de clavel con infección natural. (A), obsérvese cómo la señal de infección se limitó a las primeras capas de células de la felodermis **(Phe)** que forman una franja azul continua circundando toda la raíz y a dos grupos de células en la parte central izquierda de la raíz. **(B),** detalle del lado superior izquierdo de la raíz anterior donde se observan infectadas las primeras capas de la felodermis **(Phe),** algunas células del felógeno **(Ph)** (la célula que se señala con la flecha no está infectada) y un pequeño grupo de células del tejido floemático **(P),** así como otro grupo de células del parénquima del xilema **(Xp)** rodeando a los elementos conductores del xilema secundario **(X_2)** que no están infectados. **(C),** sección transversal de una raíz con crecimiento primario, donde se observa la epidermis **(E)** junto con la corteza **(C)** no infectados y la endodermis **(En)** con alguna célula infectada, rodeando el cilindro vascular donde aparecen infectados todos sus componentes: el pericicio **(Pe)** y el tejido floemático **(P),** con la excepción de los elementos conductores del xilema. Barra=100 µm.

b) Meristemo apical

Con el fin de identificar el meristemo apical y analizar su posible infección se realizaron secciones longitudinales de brotes apicales de plantas de clavel inoculadas y de plantas que presentaban una infección natural con el CarMV.

En una sección longitudinal de un brote apical realizada a 33 dpi (Figs. 12 y 13) se observaba, en la parte central apical del tallo, el meristemo apical con sus dos primordios foliares y alrededor varias hojas en diferentes estadíos de desarrollo, rodeadas a su vez por hojas verdaderas de mayor tamaño (Figs. 12 y 13A y B). También se observó un brote lateral del tallo en la parte izquierda con su correspondiente meristemo y hojas en desarrollo a su alrededor (Figs. 12 y 13C). A su vez, en la parte derecha se observaba un meristemo lateral que dará lugar a otro brote lateral del tallo con sus primordios foliares (Figs. 12 y 13A). En la parte central más cerca del meristemo también se observaban pequeñas yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes (Figs. 12, 13A y B). El patrón de distribución del virus en el brote apical de plantas de clavel es idéntico tanto en plantas inoculadas como en una infección natural. En todos los casos analizados, el virus nunca invade el meristemo apical en ninguna de sus capas ni los primordios foliares (Fig. 13B). Una situación similar se observó en los meristemos de brotes laterales del tallo (Fig. 13C) y las pequeñas yemas axilares (Fig. 13A y B). En general, la localización del virus estaba limitada al tejido vascular diferenciado del brote apical, de manera que en el tallo del brote apical sólo aparecen infectados el tejido floemático y alguna célula del parénquima de la corteza de alrededor y de forma discontinua a lo largo del tallo longitudinal, apareciendo el resto de tejidos (médula, xiléma, corteza y epidermis) libres de infección (Figs. 12 y 13A). Sin embargo, las secciones de tallo por debajo de estos brotes apicales, como se muestran en las impresiones de tejido a 33 dpi, aparecían más infectadas conforme nos alejábamos del brote apical, mostrando una reacción uniforme por todo el tallo (Fig. 3C, DS y US 33 dpi). El virus también se localizó sobre todo en el tejido floemático que conecta la base de las hojas desarrolladas con el tallo, así como de manera

discontinua a lo largo de estas hojas (Figs. 12, 13A y B). En el brote lateral también se pudo observar una zona de intensa infección en la base de éste, localizada sobre el tejido floemático del sistema vascular de este pequeño tallo y sobre las células del parénquima de la médula y del mesófilo de las hojas desarrolladas que conectan en esta intersección tallo-hoja donde en estadíos más tardíos del desarrollo se conectan los tejidos vasculares de la hoja con el tallo (Fig. 13C y D). En los análisis de plantas con infección natural excepcionalmente se encontró un brote apical que presentaba un grupo de células infectadas en el centro de la médula del tallo por debajo del meristemo apical que estaban relativamente cerca del mismo (Fig. 14A y B). Este mismo brote apical presentaba otro grupo de células infectadas que aparecían en la base de una hoja en desarrollo del segundo par de hojas que rodean el meristemo apical, que corresponde a una zona de conexión del sistema vascular del tallo y la hoja (Fig. 14A y B). Este grupo de células estaba aún más cerca del meristemo, pero aún así en ningún caso se encontró señal de infección en el meristemo apical. Además, los resultados obtenidos con las técnicas de inmunocitoquímica e hibridación in situ fueron coincidentes y por tanto la proteína de cubierta y el RNA viral colocalizan también en la zona del alrededor del meristemo apical de plantas de clavel inoculadas (Fig. 15A y B) y en meristemos de brotes laterales de plantas con infección natural (Fig. 15C y D).

Se demuestra así que en estas hojas que se van desplegando, en las que sus haces vasculares mantienen continuidad con la red vascular del tallo proporcionan una vía de entrada del virus. Se ha observado que esta vía de entrada del virus ocurre a partir del segundo par de hojas en desarrollo alrededor del meristemo apical (Figs. 14D y 15A). Una vez que el virus entra en el sistema vascular en desarrollo de la hoja infectando el protofloema, sale de éste e infecta las células del parénquima en desarrollo y la protodermis (Fig. 14C y D).

En todos los brotes analizados las hojas verdaderas que envuelven el meristemo apical y todo el brote apical rodeando el tallo aparecían muy infectadas

(Fig. 14A), ya que se trata de hojas jóvenes que están actuando como fuertes sumideros en el flujo del fotoasimilado.

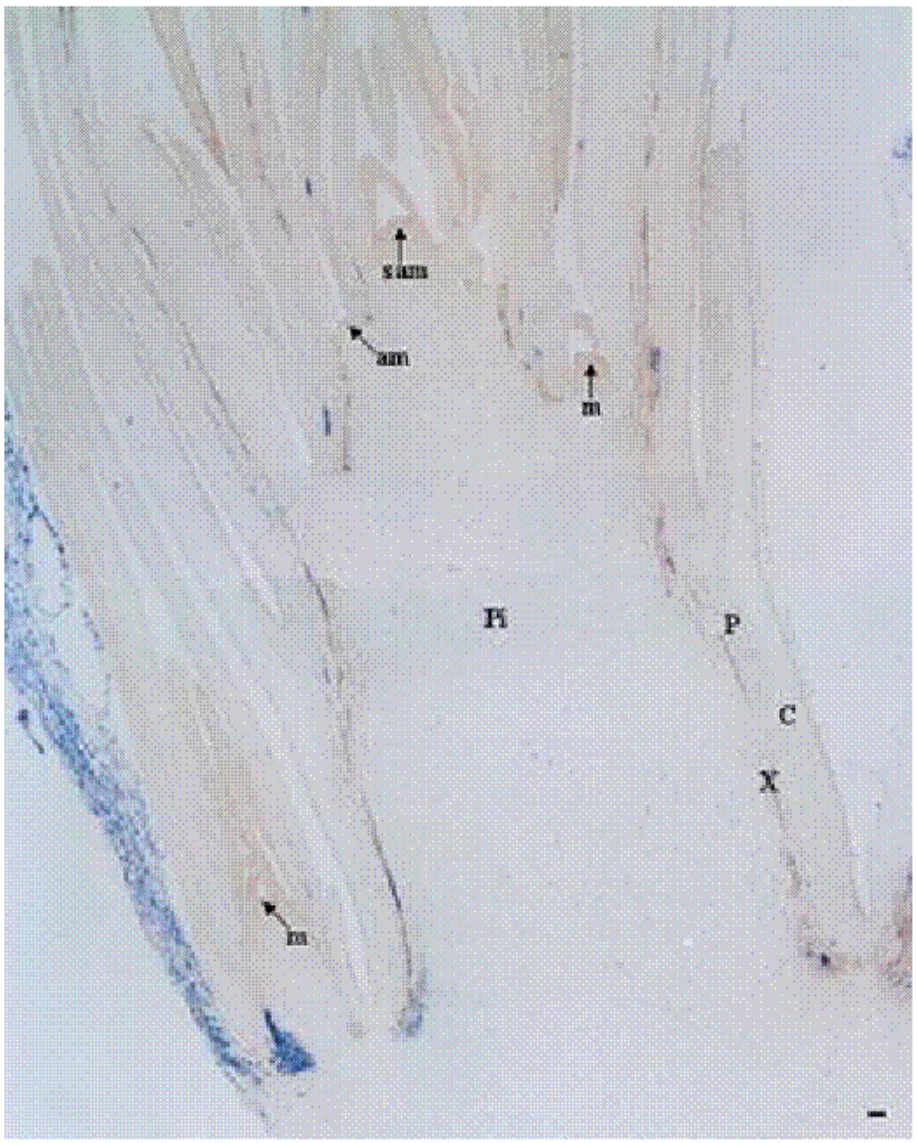


FIGURA 12. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en una sección longitudinal del brote apical de una planta de clavel a 33 dpi. Obsérvese el meristemo apical **(sam)** en la parte central y superior del brote apical, un meristemo lateral **(m)** en el lado derecho y un brote lateral con su meristemo **(m)** en el lateral izquierdo. Todos los meristemos aparecen libres de infección y la señal se limitó al tejido floemático **(P)** del brote apical, a un grupo de células en la base del brote lateral y a la hoja ya desarrollada junto a éste. **(am)**, yema axilar; **(C)**, corteza; **(Pi)**, médula; **(X)**, xilema; Barra=100 µm.

FIGURA 13. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en una sección longitudinal del brote apical de una planta de clavel a 33 dpi. (A), un detalle de la zona central del brote apical de la figura anterior mostrando el meristemo apical **(sam).** En su lado izquierdo se localiza una pequeña yema axilar **(am)** y en su lado derecho otro meristemo lateral **(m).** La infección se limitó al tejido floemático de las hojas **(P)** y del tallo **(P)** del brote apical, sobre todo en las zonas de conexión del tejido vascular de las hojas con el tallo **(➔). (B),** detalle del meristemo apical anterior **(sam)** y sus primordios foliares **(LP),** así como de una pequeña yema axilar **(am)** en la parte izquierda. La infección se limitó al tejido floemático que conecta las hojas en desarrollo con el tallo **(➔)** y al floema **(P)** de estas hojas. **(C),** brote lateral con su meristemo **(m)** del lado izquierdo del brote apical de la figura 12, la señal se limitó a grupos de células en la base del brote lateral en las zonas de inserción de las hojas con el tallo **(➔)** y a la epidermis **(E),** mesófilo **(M)** y tejido vascular de la hoja desarrollada que envuelve el brote apical. También se observó señal en el floema de las hojas en desarrollo que envuelven el meristemo **(P). (D),** detalle del grupo de células infectadas en la base del brote de la micrografía anterior, donde se observan infectadas células del tejido floemático **(P)** y células de la médula **(Pi),** así como células del mesófilo **(M)** de la hoja que conecta con el tallo del brote lateral. Barra=100 µm.

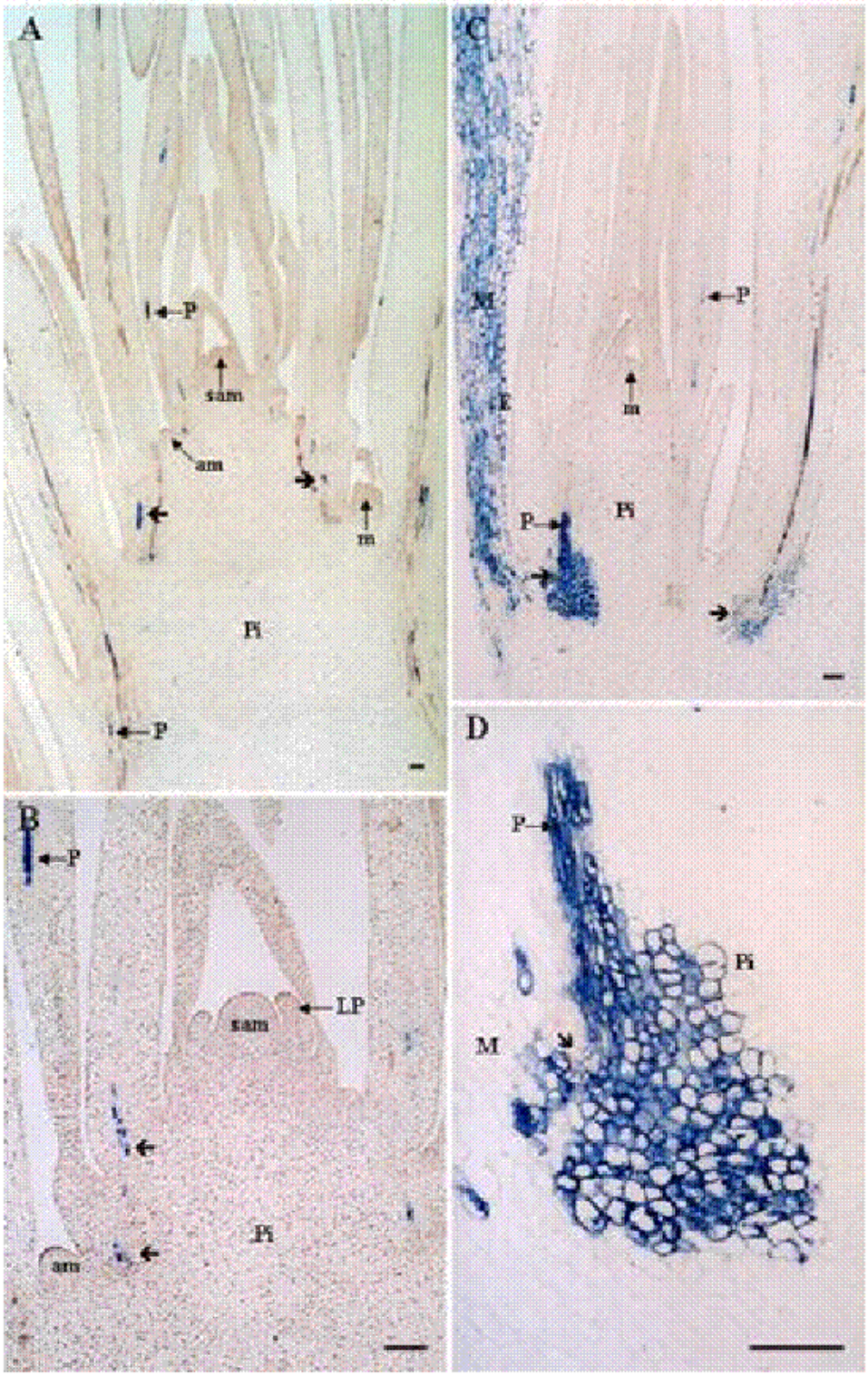

A
P
sam
am
m
Pi
P
B
P
LP
sam
Pi
am
C
M
P
E
m
Pi
P
D
P
Pi
M

FIGURA 14. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en una sección longitudinal del brote apical de una planta con infección natural. (A), obsérvese el meristemo apical **(sam)** en la parte central y superior rodeado de hojas en diferentes estadíos de desarrollo. Las hojas verdaderas que rodean el brote apical aparecen muy infectadas en el floema **(P)** y mesófilo **(M)**. También una hoja en desarrollo de un brote lateral en la parte derecha del brote apical aparece muy infectada. En la médula **(Pi)** del brote apical, aparece un grupo de células infectadas relativamente cerca del meristemo apical, así como en la zona de intersección del tejido floemático del tallo con el de una hoja en desarrollo **(➔)**. **(B)**, detalle de la zona del meristemo apical **(sam)**, donde se observa este grupo de células de la médula **(Pi)** infectadas relativamente cerca del meristemo y aún más cerca del mismo, un pequeño grupo de células que aparecen infectadas en la zona de intersección del tejido floemático del tallo con el de la hoja en desarrollo **(➔)**, hoja que pertenece al segundo par de hojas en desarrollo que rodean el meristemo apical. **(C)**, detalle de la hoja en desarrollo del brote lateral derecho de **(A)**, donde se observa la protodermis **(E)**, el parénquima en desarrollo **(Lp)** y el protofloema **(P)** muy infectados. **(D)**, sección transversal seriada del brote lateral derecho de **(A)** donde se muestra el meristemo **(m)**, observándose una hoja en desarrollo infectada que pertenece al segundo par de hojas que rodea este meristemo lateral y también aparece infectado un pequeño grupo de células en la intersección de esta hoja con el tejido floemático del tallo **(➔)**. Barra=100 µm.

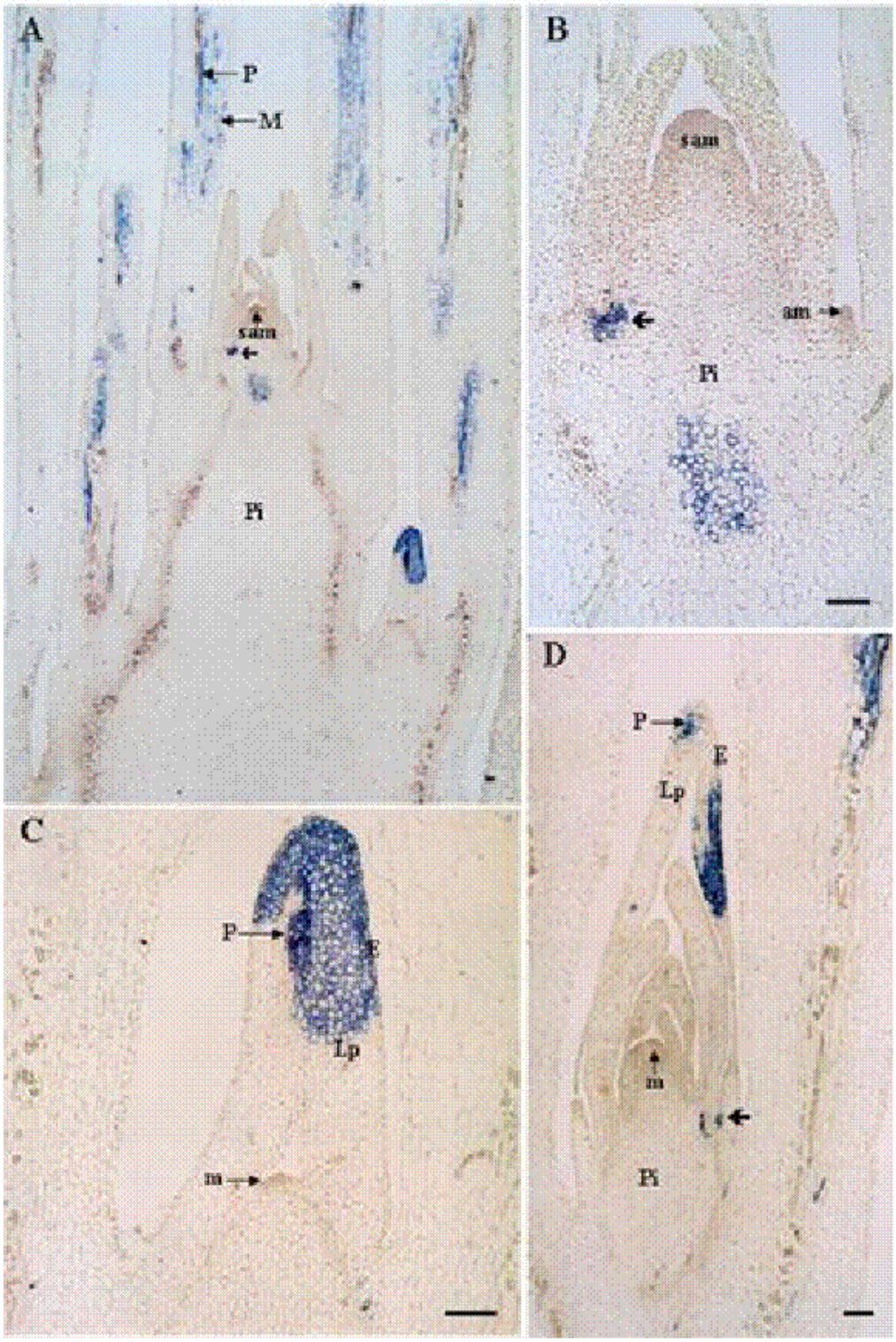
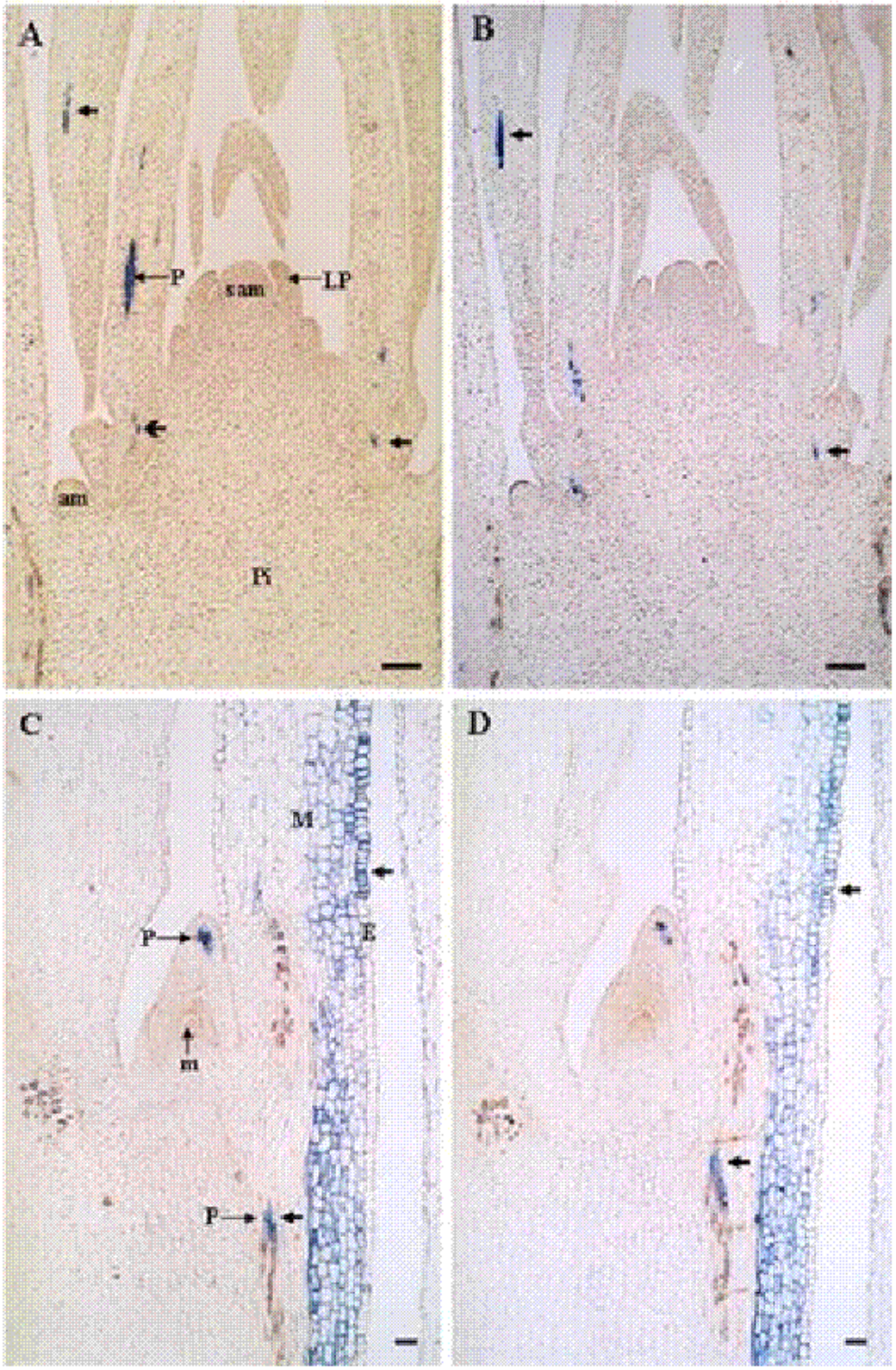

A
P
M
sam
Pi
B
sam
am
Pi
C
P
E
Lp
m
D
P
E
Lp
m
i
Pi

FIGURA 15. Detección del RNA (A y C) y la CP (B y D) del CarMV por hibridación *in situ* e inmunocitoquímica respectivamente, en una sección longitudinal de un meristemo apical (A y B) y de un meristemo lateral (C y D) de una planta de clavel infectada. (A y B), secciones longitudinales seriadas del meristemo apical **(sam)** de una planta de clavel a 33 dpi. La señal se localizó sólo en el tejido floématico **(P)** de las hojas en desarrollo y en las zonas de intersección del téjido floemático de las hojas con el del tallo **(➔).** Las cabezas de flecha **(A)** señalan la colocalización del RNA y la CP. **(C y D)** secciones longitudinales seriadas del meristemo lateral **(m)** de una planta de clavel con infección natural. Este meristemo presenta una hoja en desarrollo (segundo par de hojas en desarrollo que rodea el meristemo) cuyo protofloema **(P)** está infectado y también junto al meristemo aparece una hoja verdadera que se continua con el tallo muy infectada con señal en la epidermis **(E),** en el mesófilo **(M)** y en el tejido floématico **(P)** que conecta con el del tallo. Las cabezas de flecha **(A)** señalan la colocalización del RNA y la CP. **(am),** yema axilar; **(Pi),** médula. Barra=100 µm.


A
P
sam
LP
am
PY
B
C
M
E
P
m
P
D

4. DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica de hibridación "tissue-printing" o impresiones de tejido nos proporcionó una imagen macroscópica de la acumulación del CarMV y una primera aproximación al patrón de invasión del virus en plantas de clavel. La posterior aplicación de las técnicas de inmunocitoquímica e hibridación in situ sobre muestras de clavel incluidas en parafina, nos permitieron conocer a nivel celular las rutas que el CarMV sigue en su invasión a las partes distales de la planta.

Como la mayoría de los virus el CarMV se mueve por el sistema vascular junto al flujo del fotoasimilado vía floema. El análisis de las impresiones de tejido puso de manifiesto que el mínimo tiempo requerido para que ocurriera una infección sistémica a partir de la inoculación en una única hoja de clavel es entre 5 y 7 dpi (Fig. 3A, IL 7 dpi). Este período es variable según el virus y el huésped. Así se ha descrito que en plantas de tabaco, el *Virus del enrollado de la hoja del cerezo* (CLRV) tarda 3 días en salir de la hoja inoculada (Más y Pallás, 1996), mientras que el *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) tarda 5 días en nabo (Leisner y col., 1992) y de 14 a 18 días en *Arabidopsis* (Leisner y col., 1993); y entre 2 y 4 dpi el *Geminivirus del mosaico enanizante de la judía* (BDMV) en *Phaseolus vulgaris* (Sudarshana y col., 1998).

El análisis inmunocitoquímico de secciones transversales de la hoja inoculada a 12 dpi puso de manifiesto una acumulación predominante del virus en el floema del haz central de mayor tamaño (Vena de orden I) (Fig. 4). Ello puede explicarse por tres situaciones distintas: i) el virus entró en la vena principal como resultado del proceso de inoculación; ii) el virus ha accedido a la vena principal mediante movimiento célula a célula a partir de las células de mesófilo infectadas y iii) el virus accede primero a venas menores y de éstas a la vena principal. Esta última posibilidad es menos probable dado que las hojas de clavel presentan una venación paralela y las conexiones entre las venas sólo se dan preferencialmente en el extremo de la hoja.

Nuestros resultados parecen sugerir que la vena principal puede ser directamente invadida por el CarMV desde células no vasculares y permitir una acumulación del virus dependiente del floema, aunque no se puede descartar la vía clásica de entrada a través de venas menores. Dichos resultados son consistentes con los recientemente obtenidos por Cheng y col. (2000) en el sistema *Virus del mosaico del tabaco* (TMV)-*N. benthamiana* quienes han demostrado por primera vez la equivalencia funcional de los distintos tipos de vena en una hoja fuente para la carga floemática. Otros estudios previos habían puesto de manifiesto que dicha carga floemática se producía esencialmente en las venas menores (ej: Leisner y col., 1992; Schaad y Carrington, 1996; Ding y col., 1998; Santa-Cruz y col., 1998; Wang y col., 1998).

Una vez que el CarMV sale de la hoja inoculada sigue simultáneamente dos direcciones en el tallo: una ascendente hacia el brote apical y otra descendente hacia la raíz (Fig. 5), que son los dos tejidos sumideros que más influyen en la translocación del flujo del fotoasimilado, tal y como se había descrito para el *Virus del estriado del maíz* (MSV) en maíz (Lucy y col., 1996). En el caso del BDMV en Phaseolus *vulgaris* y *Nicotiana benthamiana* se ha demostrado que el brote apical actúa como un sumidero más fuerte que la raíz, siendo ésta raramente infectada (Wang y col., 1996). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos que estudian la distribución de virus sistémicos por toda la planta, describen que una vez que el virus sale de la hoja inoculada junto al floema entra en el sistema vascular del tallo y se dirige hacia la raíz donde se acumula antes de invadir las hojas jóvenes superiores (Samuel, 1934; Leisner y col., 1992; Más y Pallás, 1996; Andrianifahanana y col., 1997). En el caso del CarMV la raíz presenta infección en estadíos muy tempranos (10 dpi) (Fig. 3A, R 10 dpi) pero se necesitan bastantes días post-inoculación (29 dpi) para que se acumule de manera significativa y antes de que eso ocurra las hojas sistémicas ya están muy infectadas (Fig. 3A, 2UL a 12, 14 y 17 dpi). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Covey y col., (1990) en el sistema CarMV/plantas de nabo en donde pusieron de manifiesto que la replicación del virus en las raíces cesa aparentemente antes que en las hojas. La señal en la raíz con crecimiento primario fue localizada en el tejido floématico, en células del

periciclo y en la endodermis (Fig. 11C) tal y como también se ha descrito para el MSV en maíz (Lucy y col., 1996).

En cuanto a la descarga del CarMV en hojas sistémicas si se observó que ésta era llevada a cabo por los haces laterales o secundarios (venas de orden II) (Fig. 6). Estos resultados son semejantes a los descritos en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el *Virus X de la patata* (PVX), donde se había demostrado que la descarga del virus ocurría a través de las venas de clase III (venas mayores) y no a través de las venas menores (clase IV y V) (Roberts y col., 1997). Puesto que la anatomía de la hoja de clavel es muy diferente a estas especies estudiadas, no se corresponden con el orden de la vena exactamente, pero se trata de una vena de orden intermedio en ambos casos.

Una respuesta general en la distribución del CarMV en tallo y hojas sistémicas en estadíos tempranos ha sido la asimetría mostrada en la infección. Así, se observó que en el tallo sólo aparecía la señal de infección en el lado de inserción de la hoja inoculada e igualmente ocurría con las hojas sistémicas en relación a su posición con respecto a la hoja inoculada. La influencia de la filotaxis entre la hoja inoculada y las hojas sistémicas en el movimiento del virus, había sido descrita anteriormente en varios estudios de virus sistémicos (Leisner y col., 1992; Leisner y Turgeon, 1993; Más y Pallás, 1996; Andrianifahanana y col., 1997).

En los últimos años se ha puesto claramente de manifiesto que el movimiento del fotoasimilado y del virus están dirigidos preferentemente desde una hoja o tejido maduro (fuente) hacia el tejido joven (sumidero) más cercano, que está creciendo activamente y al que está directamente conectado por el sistema vascular (Leisner y Turgeon, 1993). Por lo tanto, el estado de desarrollo de la planta condiciona la distribución final del CarMV. En la interacción CarMV/clavel hemos observado que las hojas que se localizan por debajo de la hoja inoculada y la hoja paralela a ésta, no son infectadas por el CarMV (Fig. 3A, -2 y –1UL y PL, 12, 14 y 17 dpi), ya que se trata de

hojas maduras que han dejado de ser sumidero para pasar a ser fuente. Estos resultados son consistentes con los previamente obtenidos en nuestro laboratorio con el sistema CLRV/tabaco, en el que se demostró que una hoja inoculada al 95% de su estado de desarrollo era capaz de acumular virus pero no de permitir un movimiento sistémico, mientras que una hoja al 100% de madurez no era capaz de permitir acumulación de virus (Más y Pallás, 1996). Ello no excluye que las hojas maduras no puedan ser infectadas por una vía distinta al floema tal como un movimiento célula a célula desde el tallo (Maule y col., 1989). Así, en estados muy avanzados de infección, como se muestra en la infección natural del CarMV en plantas de clavel (Fig. 9), el virus puede extenderse a toda la planta por un movimiento célula a célula inclusive a aquellos órganos que no son sumideros en ese momento, siempre que se den las conexiones simplásticas necesarias.

Los estudios inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* del meristemo apical pusieron claramente de manifiesto que en todos los casos analizados, tanto de infección natural como de plantas inoculadas, el meristemo apical aparecía libre de infección y por tanto el CarMV era incapaz de invadirlo (Figs. 12-15). Esta situación es bastante general y ha sido descrita en distintas combinaciones virus/huésped tales como la interacción TMV o BDMV en *N. benthamiana* (Wang y col., 1996; Cheng y col., 2000), MSV en Zea mays (Lucy y col., 1996), BDMV en *Phaseolus vulgaris* (Sudarshana y col., 1998) y el *Viroide del tubérculo fusiforme de la patata* (PSTVd) en *N. benthamiana* (Zhu y col., 2001). Sólo en el caso del TCV y utilizando plantas transgénicas que expresan su CP e inoculando dichas plantas con un clon infeccioso en el que la CP se reemplazó por la GFP, se observó la expresión de la proteína fluorescente en el meristemo (Cohen y col., 2000a) proponiéndose la acumulación del virus en el mismo. Estos resultados son completamente diferentes a los obtenidos por nosotros con el sistema CarMV/clavel. Aunque la distribución final de un virus puede variar en función del huésped al que infecta, creemos que nuestros resultados son más fiables dado que hemos utilizado una metodología más directa que la utilizada por Cohen y col. (2000a). En este último caso, se detecta la expresión de la GFP en tejido meristemático y se ha

demostrado recientemente que dicha proteína es capaz de moverse célula a célula mediante un transporte simplástico post-floemático e invadir tejidos sumideros (Imlau y col., 1999). Sólo en el caso de varios nepovirus en distintos huéspedes parece haberse argumentado con cierta consistencia la invasión del meristemo apical (Walkey y Webb, 1968). En estos casos se ha justificado en función a la tasa de movimiento célula a célula de estos virus, ya que probablemente es más rápida que el crecimiento del ápice lejos de la infección, debido a que estas infecciones virales son muy agresivas (Maule, 1999).

Una de las razones por las que se cree que el virus no puede llegar al meristemo apical es por la ausencia de vasculatura en éste, por lo que el virus no puede llegar vía floema. Al igual que se ha descrito para el MSV en maíz (Lucy y col., 1996) y el BDMV en *P. vulgaris* y *N. benthamiana* (Wang y col., 1996), el CarMV se acumula en el floema del brote apical (Figs. 12, 13A y B y 14A y B), pero dicha vasculatura está algo alejada del meristemo apical. Sin embargo, sí es capaz de infectar las hojas que se van formando alrededor del meristemo, en el momento que estas hojas desarrollan una vasculatura (protofloema) conectan con la vasculatura del tallo y el virus pasa a través de ella infectándolas (Fig. 14C y D). En el caso del MSV se había descrito que el virus penetraba en las hojas en desarrollo a partir del quinto plastócrono separado del meristemo (Lucy y col., 1996). Para el CarMV es probable que el virus penetre en las hojas en desarrollo a partir del segundo o tercer par de hojas separadas del meristemo.

En sólo una ocasión, en infección natural, hemos encontrado al CarMV invadiendo un grupo de células de la médula del brote apical que se encontraba cerca del meristemo apical (Fig. 14A y B). A pesar de ello el CarMV no fue capaz de llegar por movimiento célula a célula al meristemo. La mayoría de los autores argumentan que la alta tasa de división de las células de alrededor del meristemo impide que el virus pueda replicarse con eficiencia (Lucy y col., 1996; Cohen y col., 2000a; Dolenc y col., 2000); sin embargo, otros autores apoyan la idea de la existencia de algún factor

endógeno del ápice que evita la invasión viral del meristemo desde el protofloema (Sudarshana y col., 1998).

Nuestro estudio de la distribución espacio-temporal del CarMV en clavel nos da una idea bastante precisa de cómo ocurre la infección en estas plantas tanto en condiciones naturales como de inoculación. Las células y tejidos infectados han sido identificados, así como la influencia de la filotaxis en esta interacción CarMV-clavel y la distribución en tejidos sumideros, si bien aún quedan por investigar aspectos tales como la distribución en el meristemo de la raíz, así como la influencia de las condiciones de crecimiento de la planta en esta interacción.

Capítulo III

Influencia de las Condiciones de Crecimiento de Plantas de *Chenopodium quinoa* en las Rutas de Translocacion e Infección Sistémica del *Virus del moteado del clavel*.

1. INTRODUCCIÓN

La infección sistémica por parte de un virus (vegetal) depende tanto de su capacidad para replicarse en las células inicialmente infectadas, como de su movimiento a las células adyacentes a través de plasmodesmos (movimiento célula a célula) y de su movimiento a larga distancia a través del sistema vascular para alcanzar las partes distales de la planta (Lucas y Gilbertson, 1994; Carrington y col., 1996). Aunque se han realizado importantes avances durante los últimos diez años en el conocimiento de los mecanismos que utiliza el virus para invadir órganos y tejidos de la planta, los factores ambientales y del huésped que modulan estos procesos han sido menos estudiados. En la actualidad, numerosas evidencias sugieren que el virus utiliza una ruta de translocación endógena preexistente en la planta para invadirla sistémicamente (Lucas y Wolf, 1999). El movimiento viral a corta y a larga distancia está modulado por los mecanismos de regulación del desarrollo del huésped y los factores ambientales, tal y como ya ha sido demostrado en diferentes combinaciones virus-huésped (Hull, 1989; Leisner y col., 1993; Más y Pallás, 1996; Wang y col., 1996; Andrianifahanana y col., 1997; Ding y col., 1999). Las condiciones ambientales antes de la inoculación, en el momento de la inoculación y durante el curso de la infección tienen grandes efectos sobre el desarrollo de la infección (Matthews, 1991). La transmisión del virus, su replicación y su translocación dentro de la planta, así como la susceptibilidad del huésped y la sintomatología, están afectados por la luz, la temperatura y los aportes de agua, entre otros factores (Matthews, 1991).

La capacidad de movimiento de un virus determinado se considera un factor clave en la amplitud de la gama de huéspedes (Taliansky y col., 1982), mientras que su limitación suele ser el resultado de un mecanismo de resistencia común en un gran número de especies vegetales (Atabekov y Dorokhov, 1984). Las investigaciones más recientes se han centrado en los mecanismos utilizados por el virus para entrar y salir del sistema vascular (Cheng y col., 2000), así como en la identificación de los factores

virales y del huésped implicados en estos procesos (revisiónes de Gilbertson y Lucas, 1996 y Oparka y Santa Cruz, 2000). Además, otro punto de interés importante ha sido la identificación de dominios celulares en los que tales mecanismos parecen ser controlados (revisión de Nelson y van Bel, 1998). Los dominios identificados son los siguientes: células del mesófilo (MC)/células de la vaina (BS), BS/parénquima floemático (PP) y células acompañantes (CC)/ elementos conductores de la savia (SE). En este sentido, se ha demostrado que la interfase entre el floema y las células de la vaina constituye la frontera que restringe el movimiento sistémico del *Virus del moteado clorótico de la carilla* (CCMV) en variedades de soja resistentes (Goodrick y col., 1991), impide el movimiento sistémico del *Virus de la aspermia del tomate* (TAV) en plantas de pepino (Thompson y García-Arenal, 1998) y restringe el movimiento del *Virus del mosaico del pepino* (CMV) en plantas transgénicas de tabaco que presentaban una resistencia mediada por el gen de la replicasa 2a (Wintermantel y col., 1997). Además, se ha demostrado que las células acompañantes y las células del parénquima floemático de venas menores de hojas inoculadas maduras de *Nicotiana tabacum* constituyen la frontera celular que explica un descenso en la acumulación sistémica de la estirpe suave del *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) frente a la estirpe severa (U1) (X.S. Ding y col., 1995). Por el contrario, para el *Virus del grabado del tabaco* (TEV) (Shaad y Carrington, 1996) y el CMV (Dufour y col., 1989) se ha demostrado que la supresión del movimiento a larga distancia en huéspedes no susceptibles ocurre después de la entrada en floema.

El *Virus del moteado del clavel* (CarMV) es el miembro tipo del género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae* de virus de plantas. Es un virus icosaédrico de 30 nm de diámetro, que posee un genoma monopartito de RNA de simple cadena de sentido positivo de aproximadamente 4Kb. El análisis de su genoma revela la presencia de cinco marcos de lectura abierta (ORFs) ("open reading frames"). El ORF más cercano al extremo 5´ (p27) y su producto de lectura a través ("read through") (p86), se cree que son esenciales para la replicación del genoma, por homología con el *Carmovirus del arrugamiento del nabo* (TCV) (White y col., 1995). El

ORF más próximo al extremo 3´ codifica para la CP de 38-kDa (Morris y Carrington 1988; Russo y col., 1994). Los dos ORFs internos solapantes (p7 y p9) se supone, tal y como se ha demostrado para el TCV (Hacker y col., 1992; Li y col., 1998), que se requieren para el movimiento célula a célula. La p7 tiene la capacidad de unirse al RNA (Marcos y col., 1999) a través de un dominio básico (Vilar y col., 2001) que está altamente conservado entre aislados del CarMV de distinto origen geográfico (Cañizares y col., 2001).

La respuesta general de *Chenopodium quinoa* frente a la infección de muchos virus es la aparición de lesiones locales cloróticas en las hojas. Elegimos la combinación *Chenopodium quinoa*-CarMV como un modelo para investigar los factores ambientales y las barreras celulares o de tejidos que pueden mediar la infección viral sistémica. En este trabajo se demuestra que la invasión sistémica de *Chenopodium quinoa* por el CarMV es dependiente de las condiciones de crecimiento de las plantas. Así, en cámara de cultivo, el CarMV quedó limitado a la hoja inoculada, mientras que en las condiciones más extremas de un invernadero el virus invadió sistémicamente las plantas. En ambas condiciones de crecimiento, los niveles de acumulación del RNA viral y la proteína de movimiento (p7) fueron similares en las hojas inoculadas. Las posibles barreras celulares que podrían explicar este diferente comportamiento fueron analizadas por inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento e inoculación

Las semillas de *Chenopodium quinoa* fueron germinadas en una cámara de cultivo con un ciclo de luz de 16 h, temperaturas durante el día y la noche de 25ºC y 18ºC, una humedad relativa durante el día y la noche de 70% y 80%, respectivamente y con una irradiación de 210 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. El semillero fue transplantado a

macetas transcurrida una semana y se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta que las plantas alcanzaron el estadío de seis hojas. En este estadío las plantas fueron inoculadas con el aislado "Dixie" del *Virus del moteado del clavel* (CarMV-Dix) (Sánchez-Navarro y col., 1996; Cañizares y col., 2001). La obtención, propagación y purificación del aislado se realizó tal y como se describe en el apartado 2.1 del capítulo I. Las inoculaciones se realizaron con 20 µg/ml de virión purificado en tampón fosfato potásico 20 mM (pH 7.0) y utilizando carborundum como agente abrasivo para dañar la superficie de la hoja. Se inocularon dos hojas por planta, la tercera y cuarta hoja verdadera; tras la aplicación del inóculo, las hojas se lavaron suavemente con agua. Los controles de plantas sanas fueron inoculados de forma similar, pero sólo con la solución tampón. Después de la inoculación, las plantas se repartieron en dos grupos, uno de ellos se mantuvo en la cámara de cultivo en las condiciones descritas anteriormente y el otro grupo se transfirió a un invernadero, cuyas temperaturas durante el día y la noche fueron de 35-40ºC y 12-15ºC, respectivamente y una irradiación variable entre 300-600 µmol fotones $m^{-2}s^{-1}$.

2.2. Hibridación Dot-blot

Se tomaron muestras de hoja inoculada y su peciolo, de hoja sistémica y su peciolo y de tallo de plantas sanas e infectadas de *Chenopodium quinoa*, crecidas tanto en cámara cultivo como en invernadero, a 7 y 14 días post-inoculación (dpi). Estas muestras fueron procesadas para la obtención de sus ácidos nucleicos totales tal y como se describe en el apartado 2.3.1. del capítulo II. Los extractos de RNA obtenidos se desnaturalizaron calentando a 60ºC durante 15 min una mezcla compuesta por 5 µl del extracto, 3 µl del tampón 20x SSC y 2 µl de formaldehído (White y Bancroft, 1982) y se aplicaron 5 µl de tres diluciones (1/5) seriadas sobre una membrana de nylon cagada positivamente (Boehringer Mannheim), que se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 min para después fijar los RNAs mediante tratamiento con luz ultravioleta durante 3 min utilizando un transiluminador (Vilber Lourmat). Posteriormente esta membrana se hibridó con una sonda de RNA marcada con

digoxigenina correspondiente al extremo 3´del RNA genómico del CarMV (clon pCarM Ec3, Marcos y col., 1999), cuya síntesis se describe en el apartado 2.4.2. del capítulo I. La hibridación molecular de la membrana, su detección inmunológica y su revelado quimioluminiscente se realizó tal y como se describe en Pallás y col. (1998) y en el apartado 2.4.3 del capítulo I.

2.3. Análisis tipo Western de proteínas.

Las mismas muestras tomadas para la hibridación dot-blot fueron utilizadas para el análisis tipo western, con excepción de los peciolos. Estas muestras se analizaron por SDS-PAGE y "Western blotting" tal y como se describe en el apartado 2.3 del capítulo I. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo de la p7 del CarMV (Marcos y col., 1999). En cuanto a los controles para comprobar la especificidad de este anticuerpo, se utilizó la proteína p7 purificada (Marcos y col., 1999) como control positivo y como control negativo se utilizaron extractos de proteínas totales de planta sana.

2.4. Inmunocitoquímica

Se tomaron muestras de hoja, peciolo y tallo de plantas sanas e infectadas de *Chenopodium quinoa*, crecidas tanto en cámara cultivo como en invernadero a diferentes días post-inoculación (dpi), para ser fijadas e incluidas en parafina tal y como se describe en el apartado 2.5.1 del capítulo I. Se obtuvieron secciones de 8-10 µm de los bloques de parafina con un microtomo rotatorio Reichert-Jung 2030, que fueron adheridas a portaobjetos, previamente recubiertos con un adhesivo (TESPA, 3-amino-propil-trietoxi-silano) (Sigma), por calentamiento a 40ºC sobre una placa calefactora. Estas secciones fueron procesadas e incubadas con el anticuerpo contra viriones del CarMV (amablemente proporcionado por los Drs J.A. Daròs y R. Flores, IBMCP, Valencia) tal y como se describe en el apartado 2.4 del capítulo II. Para comprobar la especificidad de la reacción inmunocitoquímica se llevaron a cabo

controles con muestras de planta sana y muestras infectadas que no eran incubadas con el anticuerpo primario o secundario. La reacción inmunocitoquímica resultante fue examinada y fotografiada en un microscopio óptico DMRB LEITZ (Leica microsistemas S.A., Barcelona). La película fotográfica utilizada fue de 100 asa de la marca Kodak.

2.5. Hibridación *in situ*

Las mismas muestras utilizadas para la inmunocitoquímica fueron utilizadas para la hibridación *in situ* mediante secciones seriadas adheridas a portaobjetos. Estas secciones fueron pretratadas antes de la hibridación e hibridadas tal y como se describe en el apartado 2.5.2 del capítulo I. Se utilizó como sonda el RNA marcado con digoxigenina correspondiente al extremo 3´del RNA genómico del CarMV (clon pCarM Ec3, Marcos y col., 1999), cuya síntesis se describe en el apartado 2.3.2. del capítulo II. Se realizaron varios controles para comprobar la especificidad de la sonda, con muestras de planta sana y muestras infectadas que no eran incubadas con la sonda. La reacción resultante fue examinada y fotografiada en un microscopio óptico DMRB LEITZ (Leica microsistemas S.A., Barcelona, España). La película fotográfica utilizada fue de 100 asa de la marca Kodak.

2.6. Estudio al Microscopio Electrónico

La identificación de los tipos celulares que aparecían en las venas principales y secundarias de las hojas infectadas de *Chenopodium quinoa* fue realizada mediante un estudio al microscopio electrónico. Así, se tomaron muestras de hoja, que contenían estas venas y se fijaron con el mismo fijador (karnovsky, 1965) descrito en el apartado 2.5.1 del capítulo I, formado por una mezcla de p-formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2) durante 4 horas a 4ºC, al igual que se ha descrito para las muestras incluidas en parafina. A continuación, los restos de fijador se eliminaron realizando 3 lavados de 15 min cada uno en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2. Posteriormente, las muestras fueron postfijadas en tetróxido de osmio al 1% en el

mismo tampón fosfato durante 3h a 4ºC y se repitieron los lavados anteriores, manteniéndose las muestras en el tampón fosfato 0.1 M pH 7.2 a 4ºC hasta su inclusión en resina. Para la inclusión, las muestras se deshidrataron en una serie progresiva de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) y la inclusión se realizó añadiendo secuencialmente, óxido de propileno, dos cambios de 30 min cada uno, óxido de propileno-Spurr (1:1) durante al menos 1h y finalmente Spurr durante 24 h. Las cápsulas se solidificaron a 70ºC durante un mínimo de 16h (Spurr, 1969). Para seleccionar las muestras al microscopio óptico (DMRB LEITZ, Leica microsistemas S.A., Barcelona) se realizaron cortes semifinos (1-2µm) en un microtomo *Reichert ultracut 3* (Leica microsistemas S.A., Barcelona), que fueron teñidos con azul de toluidina durante 2 min. Para la visualización al microscopio electrónico (Philips Tecnai) se realizaron cortes ultrafinos que fueron montados en rejillas de cobre que se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (30 min) y citrato de plomo (3 min). El estudio al microscopio electrónico se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia (SACE).

3. RESULTADOS

3.1. Niveles de acumulación del RNA y de la proteína de movimiento (p7) del CarMV.

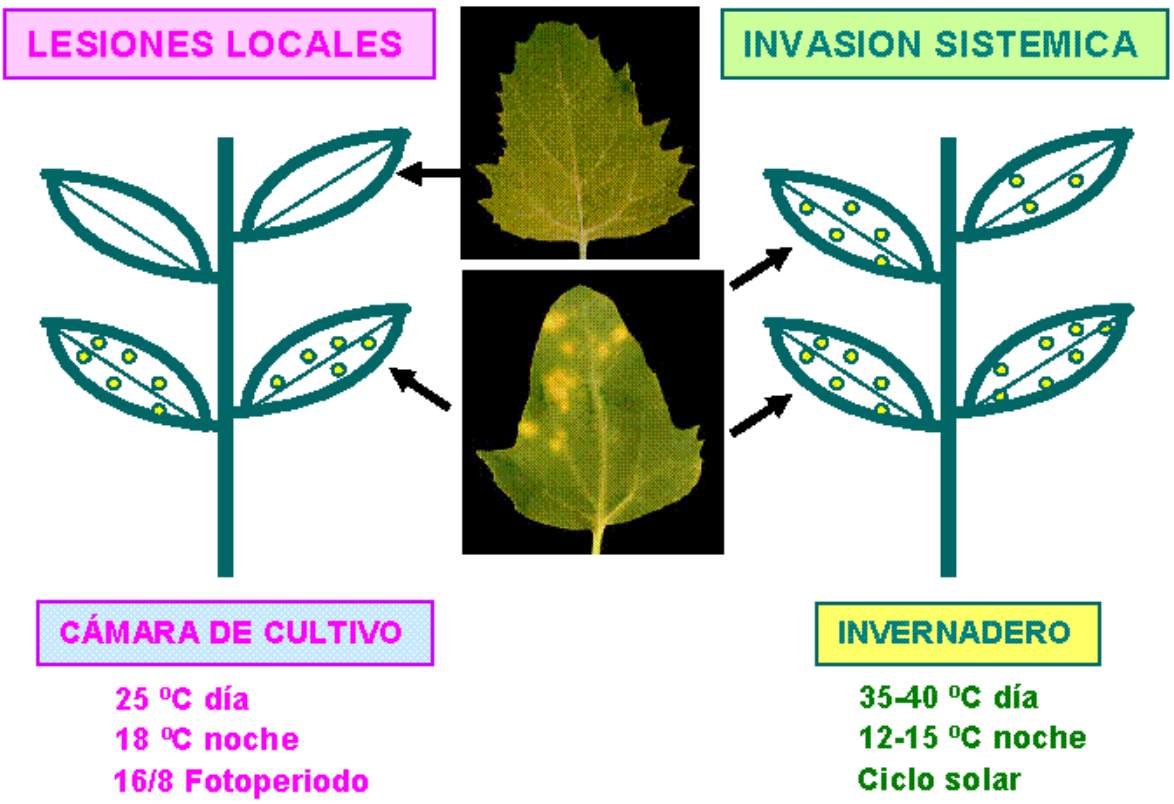


FIGURA 1. Esquema de las condiciones de crecimiento y tipo de respuesta de las plantas de *C. quinoa* inoculadas con CarMV.

Observaciones visuales previas mostraron que el desarrollo de la infección y manifestación de los síntomas de las plantas de *C. quinoa* inoculadas con el CarMV eran dependientes de las condiciones de crecimiento, como ha sido descrito en otras interacciones virus-huésped (Matthews, 1991). En las condiciones de cámara de cultivo (Fig. 1), las plantas de *C. quinoa* infectadas con el CarMV mostraron lesiones cloróticas sólo en las hojas inoculadas, mientras que las plantas crecidas en el invernadero, con temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche, mostraron una infección

sistémica apareciendo las lesiones cloróticas en las hojas inoculadas y en las hojas sistémicas.

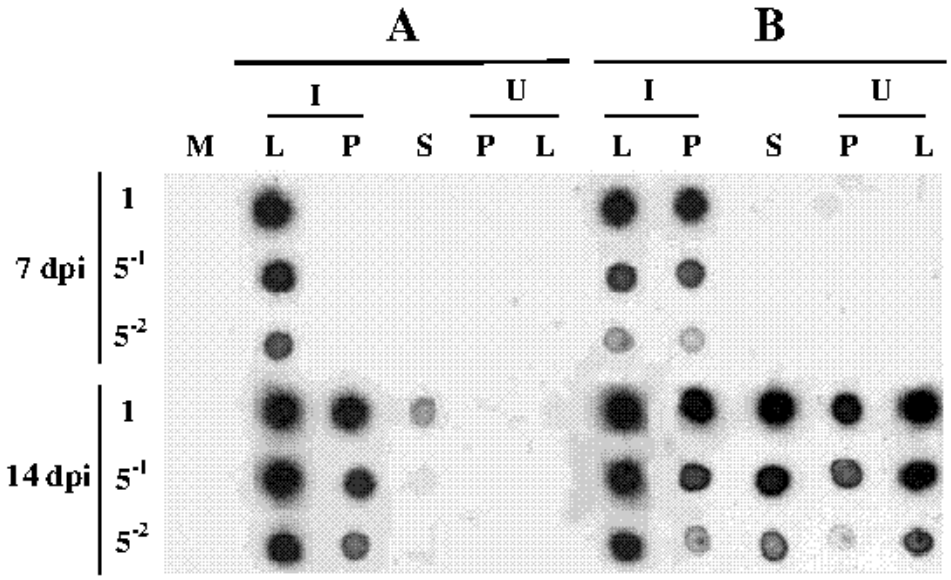


FIGURA 2. Análisis comparado de los niveles de acumulación de RNA del CarMV en plantas de *Chenopodium quinoa* crecidas en condiciones de cámara de cultivo (A) y en invernadero (B) a 7 y 14 dpi mediante hibridación tipo Dot-blot. Diluciones seriadas 1/5 de extractos de ácidos nucleicos totales se aplicaron sobre una membrana de nylon que fue hibridada con una sonda de RNA marcada con digoxigenina correspondiente al extremo 3´ del RNA genómico del CarMV (clon pCarM Ec3). La membrana se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente CSPD y la película fue expuesta durante 10 min. **M**, hoja inoculada con tampón. **I**, hoja inoculada. **S**, tallo. **U**, hoja no inoculada. **L**, hoja. **P**, peciolo.

Los experimentos de hibridación dot-blot (Fig. 2) confirmaron estas observaciones preliminares y demostraron que a 7 dpi el RNA viral sólo se detectaba en las hojas inoculadas de plantas de *Chenopodium* crecidas en cámara de cultivo (Fig. 2A, IL). En estados muy tardíos de la infección (14 dpi) el virus fue detectado

también en los peciolos de las hojas inoculadas (Fig. 2A, IP), y de forma excepcional con una señal muy débil en el tallo (Fig. 2A, S). Esta débil señal mostrada en el tallo en estados muy avanzados de la infección podría ser debida a un movimiento célula a célula más que a un transporte vascular. Además, en estas condiciones de crecimiento el virus no se detectó nunca en otras partes no inoculadas de la planta (Fig. 2A, U). Por otro lado, en las plantas crecidas en invernadero (Fig. 2B), el CarMV se detectó no sólo en las hojas inoculadas sino también en sus peciolos (Fig. 2B, IL, IP) desde estadíos tempranos de la infección (7dpi). En estadíos más avanzados de la infección (14 dpi), el virus se detectó en el resto de la planta (tallo, hojas y peciolos sistémicos) (Fig. 2B, S, UP, UL) Los resultados de los experimentos de hibridación dot-blot mostraron que la señal de infección fue muy similar en las hojas inoculadas de plantas crecidas en ambas condiciones de crecimiento (Fig. 2, IL), sugiriendo niveles similares de replicación y/o acumulación viral y de movimiento célula a célula.

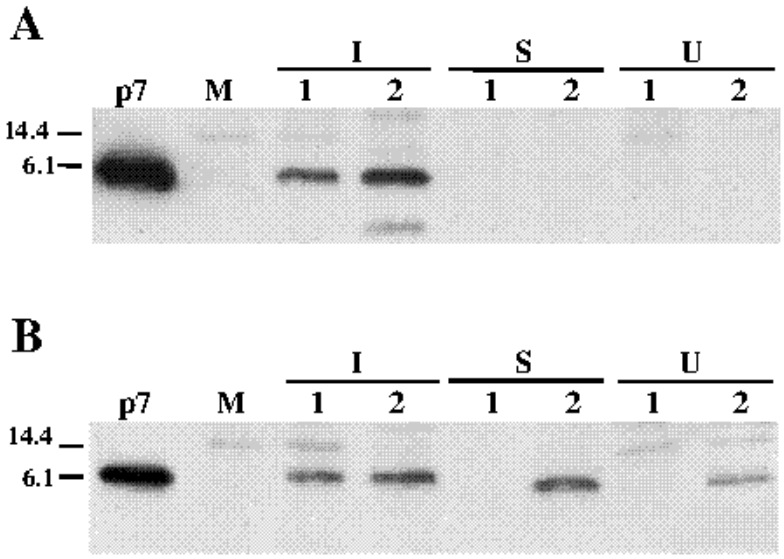


FIGURA 3. Detección de la proteína de movimiento (p7) del CarMV por análisis western-blot en diferentes tejidos de plantas de *C. quinoa* crecidas en condiciones de cámara de cultivo (A) y en invernadero (B) a 7 y 14 dpi. Extractos de proteínas totales fueron separados mediante SDS-PAGE al 18%, electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa y la proteína p7 fue inmunodetectada con un anticuerpo contra la p7 del CarMV. **M**, hoja inoculada con tampón. **I**, hoja inoculada. **S**, tallo. **U**, hoja no inoculada. **1**, 7dpi. **2**, 14 dpi.

En algunas interacciones virus-huésped, se ha demostrado que las proteínas de movimiento (MPs) juegan un papel importante en el movimiento a larga distancia (ver Carrington y col., 1996, para una revisión). En este sentido se ha puesto de manifiesto que diferencias en los niveles de acumulación de la MP pueden influir significativamente en la invasión viral sistémica (Gal-on y col., 1996; Moreno y col., 1997). Los análisis por western blotting (Fig. 3) demostraron que a 7 y 14 dpi la p7 del CarMV estaba presente sólo en las hojas inoculadas de plantas crecidas en cámara de cultivo (Fig. 3A, I). Sin embargo, a 14 dpi en las plantas crecidas en invernadero, la p7 fue detectada además en el tallo y en las hojas sistémicas (Fig. 3B, I, S, U). Las cantidades similares de p7 observadas en hojas inoculadas sugieren un nivel similar de movimiento célula a célula en ambas condiciones de crecimiento. Además, se observó que el tamaño de las lesiones cloróticas en hojas inoculadas en ambas condiciones de crecimiento eran similares (datos no mostrados).

3.2. Localización de la proteína de cubierta y el RNA viral en hojas inoculadas.

La infección de plantas de *C. quinoa* con el CarMV provocó la formación de lesiones cloróticas en las hojas inoculadas en ambas condiciones de crecimiento. Cuando se procesaron para su estudio al microscopio óptico secciones de las hojas inoculadas que contenían dos lesiones cloróticas contiguas, se observó que tanto el RNA como la CP del CarMV fueron localizados en áreas de la sección de la hoja que se correspondían con las lesiones cloróticas, dejando una área desprovista de ambos componentes entre ellas (Fig. 4B, C,). Dentro de las áreas de las lesiones todos los tipos celulares de la hoja (epidermis del haz y del envés, parénquima en empalizada, mesófilo lagunar y haces vasculares) aparecían infectados (Fig. 4D, E) pero de forma heterogénea, mostrando esporádicamente pequeños grupos de células sin infección inmersos en la lesión, tanto de la epidermis como del parénquima en empalizada o mésofilo lagunar, e incluso haces vasculares, cuyo significado se desconoce (Fig. 4D, E). Los estudios de secciones seriadas consecutivas de una lesión de la hoja mostraron

que el RNA del CarMV y la CP colocalizaban en todos los tipos celulares infectados (Fig. 4F, G, H e I). Las áreas mostradas en la Fig. 4F y H corresponden al borde de una lesión clorótica, donde sólo aparece homogéneamente infectada la epidermis del haz, mientras que la señal fue limitada a unas pocas células del parénquima en empalizada, mesófilo lagunar y de la epidermis del envés. Por tanto, las células de la epidermis del haz presentaron una mayor permeabilidad para el movimiento del virus. Dicha colocalización también fue observada a nivel de venas mayores de la hoja inoculada (Fig 4G e I) incluso cuando éstas se encontraban fuera de una lesión clorótica.

Con el fin de identificar diferencias en la carga floemática o posibles barreras celulares que permitieran explicar por qué las plantas crecidas en condiciones de cámara de cultivo no desarrollaban una infección sistémica, se realizó un estudio comparativo de la infección de las venas mayores de hoja inoculada de *C. quinoa* en ambas condiciones de crecimiento. El estudio inmunocitoquímico al microscopio óptico de las venas mayores demostró que no existían diferencias, en las dos condiciones de crecimiento, con respecto a la distribución de la CP en los distintos tipos celulares (Fig. 5B-D). Se observó una extensa acumulación del virus tanto en las células de alrededor del haz vascular (epidermis y parénquima), como en las células floemáticas y de la vaína del haz vascular (Fig. 5B-D). En la mayoría de las secciones transversales de venas mayores examinadas, las células del mesófilo que aparecen en estas venas rodeando los haces vasculares a modo de sostén, aparecían siempre infectadas (Fig. 5B-D), sobre todo aquellas que se colocan formando una especie de casquete sobre el haz vascular, incluso cuando estas venas se encontraban fuera del área de la lesión clorótica (Fig. 5A y B). En cuanto a las células floemáticas infectadas, dada la dificultad de identificar al microscopio óptico (MO) los distintos tipos celulares del floema, se realizó un estudio ultraestructural de las venas mayores al microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Fig. 6B y C) y se compararon micrografías del TEM con micrografías del MO (Fig. 6), de manera que se pudieron identificar las células del parénquima floemático (PP) por su tamaño y posición y cómo alrededor de éstas se localizaban células más pequeñas que correspondían a las células acompañantes (CC) y

a los elementos conductores de la savia (SE) (Fig. 6B y C) (ver características de ambos tipos celulares en el apartado 1.4.2 de la introducción general). Así, se identificaron en venas mayores de hoja inoculada de plantas crecidas en cámara de cultivo, células del parénquima floemático que presentaban señal y grupos de células más pequeñas alrededor que aparecían como una masa homogénea azul cuando presentaban señal que, por comparación con las imágenes al TEM, corresponden a células acompañantes y elementos conductores de la savia (Fig. 6). Por tanto el CarMV fue capaz de acceder al sistema vascular incluso en aquellas plantas crecidas en cámara de cultivo donde el movimiento a larga distancia estaba impedido.

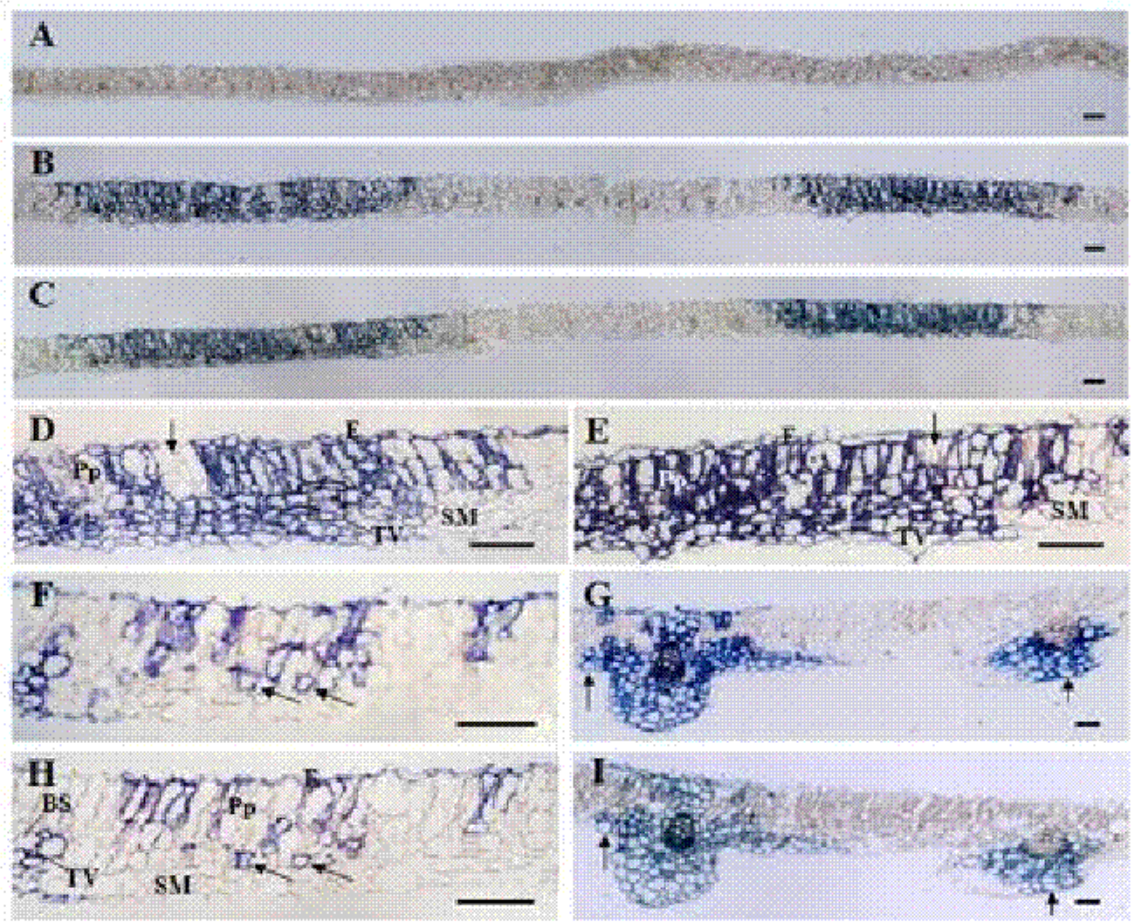


FIGURA 4. Detección y localización del RNA y la CP del CarMV por hibridación *in situ* (A, B, E, F y G) e inmunocitoquímica (C, D, H e I) en hojas inoculadas de plantas de *C. quinoa* crecidas en condiciones de cámara de cultivo. Las zonas infectadas aparecen de color azul. **(A)** corresponde a una sección transversal de una hoja inoculada con tampón. **(B y C)** son secciones transversales de una hoja inoculada conteniendo dos lesiones cloróticas contiguas. **(D y E)** son detalles a mayor aumento de las lesiones cloróticas anteriores. Las flechas indican zonas libres de infección inmersas en la lesión. **(F y H)** son secciones seriadas del borde de una lesión clorótica. Las flechas enfatizan la colocalización del RNA y la CP. **(G e I)** son secciones seriadas de venas mayores que se localizan fuera de una lesión clorótica y se señala de nuevo la colocalización del RNA y la CP. **(E)**, epidermis; **(Pp)**, parénquima en empalizada; **(SM)**, mesófilo lagunar; **(BS)**, células de la vaina; **(TV)**, secciones transversales de venas menores. Barra =100µm.

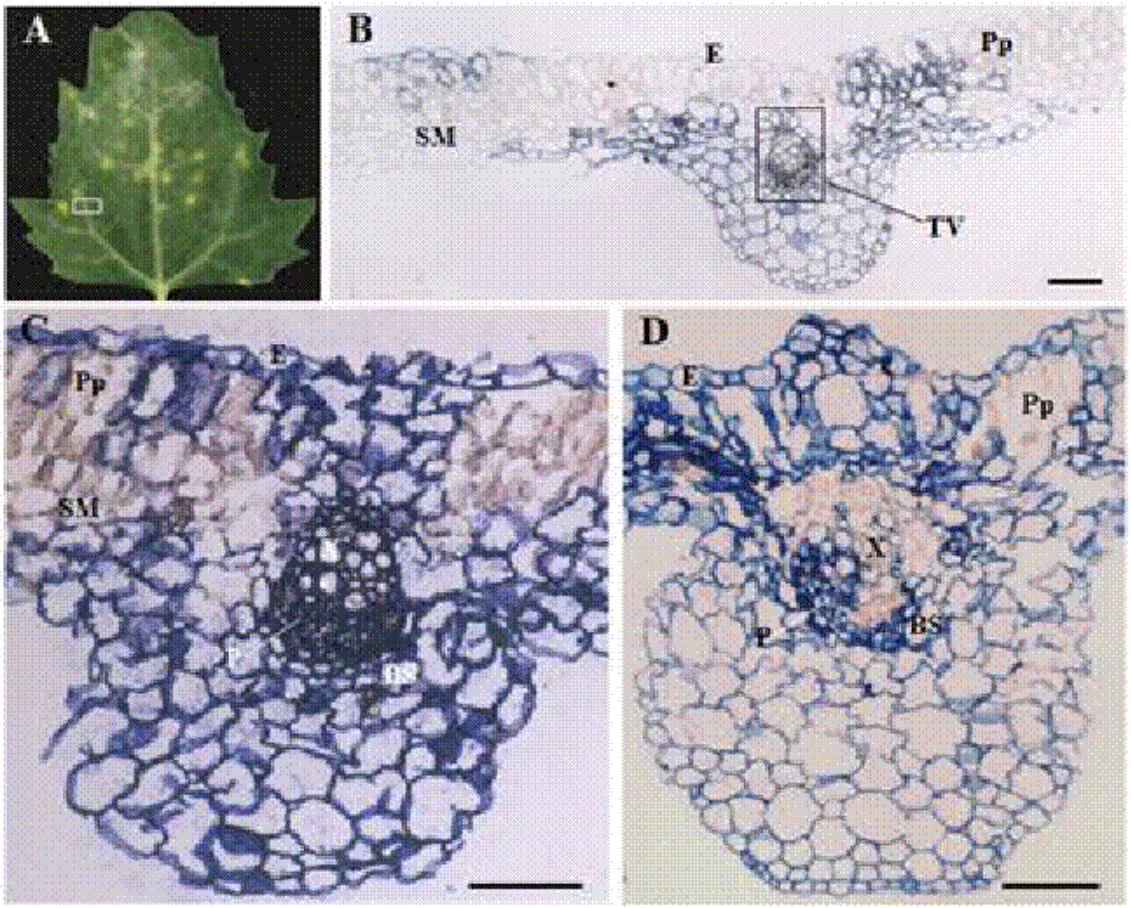


FIGURA 5. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de venas mayores de hoja inoculada de *C. quinoa*. (A), hoja inoculada de C. quinoa infectada con CarMV crecida en condiciones de cámara de cultivo, que muestra las lesiones cloróticas típicas. **(B),** sección transversal de la vena mayor señalada en el recuadro de **(A),** cercana a una lesión clorótica (aún aparece el borde de la lesión clorótica en la parte izquierda superior de la figura) pero no inmersa en ella. **(C),** sección transversal de una vena mayor inmersa en una lesión clorótica de hoja inoculada de plantas crecidas en cámara de cultivo. Obsérvese cómo las células del floema del haz vascular **(P)** y las células del parénquima de alrededor mostraron señal. **(D),** sección transversal de una vena mayor de hoja inoculada de plantas sistémicas crecidas en invernadero, mostrando una distribución de la infección similar a las venas mostradas en B y C. **(E),** epidermis; **(Pp),** parénquima en empalizada; **(SM),** mesófilo lagunar; **(BS),** células de la vaina; **(X),** elementos conductores del xilema; **(TV),** sección transversal del haz vascular de una vena mayor. Barra=100 µm.

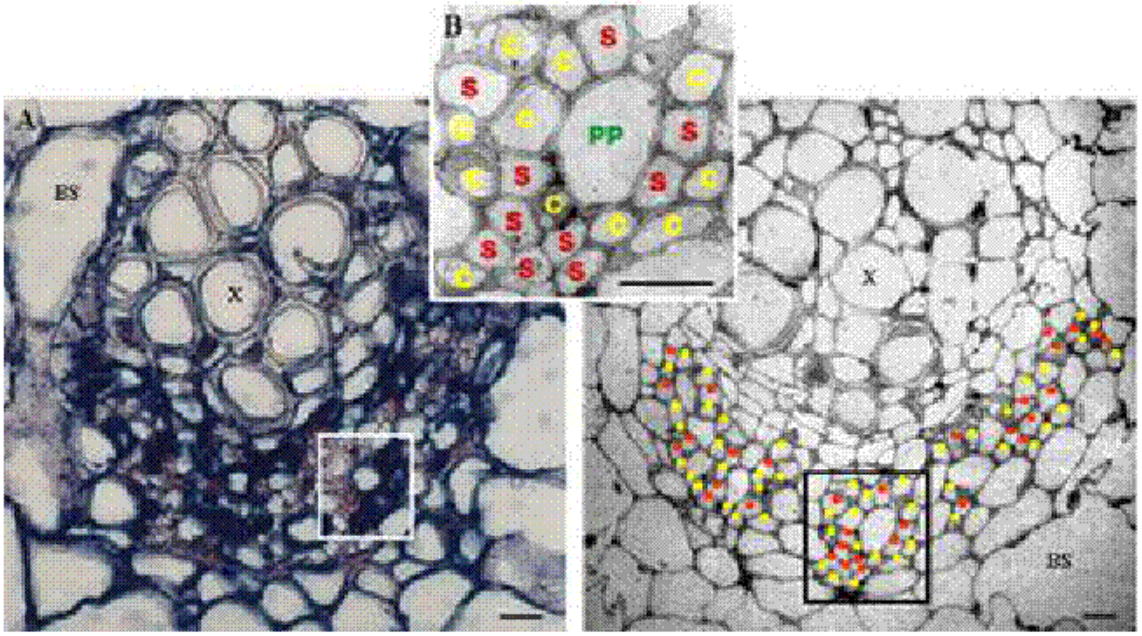


FIGURA 6. Identificación de las diferentes células floemáticas en secciones transversales al MO (A) de venas mayores de hoja inoculada de plantas crecidas en condiciones de cámara de cultivo por su comparación con micrografías al TEM (B y C). (A), detalle del haz vascular de la vena mayor de la figura **5B.** Obsérvense en el recuadro una célula del parénquima floemático **(PP)** infectada y grupos de células más pequeñas alrededor que aparecen no infectados en la parte izquierda del recuadro, mientras en la parte derecha del mismo sí aparecen infectados, cuyos límites celulares son imposibles de determinar a este nivel de resolución ya que la infección aparece como una masa homogénea azul. Por tamaño y disposición corresponden posiblemente a células acompañantes **(CC)** y elementos conductores **(SE). (C),** micrografía al TEM de una sección transversal de una vena mayor, donde se han señalado dos tipos celulares del tejido floemático. **(·=SE y ·=CC). (B),** detalle a mayor aumento del recuadro de la micrografía **(C)** donde se distinguen perfectamente las CCs **(C)** y SEs **(S)** rodeando a una célula del parénquima floemático **(PP). (BS),** células de la vaina. Barra=10 **µm.**

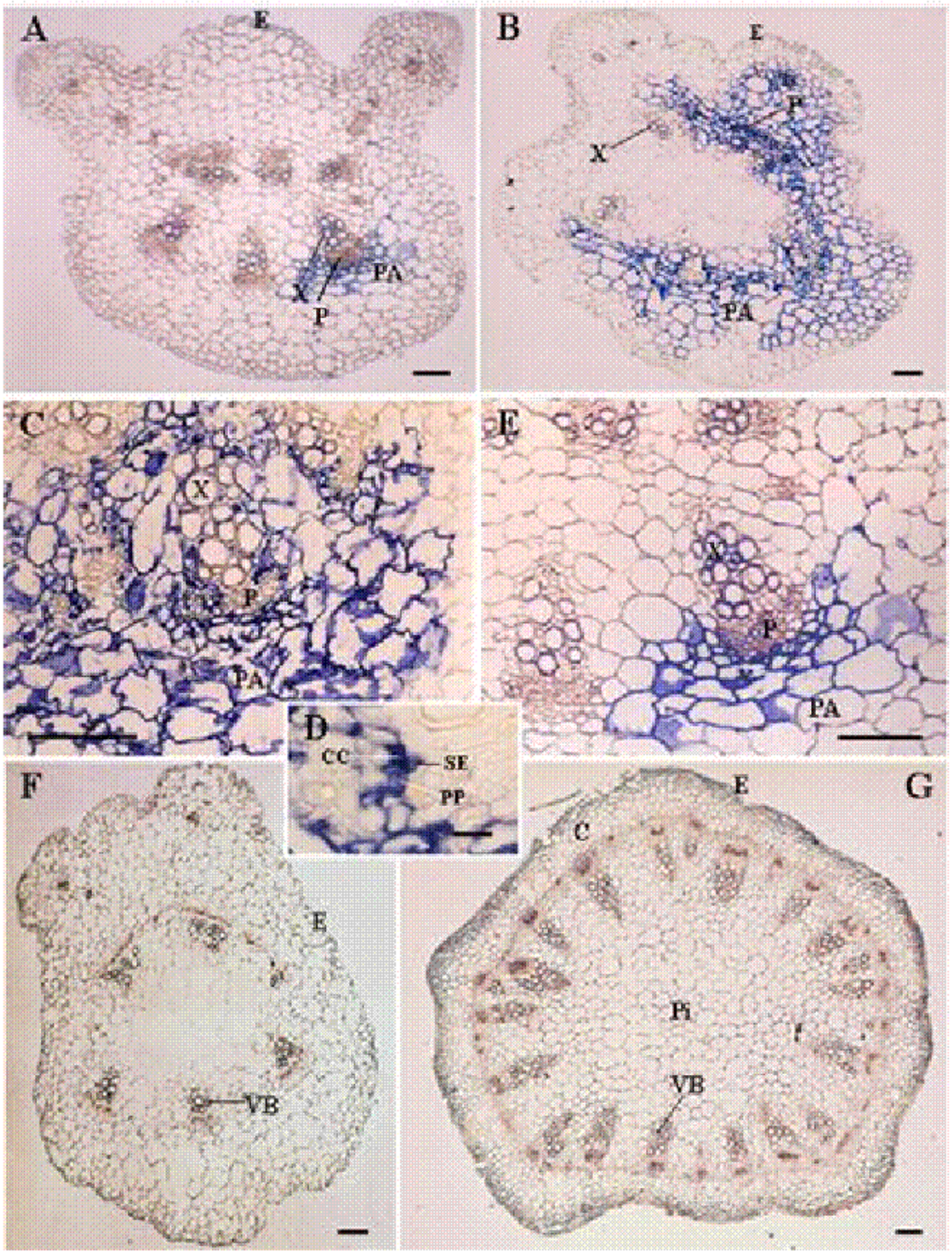
3.3. El transporte vascular del CarMV está impedido a regímenes de temperaturas bajas.

Ya que no se han encontrado diferencias en la invasión de los distintos tipos celulares y tejidos de las hojas inoculadas en ambas condiciones de crecimiento, los siguientes experimentos se centraron en el estudio de la salida del virus de la hoja inoculada mediante el análisis de la acumulación del virus en el peciolo. En los estudios de acumulación del RNA viral a partir de extractos de RNA totales había sido ya observada una respuesta temporal diferente en los peciolos de hojas inoculadas en ambas condiciones de crecimiento (Fig. 2). Los estudios al microscopio óptico del peciolo de hojas inoculadas de plantas crecidas en condiciones de cámara de cultivo en estados avanzados de la infección (11 dpi), demostraron que la infección aparecía en el tejido floemático y parénquima de alrededor pero sólo en uno o dos haces vasculares (Fig. 7A). Sin embargo, los peciolos de hojas inoculadas de plantas de invernadero mostraron una infección más extendida afectando a la mayoría de sus haces vasculares, infectando el floema, así como al parénquima de alrededor (Fig. 7B). En el primer caso, el análisis de secciones consecutivas seriadas del peciolo hacia el tallo de estas mismas plantas, demostraron que la señal de la infección iba gradualmente decreciendo hasta su total desaparición en el tallo (Fig. 7C-G). En la Fig. 7C, que se corresponde con una zona del peciolo cercana a la hoja, se observa cómo la infección afecta a varios haces vasculares y el tejido floemático está infectado heterogéneamente. A mayor detalle (Fig. 7D), se puede observar claramente una célula del parénquima floemático (PP) infectada y alrededor unas células más pequeñas teñidas que presumiblemente se corresponden con células acompañantes (CC) y SEs. En una sección del peciolo consecutiva más alejada de la hoja (Fig. 7E) se observó que la señal en el haz central permanecía, mientras que la de los haces de alrededor había desaparecido. Además, el haz central presentaba el floema libre de infección, quedando la infección limitada a las células del parénquima de alrededor, desapareciendo totalmente cuando la sección corresponde a una zona muy cercana al tallo (Fig. 7F). Los resultados anteriormente descritos indican una clara diferencia en

las pautas de acumulación del virus en el peciolo en las dos condiciones de crecimiento. De manera consistente con estas observaciones, el tallo de plantas crecidas en cámara de cultivo no mostró infección viral (Fig. 7G), mientras que el tallo de plantas crecidas en condiciones de invernadero mostró infección en la mayoría de los tejidos (epidermis, corteza, floema y médula) (Fig. 8A).

El análisis del peciolo de hojas sistémicas de plantas crecidas en invernadero, mostró una infección general de los haces vasculares y el parénquima de alrededor de éstos (Fig. 8B), apareciendo el floema infectado de manera similar al peciolo de la hoja inoculada de estas plantas (Fig. 7B). En cuanto a las hojas sistémicas de estas plantas, el estudio de sus venas mayores (Fig. 8C) demostró una distribución del virus semejante al de las hojas inoculadas (Fig. 5), apareciendo infectados tanto el floema como el resto de los tejidos de la hoja (epidermis, parénquima en empalizada y mesófilo lagunar) (Fig. 8C).

FIGURA 7. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de peciolo de hoja inoculada (A-F) de plantas de *C.quinoa* crecidas en ambas condiciones de crecimiento y de tallo (G) de plantas crecidas en cámara de cultivo. (A) sección transversal del peciolo de hoja inoculada de plantas crecidas en condiciones de cámara de cultivo. Obsérvese la infección localizada alrededor de un sólo haz vascular. **(B)**, sección transversal del peciolo de hoja inoculada de plantas crecidas en condiciones de invernadero, donde se observa una infección más generalizada que en **(A). (C)**, sección transversal seriada del mismo peciolo mostrado en **(A)** pero más próximo a la hoja, donde se observa cómo la infección inicialmente afectaba a más haces. **(D)**, detalle del tejido floemático **(P)** del haz central del peciolo anterior, donde se observa una célula del parénquima floemático **(PP)** infectada y alrededor grupos de células más pequeñas infectadas que supuestamente son células acompañantes **(CC)** y elementos conductores de la savia **(SE). (E)**, detalle a mayor aumento del peciolo mostrado en **(A)**, se trata de una sección del peciolo más separada de la hoja inoculada que la mostrada en **(C)**, donde se observa cómo la señal ha disminuido quedando limitada a unas pocas células del parénquima de alrededor del haz central **(PA)** y cuya señal en el tejido floemático **(P)** ha desaparecido. **(F)**, sección transversal seriada del mismo peciolo mostrado en **(A)** y **(C)** pero más cercana al tallo. Obsérvese que la infección ha desaparecido por completo. **(G)**, sección transversal del tallo de plantas crecidas en condiciones de cámara de cultivo que se observa totalmente libre de señal. **(X)**, elementos conductores del xilema; **(C)**, corteza; **(Pi)**, médula; **(VB)**, haces vasculares. Barra=100 µm. En **(D)** barra=10 µm.


A
E
X
P
PA
B
E
P
X
PA
C
X
P
PA
D
CC
SE
PP
E
X
P
PA
F
E
VB
G
E
C
Pi
VB

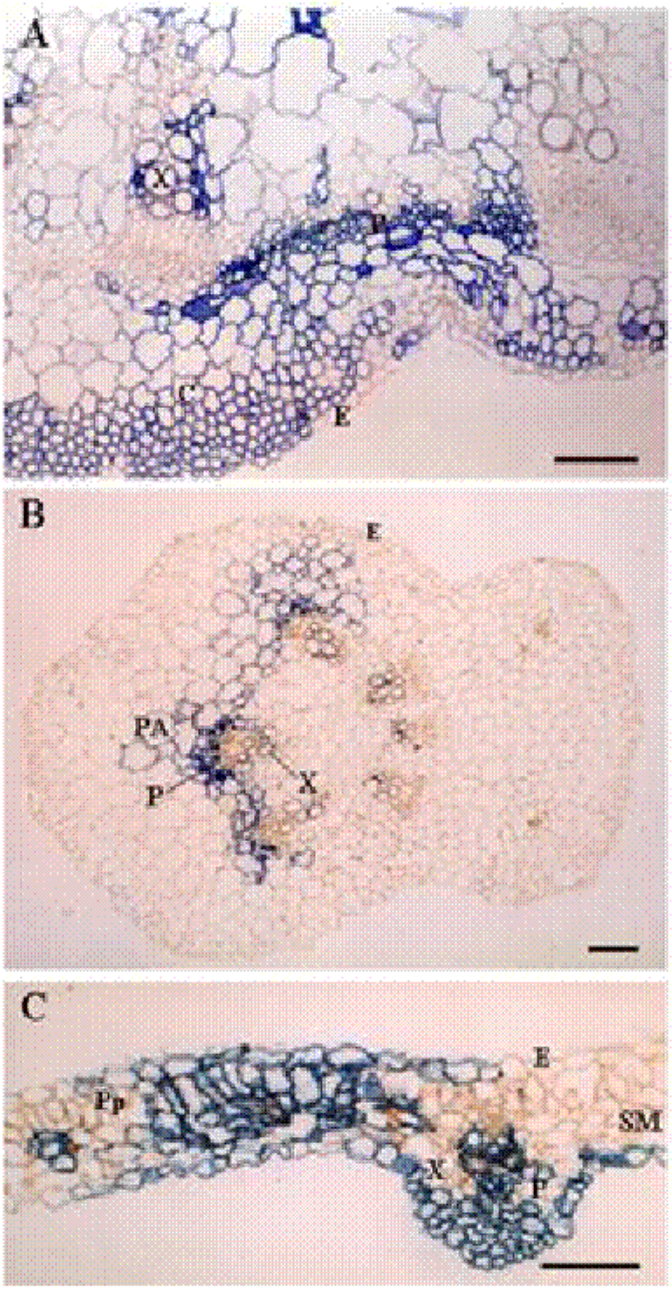


FIGURA 8. Detección inmunocitoquímica de la CP del CarMV en secciones transversales de tallo (A), peciolo (B) y hoja sistémica (C) de plantas de *C.quinoa* crecidas en condiciones de invernadero. (A), obsérvese la infección en todos los tejidos del tallo. **(B),** en el peciolo sistémico se observa que la infección afecta a varios haces vasculares, presentando infección sólo las células floemáticas **(P)** cercanas a las células del parénquima **(PA)** que rodean estos haces vasculares que también están infectadas. **(C),** la hoja sistémica muestra unas pautas de infección similares a las hojas inoculadas **(Fig. 5B-D). (E),** epidermis; **(Pp),** parénquima en empalizada; **(SM),** mesófilo lagunar; **(X),** elementos conductores del xilema; **(C)** corteza. Barra=100 µm.

4. DISCUSIÓN

Chenopodium quinoa ha sido considerada como un huésped de lesiones locales para una gran variedad de virus, incluyendo el CarMV, cuando las plantas son crecidas en unas condiciones estándar de cámara de cultivo (temperaturas de 25ºC día y 18ºC noche). En este trabajo se demuestra que este huésped local indicador puede ser infectado sistémicamente por el CarMV, cuando las plantas son crecidas en condiciones más extremas en invernadero (35-40ºC día/10-15ºC noche). Hemos abordado, por tanto, la cuestión de si este comportamiento diferente es debido a diferencias en los niveles de acumulación del RNA viral o la CP, o bien a la existencia de barreras celulares potenciales que podrían restringir la invasión sistémica en plantas de *C. quinoa*.

Los resultados del análisis dot-blot demostraron que la acumulación del virus a los mismos días post-inoculación en hojas inoculadas de plantas crecidas en ambas condiciones de crecimiento era similar (Fig. 2), sugiriendo así un nivel similar de replicación y/o acumulación del virus. Se evaluó entonces la posible implicación de las proteínas de movimiento (MPs) en las diferencias observadas. Se ha descrito recientemente que además de su importante papel en el movimiento a corta distancia (Citovsky 1993; Deom y col. 1992; Hull 1989; Lucas y Gilbertson 1994; Maule 1991), las MPs también intervienen en el movimiento a larga distancia en algunas interacciones virus-huésped (Giesman-Cookmeyer y Lommel 1993; Lehto y Dawson 1990; Arce-Johnson y col. 1997). Los resultados obtenidos mediante análisis tipo Western en plantas de *C. quinoa* infectadas con CarMV no mostraron diferencias en los niveles de acumulación de la p7 del CarMV en las hojas inoculadas de plantas crecidas en ambas condiciones de crecimiento (Fig. 3). Estos resultados unidos al mismo tamaño observado para las lesiones locales formadas en las hojas inoculadas en ambas condiciones de crecimiento, sugieren que no hay diferencias en el movimiento célula a célula que pudieran explicar las diferencias en la invasión viral. La observación de que la MP p7 del CarMV se encuentra en el tallo de sólo aquellas plantas que desarrollaron

una infección sistémica, podría apoyar resultados previos que habían demostrado que la MP era requerida para el movimiento a larga distancia en el caso del TMV (Arce-Johnson y col., 1997) o del CMV (Blackman y col., 1998). Sin embargo, puesto que la infección en tallo no sólo afecta al tejido vascular, sino que infecta epidermis, corteza y médula (Fig. 8A), esta MP presente en el tallo podría explicarse por el movimiento célula a célula en estos tejidos, siendo por tanto no necesariamente requerida para el movimiento a larga distancia.

En varias interacciones virus-huésped se ha demostrado que el movimiento a larga distancia puede verse restringido en diferentes barreras celulares. Así, se ha demostrado que la interfase BS-células vasculares actúa como una barrera que condiciona la especificidad de huésped (Thompson y García-Arenal, 1998) y es crítica en los mecanismos de resistencia no necrótica (Goodrick y col., 1991) así como en la resistencia mediada por la replicasa (Wintermantel y col., 1997). También se ha descrito que la interfase célula acompañante-parénquima vascular (CC/PP) de venas menores constituía la barrera celular responsable de la caída en la acumulación del virus de una estirpe suave del TMV frente a la estirpe severa U1 (X.S. Ding y col., 1995). Los estudios al microscopio óptico de las venas mayores de las hojas inoculadas de *C. quinoa* demostraron que el CarMV alcanza el sistema vascular en ambas condiciones de infección local y sistémica (Figs. 5 y 6). Estos resultados indican que la ausencia de infección sistémica en las plantas crecidas en cámara de cultivo no es debida a la incapacidad del virus para alcanzar el sistema vascular como se había descrito en los ejemplos anteriores. La presencia del CarMV en el sistema vascular de las plantas crecidas en cámara de cultivo pone de manifiesto que la restricción a la infección sistémica ocurre después de la entrada en floema, un primer paso necesario para el movimiento a larga distancia. Este mecanismo podría ser similar al propuesto para la supresión del movimiento a larga distancia del TEV en huéspedes no susceptibles (Shaad y Carrington, 1996) o del CMV en plantas resistentes de pimiento (Dufour y col., 1989). En esta última interacción, los estudios de microscopía de inmunofluorescencia demostraban que la infección del CMV en el peciolo de variedades de pimiento resistentes era limitada a uno o dos haces vasculares, una situación idéntica a la

observada en los peciolos de las hojas inoculadas en la interacción CarMV-*C. quinoa* crecidas en condiciones de cámara de cultivo (Fig. 7).

A partir de estos resultados discutidos anteriormente, se pudo concluir que las plantas crecidas en las condiciones existentes en un invernadero eran más susceptibles a la infección sistémica que aquellas crecidas en una cámara de cultivo. Entre los factores que pueden influir en esta respuesta diferencial (tales como temperatura, luz, nutrientes, etc.), se ha demostrado que la intensidad de la luz (Qiu y Schoelz, 1992) y la temperatura (ej. Soler y col., 1998; Myers y col., 1993; Ducasse y Shepherd, 1995; Ding y col., 1999) juegan un papel clave en la modulación de la distribución final del virus en un gran número de interacciones virus-huésped incluyendo aquellas que implican una respuesta hipersensible (ver Matthews, 1991, para revisión). Cuando plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas con CarMV se crecieron a altas temperaturas (32ºC) en una cámara de cultivo, se observó que aparecían plantas infectadas sistémicamente (no se muestran los datos), pero sólo en un número limitado de plantas y las lesiones de las hojas sistémicas fueron de menor tamaño que las observadas en hojas equivalentes de plantas crecidas en invernadero, indicando que además de la temperatura otros factores están modulando la infección sistémica. Ding y col. (1999) habían demostrado que la infección de plantas de cebada por el *Virus del mosaico del bromo* (BMV) era principalmente restringida a células de la vasculatura y a células asociadas a ellas, cuando las plantas eran crecidas a 24-20ºC y esta restricción fue abolida cuando las plantas infectadas eran mantenidas durante 2 horas a 34ºC. Nuestros resultados fueron más parecidos a los descritos por Ducasse y Shepherd (1995), los cuales demostraron que el *Virus de la clorosis de las venas del cacahuete* (PCSV) desarrollaba infeción sistémica en tabaco y *Datura inoxia* a 33ºC, pero no a 25ºC, aún cuando la multiplicación y acumulación del virus fue mucho más alta en las hojas inoculadas de estas últimas plantas. Estas observaciones fueron justificadas por los autores argumentando que los mecanismos de resistencia del huésped serían activos a 25ºC pero estarían reprimidos a 33ºC. Aunque en nuestro caso no se pueda descartar esta posibilidad, creemos que una explicación más convincente de nuestros resultados podría residir en la dependencia de la influencia de la intensidad de la luz

y/o de la temperatura en la eficiencia del transporte por floema del fotoasimilado. Está ampliamente establecido que los virus de plantas utilizan las rutas de translocación del fotoasimilado para moverse a través de la planta (ej. Leisner y col., 1992), y que ambos factores, calidad de la luz (Kasperbauer y Kaul, 1996) y temperatura (Farrar y Gunn, 1996), juegan un papel importante en la regulación de las relaciones fuente-sumidero implicadas en el reparto del fotoasimilado durante el crecimiento de la planta. Por tanto, es razonable pensar que las condiciones de crecimiento de las plantas en un invernadero son más permisivas en facilitar la translocación del fotoasimilado y como consecuencia, el movimiento sistémico del virus desde la hoja inoculada. Son, pues, necesarios nuevos experimentos para comprobar esta hipótesis e intentar discriminar entre intensidad de luz y temperatura como el factor principal que está favoreciendo una mayor competencia para el transporte vascular del virus después de la entrada en floema.

Conclusiones

6. Conclusiones

En esta memoria se ha llevado a cabo el estudio del movimiento a larga distancia del CarMV en su huésped natural clavel y en un huésped experimental *Chenopodium quinoa*, y la influencia de determinados factores ambientales en la distribución final del virus. También se ha realizado un estudio de la cinética de acumulación de las cadenas positivas y negativas de los RNAs genómico y subgenómicos del CarMV y de sus productos de traducción CP y MP (p7), así como, la distribución espacio-temporal de las cadenas positivas y negativas de los RNAs y la localización subcelular de la CP y MP (p7).

1. Los estudios de la cinética de acumulación de las cadenas positivas y negativas de los RNAs del CarMV mostraron que las cadenas positivas se acumularon del orden de 100 veces más que las negativas y en ambos casos los RNAs subgenómicos aparecieron antes y sus niveles de acumulación fueron mayores que los del genómico en estadíos tempranos en la infección (2-5 dpi). Además, el RNA subgenómico más pequeño, que dirige la traducción de la CP, se acumuló dos veces más que el subgenómico que dirige la traducción de la p7. La detección de cadenas negativas completas de los RNAs subgenómicos es compatible con un mecanismo de síntesis de terminación prematura a partir de un RNA genómico molde de longitud completa. Además, los análisis de hibridación *in situ* al microscopio óptico pusieron de manifiesto una localización espacio-temporal distinta para las cadenas positivas y negativas del CarMV en tejido infectado, de manera que la replicación parece estar espacialmente regulada localizándose inmediatamente detrás del frente de infección.

2. La proteína de movimiento p7 no se expresa de manera transitoria como lo hacen la gran mayoría de proteínas de movimiento virales lo que sugiere su implicación en otras funciones del ciclo viral. Tanto la p7 como la CP presentan una localización subcelular mayoritariamente citosólica. Sin embargo, a diferencia de la CP,

la proporción de proteína p7 que se detectó en la pared celular fue aumentando con los días de infección.

3. Los estudios de movimiento a larga distancia del CarMV en los huéspedes estudiados (clavel y *C. quinoa*) ponen de manifiesto que la translocación del virus sigue las mismas pautas que el flujo del fotoasimilado al observar que el movimiento del virus ocurre preferentemente desde una hoja o tejido maduro (fuente) hacia el tejido joven (sumidero) más cercano, de manera que aquellas hojas que han dejado de ser sumidero en el momento de entrada del virus en la planta no pueden ser infectadas vía floema pero sí por un movimiento célula a célula desde el tallo.

4. El análisis espacial y temporal de las pautas de acumulación del CarMV en la infección sistémica de plantas de clavel inoculadas, demostraron que el tiempo mínimo necesario para que el virus entrara en el sistema de transporte general de la planta desde una hoja inoculada fue de 5-7 días. Los resultados de los análisis inmunocitoquímicos de la hoja inoculada serían consistentes bien con la carga del CarMV en el floema directamente en la vena principal desde células no vasculares, o bien a través de las venas intermedias, mientras que la descarga en las hojas sistémicas sería llevada a cabo por los haces laterales o secundarios (venas de orden II). En los estadíos tempranos de la infección se observó la influencia de la filotaxis entre las hojas inoculadas y las hojas sistémicas en el movimiento del virus, así como la asimetría de la infección en el tallo.

5. En todos los casos analizados, tanto de infección natural como de plantas inoculadas con el CarMV, el meristemo apical de plantas de clavel aparecía libre de infección y por tanto el virus era incapaz de invadirlo, al igual que ocurría en los meristemos de brotes laterales y yemas axilares. Sin embargo, el virus se acumula en el tejido floemático del brote apical. Cuando las hojas nacientes alrededor del meristemo apical desarrollan una vasculatura (protofloema) que conecta con la vasculatura del tallo, el virus pasa por ella infectando las mismas, y esto sólo ocurre a partir del

segundo o tercer par de hojas separadas del meristemo. Otros tejidos de tipo meristemático como el cambium y el felógeno del tallo subterráneo y raíz tampoco fueron invadidos por el virus.

6. En la interacción CarMV-*C. quinoa* se demuestra que la intensidad de la luz y/o la temperatura juegan un papel clave en la modulación de la distribución final del CarMV, de manera que plantas crecidas en condiciones de invernadero (35-40ºC día / 10-15ºC noche) fueron más susceptibles a la infección sistémica del virus que aquellas crecidas en cámara de cultivo (25ºC día / 18ºC noche). No se encontraron diferencias en la tasa de replicación y/o acumulación, ni en el movimiento célula a célula del virus en hojas inoculadas de plantas crecidas en ambas condiciones de crecimiento, ni tampoco se observó una barrera celular que impidiera al virus alcanzar el sistema vascular. La restricción a la infección sistémica ocurre por tanto, después de la entrada en floema, el primer paso necesario que rige las pautas del movimiento a larga distancia.

Bibliografía

7. Bibliografía

Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R. y Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-743.

Ahlquist, P., Strauss, E., Rice, C.M., Strauss, J., Haseloff, J. y Zimmern, D. (1985). Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contains homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses. *J. Virol.* **53**, 536-542.

Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R. y Dale, P.J. (1998). Transripcional and post-transcriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279,** 2113-2115.

Allen, W.R., Matteoni, J.A. y Broadbent, A.B. (1991). Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemums infected with the *Tomato spotted wilt virus*. En: "*Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato spotted wilt virus*". Ed. Hsu, H.T. y Lawson, R.H.Proc. USDA Workshop, United States Depat. Agriculture.

Allison, A.V. y Shalla, T.A. (1974). The ultrastructure of local lesions induced by *Potato virus X*: A sequence of cytological events in the course of infection. *Phytopathology* **64,** 784-793.

Almon, E., Horowitz, M., Wang, H.L., Lucas, W.J., Zamski, E. y Wolf, S. (1997). Phloem–specific expression of TMV-MP alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **114,** 475-481.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. y Vance, V.B. (1998). A viral supressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 13079-13084.

Andrianifahanana, M., Lovins, K., Dute, R., Sikora, E. y Murphy, J.F. (1997). Pathway for phloem-dependent movement of *Pepper motle potyvirus* in the stem of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* **87**, 892-898.

Angell, S.M., Davies, C. y Baulcombe, D.C. (1996). Cell-to-cell movement of *Potato virus X* is associated with a change in the size exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* **216,** 197-201.

Appiano, A., D'Agostino, G., Redolfi, P. y Pennazio, S. (1981). Sequence of cytological events during the process of local lesion formation in the *Tomato bushy stunt virus-Gomphrena globosa* hypersensitive system. *J. Ultrastruct. Res.* **76,** 173.

Appiano, A., Pennazio, S. y Redolfi, P. (1978). Cytological alterations in tissues of *Gomphrena globosa* plants systemically infected with *Tomato bushy stunt virus*. *J. Gen. Virol.* **40,** 277.

Aranda, M.A. y Maule, A.J. (1998). Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*, **243**, 261-267.

Arce-Johnson, P., Reimann-Philipp, U., Padget, H.S., Rivera-Bustamante, R. y Beachy, R.N. (1997). Requirement of the movement protein for long distance spread of *Tobacco mosaic virus* in grafted plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 691-699

Arroyo, R., Soto, M.J., Martínez-Zapater, J.M. y Ponz, F. (1996). Impaired cell to cell movement of *Potato virus Y* in pepper plants carrying the Y^{a} *(pvr2^{l})* resistance gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 314-318.

Atabekov, J.G. y Dorokhov, Y.L. (1984). Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. *Adv.Virus Res.* **29,** 313-364.

Atabekov, J.G. y Taliansky, M.E. (1990). Expression of a plant virus–coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.* **38,** 201-248.

Balachandran, S., Hull, R., Vaadia, Y., Wolf, S. y Lucas, W.J. (1995). Alteration in carbon partitioning induced by the movement protein of *Tobacco mosaic virus* originates in the mesophyll and is independent of change in plasmodesmal size exclusion limit. *Plant Cell Environ.* **18,** 1301-1310.

Balachandran, S., Xiang Y., Schobert, C., Thompson, G.A. y Lucas, W.J. (1997). Phloem sap proteins of Cucurbita maxima and Ricinus communis have the capacity to traffic cell-to-cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 14150-14155.

Balsalobre , J.M., Más, P., Sánchez-Pina, M.A. y Pallás, V. (1997). Spatial distribution of acidic chitinases and their messenger RNAs in tobacco plants infected with *Cherry leaf roll virus*. *Molecular Plant-Microbe Interact.* **10**, 784-788.

Baric, R.S., Stoniman, S.A., Razavi, M.K., y Lai, M.M.C. (1985). Characterization of leader-related small RNAs in *Coronavirus*-infected cells: further evidence for leader-primed mechanism of transcription. *Virus Res.* **3**, 19-33.

Barker, H. (1987). Multiple components of the resitance of potatoes to *Potato leafroll virus*. *Ann. Appl. Biol.* **111,** 641-648.

Battlè, A. y Laviña, A. (1992). Virus mas difundidos en los cultivos de clavel del Maresme. *Phytoma España* **38**, 1522.

Baulcombe, D.C., Chapman, S.N. y Santa-Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescen protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **7,** 1045-1053.

Bawden, F.C. y Roberts, F.M. (1948). Phtosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* **35,** 418-428.

Beclin, C., Berthome, R., Palauqui, J.C., Tepfer, M. y Vaucheret, H. (1998). Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* **25,** 313-317.

Beebe, D.U. y Evert, R.F. (1992). Photoassimilate pathway(s) and phloem loading in the leaf of *Moricandia arvensis* (L.) DC. (*Brasicaceae*). *Int. J. Plant Sci.* **153,** 61-77.

Behncken, G.M. y Dale, J.L. (1984). *Glycine mottle virus*: a possible member of the *Tombusvirus* group. *Intervirology* **21**, 159-166.

Behncken, G.M., Francki, R.I.B. y Gibbs, A.J. (1982). *Galinsoga mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. **252**.

Beijerinck, M.W. (1898). Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de ulekziekte der tabaksbladen. Verls. Gewone Vergad. Wis-Natuurkd. Afd., K. Akad. Wet. Amsterdam **7**, 229-235.

Bennet, C.W. (1940). Relation of food translocation to movement of virus of *Tobacco mosaic. J. Agric. Res.* **60,** 361-389.

Berna, A., Briand, J.P., Stussi-Garaud, C. y Godefroy-Colburn, T. (1986). Kinetics of accumulation of the three non-structural proteins of *Alfalfa mosaic virus* in tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **67**, 1135-1147.

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

Berthomé, R., Kusiak, C., Renou, J.P., Albouy, J., Freire, M.A. y Dinant, S. (1998). Relationship of the *Pelargonium flower break carmovirus* (PFBV) coat protein gene with that of other carmoviruses. *Arch. Virol.* **143,** 1823-1829.

Blackman, L.M., Boevink, P., Santa Cruz, S., Palukaitis, P. y Oparka, K.J. (1998). The movement protein of *Cucumber mosaic virus* traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* **10,** 525-537.

Bock, K.R. (1982). *Tephrosia symptomless virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. **256**.

Bonnemain, J.L. 1969. Le phloème interne et le phloème inclus des dicotylèdonnes, leur histogénèse et leur physiologie. *Rev. Gen. Bot.* **76**, 5-36.

Bos, L., van Dorst, K.J.M., Huttinga, H. y Maat, D.Z. (1984). Further characterization of *Melon necrotic virus* causing severe disease in glasshouse cucumbers. *Neth. J. Plant Pathol.* **90**, 55-69.

Bostwick, D.E., Dannenhofer, J.M., Skaggs, M.I., Lister, R.M., Larkins, B.A. y col. (1992). Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* **4,** 1539-1548.

Botha, C.E.J. y van Bel, A.J.E. (1992). Quantification of symplastic continuity as visualized by plasmodesmograms. Diagnostic values for phloem-loading pathways. *Planta* **187,** 359-366.

Bozarth, R.F. y Shoyinnka, S.H. (1979). *Cowpea mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. **212**.

Brierley, P. (1964). Effects of four viruses on yield and quality of King Cardinal carnations. *Plant Dis. Rep*. **48,** 5.

Brierley, P. y Smith, E.F. (1957). Carnation viruses in the United States. *Phytopathology* **47,** 714.

Brige, J.P., Morand, J.C. y Tharaud, M. (1990). Versión española: Peña-Iglesias, A. Enfermedades de virus de clavel. En: *"Patología de los cultivos florales y ornamentales"*. Ed. Mundi-Prensa. pp.196.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. y Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenecity determinants are supressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17,** 6739-6746.

Burnell, J.N. (1998). An enzymatic method for measuring the molecular weight exclusion limit of plasmodesmata of bundle sheath cells of C4 plants. *J. Exp. Bot.* **39,** 1575-1580.

Callaway, A., Liu, W., Andrianov, V., Stenzler, L., Zhao, J., Wettlaufer, S., Jayakumar, P. y Howell, S.H. (1996). Characterization of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) resistance in virus-resistant ecotypes of *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9,** 810-818.

Cano, E.A., Sánchez-Gómez, P. y Balsalobre, J.M. (1994). El CarMV en la flora de zonas de cultivo de clavel en la Región de Murcia. *Phytoma España*, **55**, 17-22.

Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.H., Oparka, K.J. y Palukaitis, P. (1997). Characterization of *Cucumber mosaic virus*. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of CMV. *Virology* **237,** 237-248.

Capoor, S.P. (1949). The movement of *Tobacco mosaic viruses* and *Potato virus X* through toamto plants. *Ann. Appl. Biol.* **36,** 307-319.

Carpenter, C.D., Simon, A.E. (1998). Analysis of sequences and predicted structures required for viral satellite RNA accumulation by *in vivo* genetic selection. *Nucleic Acids Res.* **26,** 2426-2432.

Carrington, J.C. (1986). Structure and function of the *Carnation mottle virus* genome. *Ph. D. Thesis*. Department of Plant Pathology. Univ. California. Berkeley.

Carrington, J.C., Heaton, L.A., Zuidema, D., Hillman, B.I. y Morris, T.I. (1989). The genome structure of *Turnip crinkle virus*. *Virology* **170,** 219-226.

Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. y Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.

Carrington, J.C. y Morris, T.J. (1985). Characterization of the cell-free translation products of *Carnation mottle* genomic and subgenomics RNAs. *Virology* **144,** 1-10.

Carrington, J.C. y Morris, T.J. (1986). High resolution mapping of *Carnation mottle virus* associated RNAs. *Virology* **150**, 196.

Carrington, J.C., Morris, T.J., Stockley, P.G. y Harrison, S.C. (1987). Structure and assembly of *Turnip crinkle virus*. IV. Analysis of the coat protein gene and implications of the subunit primary structure. *J. Mol. Biol*. **194,** 265-276.

Cañizares, M.C., Marcos, J.F. y Pallás, V. (2001). Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the Tombusviridae family. *Arch. Virol.* (en prensa).

Chang, B.Y., Lin, N.S., Liou, D.Y., Chen, J.P., Liou, G.G. y Hsu, Y.H. (1997). Subcellular localization of the 28 kDa protein of the triple-gene-block of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* **78**, 1175-1179.

Chapman, S., Hills, G., Watts, J. y Baulcombe, D. (1992a). Mutational analysis of the coat protein of *Potato virus X*: effects on virion morphology and viral pathogenecity. *Virology* **191,** 223-230.

Chapman, S., Kavanagh, T. y Baulcombe, D. (1992b). *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* **2,** 549-557.

Cheng, Ch., Tzafrir, I., Lockhart, B.E.L. y Olszewski, N.E. (1998). Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina yellow mottle badnavirus*. *J. Gen. Virol.* **79,** 925-929.

Cheng, NH, Lin, CL, Carter, SA y Nelson, RS. (2000). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **23**, 349-362.

Citovsky, V. (1993). Probing plasmodesmal transport with plant viruses. *Plant Physiology* **102**, 1071-1076.

Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. y Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of *Tobacco mosaic virus* is a single strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60,** 637-647.

Citovsky, V., Knorr, D. y Zambryski, P. (1991). Gene I, a potential movement locus of CaMV, encodes an RNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 2476-2480.

Citovsky, V, McLean, B.G., Zupan, J. y Zambryski, P. (1993). Phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein by a developmentally-regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* **7,** 904-910.

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

Citovsky, V. y Zambryski, P. (1991). How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections?. *BioEssays* **13,** 373-379.

Citovsky, V. y Zambryski, P. (1995). Transport of protein-nucleic acid complexes within and between plant cells. *Membr. Protein Transp.* **1,** 39-57.

Citovsky, V. y Zambryski, P. (2000). Systemic transport of RNA in plants. *Trends Plant Sci.* **5,** 52-54.

Ciuffreda, P., Rubino, L. y Russo, M. (1998). Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of *Galinsoga mosaic virus* genomic RNA. *Arch. Virol.* **143,** 173-180.

Clark, A.M., Jacobsen, K.R., Bostwick, D.E., Dannenhoffer, J.M., Skaggs, M.I. y Thompsom, G.A. (1997). Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* **12,** 49-61.

Clark, S.E. (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. *Plant Cell* **9**, 1067-1076.

Cohen, Y., Gisel, A. y Zambryski, P.C. (2000a). Cell-to cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged *Turnip crinkle viruses*. *Virology* **273**, 258-266.

Cohen, Y., Qu, F., Gisel, A., Morris, T.J. y Zambryski, P.C. (2000b). Nuclear localization of *Turnip crinkle virus* movement protein p8. *Virology* **273**, 276-285.

Collmer, C.W., Stenzler, L., Chen, X., Fay, N. y Howell, S.H. (1992). Single amino acid change in the helicase domain of the putative RNA replicase of Turnip crinkle virus alters symptom intensification by virulent satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 309-313.

Cooper, B. y Dodds, J. A. (1995). Differences in the subcellular localization of *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* movement proteins in infected and transgenic plants. *J. Gen. Virol.* **76**, 3217-3221.

Cordova, A.R., Taleisnik, E., Brunotto, M. y Racca, R. (1991). Mitigation of *Tomato spotted wilt virus* infection and symptom expression by water stress. *J. Phytopathol.* **133,** 255-263.

Costa, A.S. y Bennet, C.W. (1955). Studies on the mechanical transmission of the *Yellow virus* in sugar beet. *Phytopathology* **45,** 233-238.

Covey, S.N., Turner, D.S., Lucy, A.P. y Saunders, K. (1990). Host regulation of the *Cauliflower mosaic virus* multiplication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87,** 1633-1637.

D'Arcy, C.J. y de Zoeten, G.A. (1979). *Beet western yellow virus* in phloem tissue of *Thlaspi arvense*. *Phytopathology* **69,** 1194-1198.

Dauber, S. (1992). Molecular determinants of plant-virus interaction. En: *"Molecular signals in plant-microbe interactions"*. Ed. Verma, D.P.S. CRC Press, Boca Raton. pp. 423-443.

Davies, C., Hills, G. y Baulcombe, D.C. (1993). Subcellular localization of the 25-Kda protein encoded in the triple gen block of *Potato virus X*. *Virology* **197,** 166-175.

Dawson, W.O. y Hilf, M.E. (1992). Host-range determinants of plant viruses. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **43,** 527-555.

DeJong, W. y Ahlquist, P. (1992). A hybrid plant RNA virus made by transferring the noncapsid movement protein from a rod-shaped virus to an icosahedral virus is competent for systemic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89,** 6808-6812.

Demangeat, G., Hemmer, O., Reinbolt, J., Mayo, M.A. y Fritsch, C. (1992). Virus-specific proteins in cells infected with *Tomato black ring nepovirus*: evidence for proteolytic processing *in vivo*. *J. Gen. Virol*. **73**, 1609-1614.

Deom, C.M., Lapidot, M. y Beachy, R.N. (1992). Plant virus movement proteins. *Cell* **69**, 221-224.

Deom, C.M., Schubert, K.R., Wolf, S., Holt C.A., Lucas, W.J. y Beachy, R.N. (1990). Molecular characterization and biological function of the movement protein of *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3284-3288.

Deom, C.M., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J. y Beachy, R.N. (1991). Altered function of the *Tobacco mosaic virus* movement protein in a hypersensitive host. *Virology* **180,** 251-256.

Derrick, P.M., Barker, H. y Oparka, K.J. (1990). Effect of virus infection on symplastic transport of fluorescent tracers in *Nicotiana clevelandii* leaf epidermis. *Planta* **181,** 555-559.

Derrick, P.M., Barker, H. y Oparka, K.J. (1992). Increase in plasmodesmal permeability during cell-to-cell spread of *Tobacco rattle virus* from individually inoculated cells. *Plant Cell* **4,** 1405-1412.

Derrick, P.M., Carter, S.A. y Nelson, R.S. (1997). Mutation of the *Tobacco mosaic tobamovirus* 126/183 KDa proteins: effects on phloem–dependent virus accumulation and synthesis of viral proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10,** 589-596.

Devergner, J.C. (1984). Les maladies a virus de l´oeillet et la production de plants sains. *Phytoma France*

Devergne, J.C. (1988). Carnation Mottle Virus, CarMV. En: *"European Handbook of Plant Diseases"*. Blackwell Scientific Publication Ltd. Ed. Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A., Phillips, D.H. y Archer, S.A. pp: 95

Devergne, J.C., Cardin, L. y Bontemps, J. (1982). Indexages biologiques et immunoenzymatique (ELISA) pour la production d'oeillets indemnes de *Virus de la mabrure* (CarMV). *Agronomie* **2,** 655-666.

Díez, J., Marcos, J.F. y Pallás, V. (1998). *Carmovirus* isolation and RNA extraction. En: *"Methods in Molecular Biology, Vol. 81: Plant Virology Protocols: From virus isolation to transgenic resistance"*. NJ. Ed. Foster G. y Taylor S. Humana Press Inc. Totowa, pp. 211-217.

Díez, J., Marcos, J.F. y Pallás, V. (1999). Characterization and *in vitro translation* of pelargonium flower break virus. *Arch. Virol*. **144**, 1627-1637.

Ding, B. (1997). Cell-to-cell transport of macromolecules through plasmodesmata: a novel signally pathway in plants. *Trends Cell Biol*. **7,** 5-9.

Ding, B. (1998). Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Mol. Biol*. **38**, 279-310.

Ding, B., Haudenshield, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N. y Lucas, W.J. (1992a). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4,** 915-928.

Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P. y Lucas, W.J. (1995). *Cucumber mosaic virus* 3a protein potentiates cell to cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* **207**, 345-353

Ding, B., Parthasarathy, M.V., Niklas, K. y Turgeon, R. (1988). A morphometric analysis of the phloem unloading pathway in developing tobacco leaves. *Planta* **176,** 307-318.

Ding, B., Turgeon, R. y Parthasarathy, M.V. (1992b). Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169,** 28-41.

Ding, X.S., Carter, C., Deom, M.C. y Nelson, R.S. (1998). *Tobamovirus* and *potyvirus* accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiol.* **116,** 125-136.

Ding, X.S., Flasinski, S. y Nelson, R.S. (1999). Infection of barley by *Brome mosaic virus* is restricted predominantly to cells in and associated with veins through a temperature-dependent mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interact.* **12**, 615-623

Ding, X.S., Shintaku, M.H., Arnold, S.A. y Nelson, R.S. (1995). Accumulation of mild and severe strains of *Tobacco mosaic virus* in minor veins of tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **8**, 32-40.

Ding, X.S., Shintaku, M.H., Carter, S.A. y Nelson, R.S. (1996). Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with *Tobacco mosaic virus* mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93,** *11155-11160.*

Dingwall, C. (1991). Transport across the nuclear envelope: enigmas and explanations. *BioEssays* **13,** 213-218.

Dolenc, J., Vilhar, B. y Dermastia, M. (2000). Systemic infection with *Potato virus* Y^{NTN} alters the structure and activity of the shoot apical meristem in a susceptible potato cultivar. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. **56**, 33-38.

Dolja, V.V., Haldelman R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. y Carrington, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO J*. **13,** 1482-1491.

Dolja, V.V., Haldelman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. y Carrington, J.C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206,** 1007-1016.

Donald, R.G.K., Zhou, H. y Jackson, A.O. (1993). Serological analysis of *Barley stripe mosaic virus*-encoded proteins in infected barley. *Virology* **195**, 659-668.

Drouzas, A.D., Offei, S.K. y Coutts, R.H.A. (1996). Subcellular location and expression of *Tobaco necrosis necrovirus* p7a protein. *J. Phytopathol*. **144**, 297-299.

Ducasse, D.A. y Shepherd, R.J. (1995). Sytemic infection of Solanaceous hosts by *Peanut chlorotic streak caulimovirus* is temperature dependent and can be complemented by coinfection with *Figwort mosaic caulimovirus*. *Phytopathology* **85**, 286-291.

Dufour, O., Palloix, A., Selassie, K.G., Pochard, E. y Marchoux, G. (1989). The distribution of *Cucumber mosaic virus* in resistant and susceptible plants of pepper. *Can. J. Bot*. **67**, 655-660.

Epel, B., Padgett, H.S., Heinlein, M., y Beachy, R.N. (1996). Plant virus movement protein dynamics probed with a movement protein fused to GFP. *Gene* **173**, 75-79.

Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K.E., Jonard, G. y Bouzoubaa, S. (1999). The first triple gene block protein of *Peanut clump virus* localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* **264**, 220-229.

Erwee, M.G. y Goodwin, P.B. (1985). Symplast domains in extrastelar tissues of *Egeria densa* Planch. *Planta* **163**, 9-19.

Esau, K. (1969). The phloem. En: *"Handbuch der pflanzenanatomie"*. Ed. Zimmermann, W.; Ozenda, P. y Wulff, H.D. Berlin, Springer-Verlag. Vol. **5,** No. **2.**

Esau, K. (1967). Minor veins in *Beta* leaves: structure related to function. Proc. Am. Philos. Soc. **111**, 219-233.

Esau, K. (1977). Anatomy of seed plants. Ed. John Wiley y Sons, New York, pp 321-332.

Esau, K. y Cronshaw, J. (1967). Tubular components in cells of healthy and *Tobacco mosaic virus*-infected *Nicotiana*. *Virology* **33,** 26-35.

Esau, K., Cronshaw, J. y Hoefert, L.L. (1967). Relation of *Beet yellow virus* to the phloem and to the movement in the sieve tube. *J. Cell Biol.* **32,** 71-87.

Evert, R.F. y Mierzwa, R.J. (1986). Pathway(s) of assimilate movement from mesophyll cells to sieve tubes in the *Beta vulgaris* leaf. En: *"Phloem transport"*. Ed. Cronshaw, J. Lucas, W.J. y Giaquinta, R.T. A.R. Liss, New York. pp. 419-432.

Evert, R.F. y Russin, W.A. (1993). Structurally, phloem unloading in the maize leaf cannot be symplastic. *Am. J. Bot.* **80,** 1310-1317.

Evert, R.F., Russin, W.A. y Botha, C.E.J. (1996). Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathways and phloem loading in the barley leaf. *Planta* **198,** 572-579.

Farrar J.F. y Gunn, S. (1996). Effects of temperature and atmospheric carbon dioxide on source-sink relations in the context of climate change. En: *"Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships"*. Ed. Zamski E., Schaffer A. A. Marcel Dekker Inc., New York, Basel Hong Kong. pp. 389-406.

Fenczik, C.S., Epel, B.L. y Beachy, R.N. (1996). Role of plasmodesmata and viral movement protein in spread of plant viruses. En: *"Plant Gene Research: Signal Transduction in Plant Development"*. Ed. New York: Springer-Verlag Wein. pp. 249-279.

Fisher, D.B. y Oparka, K.J. (1996). Post-phloem transport: Principles and problems. *J. Exp. Bot.* **47,** 1141-1154.

Fisher, D.B., Wu, Y. y Ku, M.S.B. (1992). Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.* **100,** 1433-1441.

Fisher, D.G. y Evert, R.F. (1982). Studies on the leaf of *Amaranthus retroflexus* (*Amaranthaceae*): ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentration in relation to phloem loading. *Planta* **155,** 377-387.

Flasinski, S., Dzianott, A., Pratt, S. y Bujarski, J.J. (1995). Mutational analysis of the coat protein gene of *Brome mosaic virus*: effects on replication and movement in barley and in *Chenopodium hybridum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8,** 23-31.

Forster, R.L.S., Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., van Dolleweerd, C.J. y Andersen, M.T. (1992). The coat protein of *White clover mosaic potexvirus* has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* **191,** 480-484.

Fraenkel-Conrat, H. (1956). The role of nucleic acid in the reconstitution of active *Tobacco mosaic virus*. *J. Am. Chem. Soc.* **78,** 882-883.

Francki, R.I.B., Milne, R.G. y Hatta, T. (1985). *Tombusvirus* group. En: "*Atlas of Plant Viruses*". Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol. **I**, pp.181-197.

Fritz, E., Evert, R.F. y Heiser, W. (1983). Microautoradiographic studies of phloem loading and transport in the leaf of *Zea mays* L. *Planta* **159,** 193-206.

Fujita, M., Mise, K., Kajiura, Y., Dohi, K. y Furusawa, I. (1998). Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of *Brome mosaic bromovirus*. *J. Gen. Virol.* **79**, 1273-1280.

Fujiwara, T., Giesman-Cookmeyer, D., Ding, B., Lommel, S.A. y Lucas, W.J. (1993). Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the *Red clover necrotic mosaic virus* movement protein. *Plant Cell* **5,** 1783-1794.

Gamalei, Y.V. (1989). Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees* **3,** 96-110.

Gamalei, Y.V. (1991). Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* **5**, 50-64.

Gamalei, Y.V., Pakhomova, M.V. y Sjutkina, A.V. (1992). Ecological aspects of assimilate transport. I. Temperature. *Fiziol. Rast.* **39,** 1068-1078.

Gamalei, Y.V., van Bel, A.J., Pakhomova, M.V. y Sjutkina, A.V. (1994). Effects of temperature on the conformation of the endoplasmic reticulum and on starch accumulation in leaves with the symplasmic minor-vein configuration. *Planta* **194,** 443-453.

García-Castillo, S., Marcos, J.F., Pallás, V. y Sánchez-Pina, M.A. (2001). Influence of the plant growing conditions on the translocation routes and systemic infection of *Carnation mottle virus* in *Chenopodium quinoa* plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**, (en prensa).

Gargouri, R., Joshi, R.L., Bol., J.F., Astier-Manifacier, S., y Haenni, A.L. (1989). Mechanism of synthesis of *Turnip yellow mosaic virus* coat protein subgenomic RNA *in vivo*. *Virology* **171**, 386-393.

Gergerich, R.C. y Scott, H.A. (1988). Evidence that virus transmission and virus infection of non-wounded cells are associated with transmissibility by leaf-feeding beetles. *J. Gen. Virol.* **69,** 2935-2938.

Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J. y Citovsky, V. (1997). Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48,** 27-50.

Gibbs, A.J. (1976). Viruses and plasmodesmata. En: *"Intercellular communications in plants: studies on plasmodesmata"*. Ed. Gunning, B.E.S. y Robards, A.W. Springer-Verlag, Berlin. pp. 149-164.

Giesman-Cookmeyer, D. y Lommel, S.A. (1993). Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* **5**, 973-982.

Giesman-Cookmeyer, D., Silver, S., Vaewhongs, A.A., Lommel, S.A. y Deom, C.M. (1995). *Tobamovirus* and *Dianthovirus* movement proteins are functionally homologous. *Virology* **213,** 38-45.

Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J. (1996). How do viruses traffic on the "vascular highway"?. *Trends in Plant Sci.* **1**, 260-268.

Gill, C.C. y Chong, J. (1975). Development of the infection in oat leaves inoculated with *Barley yellow dwarf virus*. *Virology* **66,** 440-453.

Goldbach, R. (1987). Genome similarities between plant and animal RNA viruses. *Microbiol. Sci.* **4,** 197-202.

Goldbach, R., Le Gall, O. y Wellink, J. (1991). Alpha-like viruses in plants. *Sem. Virol.* **2,** 19-25.

Gómez, G. y Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (en prensa).

Goodman, N.R., Kirali, Z. y Wood, K.R. (1986). En: "*The Biochemistry and Physiology of Plant Diseases*". Ed. Columbia: University of Missouri Press.

Goodman, R.M. (1981). Geminiviruses. En. "*Handbook of Plant virus infection and comparative diagnosis*". Ed. Kurstak, E. New York, Elsevier. pp. 879-910.

Goodrick, B.J., Kuhn, C.W. y Hussey, R.S. (1991). Restricted systemic movement of *Cowpea chlorotic mottle virus* in soybean with nonnecrotic resistance. *Phytopathology* **81,** 1426-1431.

Goodwin, P.B. (1983). Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elodea* leaf. *Planta* **157**, 124-130.

Guilley, H., Carrington, J.C., Balazs, E., Jonard, G., Richards, K. y Morris, T.J. (1985). Nucleotide sequence and genome organization of *Carnation mottle virus* RNA. *Nucleic Acids Res*. **13**, 6663-6677.

Grusack, M.A., Beebe, D.U. y Turgeon, R. (1996). Phloem loading. En: "*Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-sink relationships*". Ed. Zamski, E. y Scaffer, A.A. New York, Marcel Dekker. pp. 209-227.

Gunning, B.E.S., Pate, J.S., Minchin, F.R. y Marks, I. (1974). Quantitative aspects of transfer cell structure in relation to vein loading in leaves and solute transport in legume nodules. *Symp. Soc. Exp. Bot*. **28,** 87-126.

Habili, N. y Symons, R.H. (1989). Evolutionary relatioship between *Luteovirus* and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res*. **17,** 9543-9555.

Hacker, D. L., Petty, I., Wei, N. y Morris, T. J. (1992). *Turnip crinkle virus* genes required for RNA replication and virus movement. *Virology* **186**, 1-8.

Hakkart, F.A. (1964). Description of symptoms and assesment of loss caused by some virus in the carnation cultivar "William Sim". *Neth. J. Plant Pathol*. **70,** 53.

Hakkart, F.A. y Jordanova, J. (1968). Heat treatment experiments with Carnations for the elimination of *Carnation mottle* and *etched ring viruses*. *Neth. J. Plant Pathol.* **74,** 146-149.

Hakkart, F.A. y van Olphen, M. (1971). *Saponaria vaccaria* "Pink Beauty", a new test plant for *Carnation mottle virus*. *Neth. J. Plant Pathol.* **77,** 127-133.

Hammond, J. (1981). Viruses occurring in *Plantago* species in England. *Plant Pathol.* **30,** 237-243.

Harbison, S.A., Davies, J.W. y Wilson, T.M.A. (1985). Expression of high molecular weight polypeptides by *Carnation mottle virus* RNA. *J. Gen. Virol.* **66,** 2597-2604.

Harbison, S.A., Wilson, T.M.A. y Davies, J.W. (1984). An encapsidated subgenomic messenger RNA encodes the coat protein of *Carnation mottle virus*. *Biosci. Rep.* **4,** 949.

Haritatos. E., Keller, F. y Turgeon, R. (1996). Raffinose oligosacharide concentrations measured in individual cells and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implications for phloem loading. *Planta* **198,** 614-622.

Harrison, B.D. (1985). Advances in geminivirus research. Annu. Rev. Phytopathology **23**, 55-82.

Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J., Hollings, M.; Shepherd, R.I.; Valenta, R.J. y Wetter, C. (1971). Sixteen groups of plant viruses. *Virology* **45**, 356-363.

Harrison, S.C. (1983). Virus structure: High-resolution perspectives. *Adv. Virus Res.* **28,** 187-240

Hatta, T., Francki, R.I.B. y Grivell, C.J. (1983). Particle morphology and cytopathology of *Galinsoga mosaic virus*. *J. Gen. Virol*. **64,** 687.

Hayward, H.E. (1938). En: *"The Structure of Economic Plants"*. Ed. Macmillan Company, New york.

Heaton, L.A., Lee, T.C., Wei, N. y Morris, T.J. (1991). Point mutations in the *Turnip crinkle virus* capsid protein affect the symptoms expressed by *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **183,** 143-150.

Hefferon, K.L., Doyle, S. y AbouHaidir, M.G. (1997). Immunological detection of the 8K protein of *Potato virus X* (PVX) in cell walls of PVX-infected tobacco and transgenic potato. *Arch. Virol*. **142,** 425-433.

Heinlein, M., Epel, B.L., Padgett, H.S. y Beachy, R.N. (1995). Interaction of *Tobamovirus* movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270,** 1983-1985.

Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B.L. y Beachy, R.N. (1998). Changing patterns of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**, 1107-1120.

Herbers, K., Tacke, E., Hazirezaei, M., Krause, K.P., Melzer, M., Rohde, W. y Sonnewald, U. (1997). Expression of a *Luteoviral* movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J*. **12,** 1045-1056.

Hibrand, L., Le Gall, O., Candresse, T. y Dunez, J. (1992). Immunodetection of the proteins encoded by *Grapevine chrome mosaic nepovirus* RNA2. *J. Gen. Virol.* **73**, 2093-2098.

Hilf, M.E. y Dawson, W.O. (1993). The *Tobamovirus* capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology* **193,** 106-114.

Hokama, K. y Mondail, S.N. (1988). Effect of temperature on symptom expression of *Tomato spotted wilt virus* in cucumber and *Nicotiana glutinosa*. *Proc. Association Plant Protect. Of Kyushu* **34**, 21-24.

Hollings, M. y Stone, O.M. (1964). Investigation of carnation viruses. I. *Carnation mottle*. *Ann. Appl. Biol*. **53**, 103-118.

Hollings, M. y Stone, O.M. (1970). *Carnation mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* No. **7.**

Hollings, M. y Stone, O. M. (1972). *Turnip crinkle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* No. **109**.

Hollings, M., Stone, O.M., Atkey, P.T. y Barton, R.J. (1977). Investigations of carnation viruses (*Carnation mottle virus*). *Ann. Appl. Biol*. **85,** 59-70.

Hollings, M., Stone, O. M. y Smith, D.R. (1972). Productivity of virus-tested carnation clones and the rate of re-infection with virus. *J. Hort. Sci*. **47,** 141-149.

Horner, H.T., Lersten, N.R. y Wirth, C.L. (1994). Quantitative survey of sieve tube distribution in foliar terminal veins of ten dicot species. *Am. J. Bot*. **81,** 1267-1274.

Horns, T. y Jeske, H. (1991). Localization of *Abutilon mosaic virus* (AbMV) DNA whitin leaf tissue by in situ hybridization. *Virology* **181**, 580-588.

Huang, M., Koh, D.C.Y., Weng, L.J., Chang, M.L., Yap, Y.K., Zhang, L. y Wong, S.M. (2000). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Hibiscus chlorotic ringspot virus*, a new member of the genus Carmovirus: Evidende for the presence and expression of two novel open reading frames. *J. Virol.* **74,** 3149-3155.

Huang, M. y Zhang, L. (1999). Association of the movement protein of *Alfalfa mosaic virus* with the endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulb scales. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12,** 680-690.

Huguellet, J.E. y Hooker, W.J. (1966). Latent infection of *Gomphrena globosa* by potato virus X. Phytopathology **56**, 431-437.

Hull, R. (1989). The movement of viruses in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **27**, 213-240

Hull, T. (1977). The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. *J. Gen. Virol.* **36,** 289.

Imlau, A., Truernit, E. y Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**, 309-322.

Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T. y Okada, Y. (1991). Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of *Tobacco mosaic virus* infection. *J. Virol.* **65**, 861-868.

Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K.C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M. y Lucas, W.J. (1998). Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205,** 12-22.

Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Hayashi, H. y Chino, M. (1995). Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195,** 456-463.

Itaya, A., Hickman, H., Bao, Y., Nelson, R. y Ding, B. (1997). Cell-to-cell trafficking of *Cucumber mosaic virus* movement protein: Green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J.* **2,** 1223-1230.

Jackson, D, y Hake, S. (1997). Morphogenesis on the move: cell to cell trafficking of plant regulatory proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 495-500.

Jackson, D., Veit, B. y Hake, S. (1994). Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.

Jones, A. T. (1974). *Elderberry latent virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* **No. 127.**

Jorgensen, R.A., Atkinson, R.G., Forster, R.L. y Lucas, W.J. (1998). An RNA-based information superhighway in plants. *Science* **279,** 1486-1487.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137A-137B.

Kassanis, B. (1955). Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. Appl. Biol.* **43,** 3-113.

Kaschau, K.D. y Carrington, J.C. (1998). A counter defensive strategy of plant viruses: supression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* **95,** 461-470.

Kasperbauer, M.J. y Kaul, K. (1996). Light quantity and quality effects on source-sink relationships during plant growth and development. En: *"Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships"*. Ed. Zamski E., Schaffer A.A. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong. pp. 421-440.

Kasteel, D.T.J., Perbal, C.M., Boyer, J.C., Wellink, J., Goldbach, R.W., Maule, A.J. y van Lent, J.W.M. (1996). The movement proteins of *Cowpea mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* induce tubular structures in plant and insect cells. *J. Gen. Virol.* **77,** 2857-2864.

Kasteel, D.T.J., Wellink, J., Goldbach, R.W. y van Lent, J.W.M. (1997). Isolation and characterization of tubular structures of *Cowpea mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **78,** 3167-3170.

Kasteel, D.T.J., Wellink, J., Verver, J., van Lent, J.W.M., Goldbach, R.W. y van Kammen, A. (1993). The involvement of *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J.Gen.Virol.* **74,** 1721-1724.

Kemp, W.G. (1964). The identity of two sap-transmissible viruses of carnation in Ontario. *Can. J. Bot.* **42,** 45-55.

Kemp, W.G. (1971). Temperature-induced effects on *Carnation mottle virus* infection. *Can. J. Plant Sci.* **51,** 289-297.

Kemp, W.G. (1976). Light-induced effects on early infection with *Carnation mottle virus*. *Can. J. Plant Sci.* **56,** 111-117.

Kempers, R., Prior, D.A.M., van Bel, A.J.E. y Oparka, K.J. (1993). Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Curcubita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant J.* **4**, 567-575.

Kim, K.S., Bird, J., Rodriguez, R.L., Martin, E. M. y Escudero, J. (1986). Ultrastructural studies of *Jatropha gossypifolia* infected with *Jatropha mosaic virus*, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* **76**, 80-85.

Kim, K.S. y Lee, K.W. (1992). Geminivirus-induced macrotubules and their suggested role in cell-to-cell movement *Phytopathology* **82,** 664-669.

Koenig, R. y Lesemann, D.E. (1985). Plant viruses in German rivers and lakes. I. *Tombusvirus*, a *Potexvirus* and *Carnation mottle virus*. *Phytopathol. Z.* **112,** 105-116.

Koenig, R., Lesemann, D.E., Huth, W. y Makkouk, K.M. (1983). Comparison of a new *Soilborne virus* from cucumber with *Tombus-*, *Diantho-*, and other similar viruses. *Phytopathology* **73,** 515-520.

Koenig, R., Ruedel, M. y Lesemann, D.E. (1989). Detection of *Petunia asteroid mosaic*, *Carnation ring spot* and *Tobacco necrosis viruses* in ditches and drainage canals in a grapevine growing area in West Germany. *J. Phytopathology* **127**, 169-172.

Komor, E., Orlich, G., Weig, A. y Kockenberger, W. (1996). Phloem loading–Non metaphysical, only complex: Toward a unified model of phloem loading. *J. Exp. Bot.* **47,** 1115-1164.

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Ryabov, E.V. y Dolja, V.V. (1991). Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may posses chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* **72,** 2895-2903.

Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B. y Lucas, WJ. (1998). Cell-to-cell transport of proteins: requierement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J.* **15,** 367-381.

Kroner, P., Richards, D., Traynor, P. y Ahlquist, P. (1989). Defined mutations in a small region of the *Brome mosaic virus* 2a gene cause diverse temperature-sensitive RNA relication phenotypes. *J. Virol.* **63,** 5302-5309.

Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R. y Frommer, W.B. (1997). Macromolecular traficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleated sieve elements. *Science* **275,** 1298-1300.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Laakson, M.M. y Heaton, L.A. (1993). Asp-Asn substitutions in the putative calcium-binding site of the *Turnip crinkle virus* coat protein affect virus movement in plants. *Virology* **197**, 774-777.

Lai, M.M. (1990). Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 303-333.

Lai, M.M., Baric, R.S., Brayton, P.R. y Stoniman, S.A. (1984). Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3626-3630.

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. y Ward, J.M. (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* **11,** 707-726.

Lartey, R., Ghoshroy, S., Ho, J. y Citovsky, V. (1997). Movement and subcellular localization of a *Tobamovirus* in Arabidopsis. *Plant J.* **12**, 537-545.

Laviña, A. y Battle, A. (1993). First report of *Tomato spotted wilt* virus infection of *Ficus* species in Spain. *Plant Dis*. **77,** 536.

Lawson, R.H., Dienelt, M.N. y Hsu, H.T. (1994). Influence of temperature on the ultrastructure and serological detection of two *Tospovirus* isolates. *Acta Hort.* **377,** 149-157.

Le Romancer, N., Kerkan, C. y Nedellec, M. (1994). Biological characterization of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology* **4**, 138-144.

Lehto, K., y Dawson, W.O. (1990). Replication, stability, and gene expression of tobacco mosaic virus mutants with a second 30K ORF. *Virology* **175,** 30-40.

Lehto, K., Grantham, G. L. y Dawson, W. O. (1990). Insertion of sequences containing the coat protein subgenomic RNA promoter and leader in front of the *Tobacco mosaic virus* 30K ORF delays its expression and causes defective cell-to-cell movement. *Virology* **174**, 145-157.

Lei, J.D. y Agrios, G.N. (1986). Mechanisms of resistance in corn to *Maize dwarf mosaic virus*. *Phytopathology* **76,** 1034-1040.

Leisner, S.M. y Turgeon, R. (1993). Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *Bioessays* **15**, 741-748.

Leisner, S.M., Turgeon, R. y Howell, S.H. (1992). Long-distance movement of *Cauliflower mosaic virus* in infected turnip plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 41-47.

Leisner, S.M., Turgeon, R. y Howell, S.H. (1993) Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of *Cauliflower mosaic virus* in Arabidopsis. *Plant Cell* **5**, 191-202.

Li, Q. y Palukaitis, P. (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of *Cucumber mosaic virus cucumovirus* and *Tobacco mosaic tobamovirus*. *Virology* **216,** 71-79.

Li, W., Qu, F. y Morris, T. J. (1998). Cell-to-cell movement of *Turnip crinkle virus* is controlled by two small open reading frames that function in trans. *Virology* **244**, 405-416.

Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. y Dougherty, W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5,** 1749-1759.

Linstead, P.J., Hills, G.J., Plaskitt, K.A., Wilson, I.G., Harker, C.L. y Maule, A.J. (1988). The subcellular localization of the gene I product of *Cauliflower mosaic virus* is consistent with a function associated with virus spread. *J. Gen. Virol.* **69,** 1809-1818.

Llamas-Llamas, M.E., Zavaleta,-Mejia, B., Gonzalez-Hernandez, V.A., Cervantes-Díaz, L., Santizo-Rincon, J.A. y Ochoa-Martinez, D.L. (1998). Effect of temperature

on symptom expression and accumulation of tomato spotted wilt virus in different host species. *Plant Pathol.* **47,** 341-347.

Lommel, S.A., McCain, A.H. y Morris, T.J. (1982). Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopath.* **72,** 1018.

Lucas, W.J. (1995). Plasmodesmata: intracellular channels for macromolecular transport in plants. *Cur. Op. Cell Biol.* **7,** 673-680.

Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. y Hake, S. (1995). Selective trafficking of knotted 1 homeodomain protein and its mRNA through plant plasmodesmata. *Science* **270,** 1980-1983.

Lucas, W.J., Ding, B. y van der Schoot, C. (1993a). Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125,** 435-476.

Lucas, W.J. y Gilbertson, R.L. (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**, 387-411.

Lucas, W.J. y Madore, M.A. (1988). Recent advances in sugar transport. En: "*The Biochemistry of Plants*". Ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E. Academic Press, New York. pp. 35-84.

Lucas, W.J., Olezinski, A., Hull, R.J., Haudenshield, J., Deom, C.M., Beachy, R.N. y Wolf, S. (1993b). Influence of the *Tobacco mosaic virus* 30-Kda movement proteinon carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* **190,** 88-96.

Lucas, W.J. y Wolf, S. (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Cur. Op. Plant Biol.* **2**, 192-197.

Lucas, W.J., Wolf, S., Deom, C.M., Kishmore, G.M. y Beachy, R.N. (1990). Plasmodesmata-virus interaction. En: "*Parallels in cell-to-cell junctions in plants and animals*". Ed. Robards, A.W.; Jongsma, H., Lucas, W.J., Pitts, J. y Spray, D. Springer-Verlag, Berlin. pp. 261-274.

Lucy, A.P., Boulton, M.I., Davies, J.W. y Maule, A.J. (1996). Tissue specificity of Zea mays infection by maize streak virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 22-31.

Maia, E., Beck, D. y Gagelli, D. (1969). Obtention de clones d'oillet méditerranées indemnes de virus. *Ann. Phytopathol.* **1,** 311-319.

Makkouk, K.M., Koenig, R. y Lesemann, D.E. (1981). Characterization of a tombusvirus isolated from eggplant. *Phytopathology* **71,** 572.

Makkouk, K.M., y Shahab, S. (1980). Identification, properties and incidence of *Carnation mottle virus* on carnations in Lebanon. *Z. Pflanzenkrankheit Pflanzenschutz* **87,** 557.

Marcos, J.F., Vilar, M., Perez-Payá, E. y Pallás, V. (1999). In vivo detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the putative movement protein from *Carnation mottle carmovirus* (CarMV). *Virology* **255**, 354-365

Martelli, G.P. (1981). Tombusviruses. En: "*Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*". Elsevier, Amsterdam. Editado por Kurstak, E. pp. 61-90.

Martelli, G.P. (1991). En: "*Classification and Nomenclature of Viruses*". *Fifth Report of the International Comitte on Taxonomy of Viruses* Springer-Verlag, Vienna.

Editado por Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L y Brown, F. *Arch. Virol.* Suple. **2,** pp. 332-335.

Martelli, G.P. (1994). En. "*Epidemiology and Management of Plant Virus Diseases*". Ed. L. V. Madden, B. Raccah y J.M. Thresh. Springer-Verlag, Berlin.

Martelli, G.P. y Russo, M. (1994). En: "*Classification and Nomenclature of Viruses*". *Fifth Report of the International Comitte on Taxonomy of Viruses.* Ed. Fauquet, C.M.; Murphy,. Bishop, D.H.L.; Summers, M.D; Martelli, G.P.; Ghabrial, S.A. y Jarvis. A.W. Springer-Verlag, Vienna. *Arch. Virol.* Suple.

Martelli, G.P., Russo, M. y Quacquarelli, A. (1977). *Tombusvirus* (*Tomato bushy stunt virus*) Group. En: "*Atlas of Insect and Plant Viruses*". Ed. Maramorosch, K. Academic press, New York. pp. 257.

Más, P. y Beachy, R.N. (2000). Role of microtubules in the intracellular distribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 12345-12349.

Más, P. y Pallás, V. (1995). Non-isotopic tissue-printing hybridisation: a new technique to study long-distance plant virus movement. *J. Virol. Methods* **52,** 317-326.

Más, P. y Pallás, V. (1996). Long-distance movement of *Cherry leaf roll virus* in infected tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **77**, 531-540.

Más, P., Sánchez-Navarro, J.A., Sánchez-Pina, M.A. y Pallás V. (1993). Chemiluminiscent and colorigenic detection of *Cherry leaf roll virus* with digoxigenin-labelled RNA probes. *J. Virol. Methods* **45,** 93-102.

Más, P., Sánchez-Pina, M. A., Balsalobre, J. M. y Pallás, V. (2000). Subcellular localisation of *Cherry leaf roll virus* coat protein and genomic RNAs in tobacco leaves. *Plant Sci.*, **153**, 113-124.

Matthews, R.E.F. (1991). IV. Induction of disease. C. Enviromental factors. En: "*Plant Virology*". Ed. Academic Press. San Diego. pp. 460-464

Maule, A.J. (1991). Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**, 457-473.

Maule, A.J. (1999). Virus and host plant interactions. Embryonic ELS.

Maule, A.J., Harker, C.L. y Wilson, I.G. (1989). The pattern of accumulation of *Cauliflower mosaic virus*-specific products in infected turnips. *Virology*, **169**, 436-446.

Maule, A. J. y Wang, D. (1996). Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends Microbiol.* **4**, 153-158.

Mayo, M.A. y Martelli, G.P. (1993). Group *Carmovirus*. En: "*Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses. I.C.T.V.*". Ed. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarcis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. y Summers M.O. Springer-Verlag. New York-Vienna. pp. 303-305.

Mayo, M.A. y Pringle, C.R. (1998). Virus taxonomy: 1997. *J. Gen. Virol.* **79,** 649-657.

McCauley, M.M. y Evert, R.F. (1988a). Morphology and vasculature of the leaf of potato (*Solanum tuberosum*). *Am. J. Bot.* **75**, 377-390.

McCauley, M.M. y Evert, R.F. (1988b). The anatomy of the leaf of potato, *Solanum tuberosum* L. "Russet Burbank". *Bot. Gaz.* **149**, 179-195.

McCauley, M.M. y Evert, R.F. (1989). Minor veins of the potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf: ultrastructure and plasmodesmatal frequency. *Bot. Gaz.* **150,** 351-368.

McLean, M.A., Hamilton, R.I. y Rochon, D.M. (1993). Symptomatology and movement of a *Cucumber necrosis virus* mutant lacking the coat protein protruding domain. *Virology* **193,** 932-939.

McLean, B.G., Waigman, E., Citovsky, V. y Zambryski, P.C. (1995). Cell-to-cell movement of plant viruses. *Trends Microbiol.* **1,** 105-109.

McMaster, G.K. y Carmichel, G.G. (1977). Analysis of single-and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4835-4838.

Melcher, U. (1989). Symptoms of *Cauliflower mosaic virus* infection in *Arabidopsis thaliana* and turnip. *Bot. Gaz.* **150**, 139-147.

Melcher, U. (1990). Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **71,** 1009-1018.

Meshi, T., Motoyoshi, F. Maeda, T. Yashiwoka, S. Watanabe, H. y Okada, Y. (1989). Mutations in the *Tobacco mosaic virus* 30-kDa protein gene overcome TM-2 resistance in tomato. *Plant Cell* **1,** 512-522.

Meulewaeter, F., Cornelissen, M. y van Emmelo, J. (1992). Subgenomic RNAs mediate expression of cistrons located internally on the genomic RNA of *Tobacco necrosis virus* strain A. *J. Gen. Virol.* **66**, 6419-6428.

Mezitt, L.A. y Lucas, W.J. (1996). Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biol.* **32,** 251-273.

Miller, W. A., Dreher, T. W. y Hall, T. C. (1985). Synthesis of *Brome mosaic virus* subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation on (-) sense genomic RNA. *Nature* **313**, 68-70.

Miller, W. A. y Koev, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**, 1-8.

Mise, K., Allison, R.F., Janda, M. y Ahlquist, P. (1993). *Bromovirus* movement protein genes play a crucial role in host specificity. *J. Virol.* **67,** 2815-2823.

Morgunova, E. Yu, Dauter, Z., Fry, E., Stuart, D.I., Stelmachuk, V.Ya., Mikhailov, A.M., Wilson, K.S. y Vainshtein, B.K. (1994). The atomic structure of *Carnation mottle virus* capsid protein. *FEBS Letters* **338,** 267-271.

Morris, T.J. (1991). En: "*Classification and Nomenclature of Viruses*". *Fifth Report of the International Comitte on Taxonomy of Viruses*. Ed. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. y Brown, F. Springer-Verlag, Vienna. *Arch. Virol.* Suple. **2**, pp. 303-305.

Morris, T.J. y Carrington, J.C. (1988). *Carnation mottle virus* and viruses with similar properties. En: "*The Plant Viruses*". **Vol. 3**. *Polyhedral virions with monopartite RNA genomes*. Plenum Press, New York, NY. Editado por Koenig, R. pp. 73-112.

Morris-Krsinich, B.A.M. y Milne, K.S. (1977). Natural infection of daphne by *Carnation mottle virus*. *Plant Dis. Rep.* **61,** 675.

Moser, O., Gagey, M. J., Godegroy-Colburn, T., Stussi-Garaud, C., Ellwart-Tschürzt, M., Nitschko, H. y Mundry, K. W. (1988). The fate of the transport protein of *Tobacco mosaic virus* in systemic and hypersensitive tobacco host. *J. Gen. Virol.* **69**, 1367-1373.

Mowat, W.P., Asjes, C.J. y Brunt, A.A. (1976). *Narcissus tip necrosis virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* **No. 166**.

Murillo, I., Cavallarin, L. y San Segundo, B. (1997). The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* **9,** 145-156.

Myers, L.D., Sherwood, J.L., Siegerist, W.C. y Hunger, R.M. (1993). Temperature-influenced virus movement in expression of resistance to soilborne *Wheat mosaic virus* in hard red winter wheat (*Triticum aestivum*). *Phytopathology* **83**, 548-551.

Nakamura, S., Hayashi, H., Mori, S. y Chino, M. (1993). Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Physiol*. **34,** 927-933.

Nakano, M., Hoshino, Y. y Mii, M. (1994). Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **36,** 15-19.

Nelson R.S., Li, G., Hodgson, R.A.J., Beachy, R.N. y Shintaku, M.H. (1993). Impeded phloem-dependent accumulation of the masked strain of *Tobacco mosaic virus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6,** 45-54.

Nelson R.S. y van Bel, A.J.E. (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progress in Botany* **59**, 476-533.

Nguyen, L., Lucas, W.J., Ding, B. y Zaitlin, M. (1996). Viral RNA trafficking is inhibited in replicase-mediated resistant transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12643-12647.

Nono-Womdim, R., Marchoux, G., Pochard, E., Palloix, A. y Gebre-Selassie, K. (1991). Resistance of pepper clones to the movement of *Cucumber mosaic virus*. *J. Phytophatol.* **132,** 21-32.

Noueiry, A.O., Lucas, W.J. y Gilbertson, R.L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76,** 925-932.

Olesinski, A.A., Lucas, W.J., Galun, E. y Wolf, S. (1995). Pleiotropic effect of *Tobacco mosaic virus* movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. *Planta* **197,** 118-126.

Oparka, K.J. y Prior, D.A.M. (1992). Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *Plant J.* **2,** 741-750.

Oparka, K.J., Prior, D.A. M, Santa-Cruz, S., Padgett, H.S. y Beachy, R.N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of *Tobacco mosaic virus* (TMV). *Plant J.* **12,** 781-789.

Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa-Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. y Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**, 743-754.

Oparka, K.J., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A.M. y Santa-Cruz, S. (1996). Viral coat protein is targetted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of *Potato virus X*. *Plant J.* **10,** 805-813.

Oparka, K.J. y Santa Cruz, S. (2000). The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51,** 323-347.

Oparka, K.J. y Turgeon, R. (1999). Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-750.

Osman, T.A.M. y Buck, K.M. (1991). Detection of the movement protein of *Red clover necrotic mosaic virus* in a cell wall fraction from infected *Nicotiana clevelandii* plants. *J. Gen. Virol.* **72**, 2853-2856.

Osman, T.A.M., Hayes, R.J. y Buck, K.W. (1992). Cooperative binding of the *Red clover necrotic mosaic virus* movement protein to single-stranded nucleic acids. *J. Gen. Virol.* **73,** 223-227.

Owens, A., Blackburn, M. y Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plan- Microbe Interact*. (en prensa).

Oxelfelt, P. (1975). Development of systemic *Tobacco mosaic virus* infection. IV. Synthesis of viral RNA and intact virus and systemic movement of two strains as influenced by temperature. *Phytopathol. Z.* **83,** 66-76.

Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. y Vaucheret, H. (1997). Systemic acquiered silencing: Transgene-specific post-transcriptional is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16,** 4738-4745.

Pallás, V., Más, P. y Sánchez-Navarro, J. A. (1998). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridisation. En: *"Methods in Molecular Biology"*. Vol. **81:** Plant Virology Protocols: From virus isolation to transgenic resistance. Ed. Foster G.D. y Taylor. S.C. Humana Press Inc. Totowa, NJ. pp 461-468.

Pallás, V., Rowhani, A., Daubert, S. y Bruening, G (1992). Properties and translation studies of *Cherry leaf roll virus* (CLRV). Acta Horticulturae **309**, 45-53.

Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A., Cañizares, M.C. y Cano, E. M. (1999). A new test of detection of carnation viruses. The routine of viruses affecting carnation crop comes into a new era. *Floraculture International* **9**, 32-34.

Paludan, N. (1964). Inaktiveringsforsog med virus-inficeret nellikemateriale. *Maanedoversigt PlSygd*. **412,** 83-88.

Paludan, N. (1965). Inaktiveringsforsog med nellike-spaetning virus. *Maanedoversigt PlSygd*. **418,** 65-68.

Patrick, J.W. (1991). Control of phloem transport to and short-distance transfer in sink regions: an overview. En: *"Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation"*. Ed. Bonnemain, J.L., Delrot, S., Lucas, W.J. y Dainty, J. Quest Editions, Nanates, France. pp. 167-177.

Perbal, M. C., Haughn, G., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z. (1996). Non-cell autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* **122,** 3433-3441.

Perbal, M.C., Thomas, C.L. y Maule, A.J. (1993). *Cauliflower mosaic virus* gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* **195,** 281-285.

Peterson, C.A. y Currier, H.B. 1969. An investigation of bidirectional translocation in the phloem. *Physiol. Plant* **22**, 1238-1250.

Plese, N. y Stefanac, Z. (1980). Some properties of a distinctive isometric virus from pelargonium. *Acta Hortic*. **110,** 183-188.

Poethig, R.S. (1997). Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell* **9**, 1077-1087.

Pringle, C.R. (1998). The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Arch. Virol.* **143**, 203-210.

Qiu, S. G. y Schoelz, J. E. (1992). Three regions of *Cauliflower mosaic virus* strain w260 are involved in systemic infection of Solanaceous hosts. *Virology* **190**, 773-782.

Qu, F. y Morris, T.J. (1997). **Encapsidation of *Turnip crinkle virus* is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J. Virol.* 71, 1428-1435.**

Qu, F. y Morris, R.J. (2000). **Cap-independent translational enhancement of *Turnip crinkle virus* genomic and subgenomic RNAs. *J. Virol.* 74, 1085-1093.**

Ratcliff, F., Harrison, B.D. y Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science* **276,** 1558-1560.

Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. y Baulcombe, D.C. (1999). **Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell* 11, 1207-1215.**

Ritzenthaler, C., Pinck, M. y Pinck, L. (1995a). *Grapevine fanleaf nepovirus* P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product *in vivo*. *J. Gen. Virol*. **76**, 907-915.

Ritzenthaler, C, Schmit, A.C., Michler, P., Stussi-Garaud, C. y Pinck L (1995b). *Grapevine fanleaf nepovirus* P38 putative movement protein is located on tubules *in vivo*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8,** 379-387.

Riviere, C.J., Pot, J., Tremaine, J.H. y Rochon, D.M. (1989). Coat protein of *Melon necrotic spot carmovirus* is more similar to those of tombusviruses than those of carmoviruses. *J. Gen. Virol.* **70,** 3033-3042.

Riviere, C. y Rochon, D.M. (1990). Nucleotide sequence and genomic organization of *Melon necrotic spot virus J. Gen. Virol.* **71,** 1887-1896.

Robards, A.W. y Lucas, W.J. (1990). Plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41,** 369-419.

Roberts, A.G., Santa-Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R. y Oparka, K.J. (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* **9,** 1381-1396.

Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. y Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the cylindrical inclusions (Cls) show that the Cl protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173-181.

Robleda, S.C. (1973). Ultrastructure of cells infected with *Carnation mottle virus*. *Phytopathol. Z.* **78**, 134-140.

Rodriguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonosoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M. y Risco, C. (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236,** 296-306.

Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component proteinase function as *Potyvirus* cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237,** 283-295.

Rouleau, M., Smith, R.J., Bancroft, J.B. y Mackie, G.A. (1994). Purification, properties and subcellular localization of *Foxtail mosaic potexvirus* 26 kDa protein. *Virology* **204**, 254-265.

Rouleau, M., Smith, R.J., Bancroft, J.B. y Mackie, G.A. (1995). Subcellular immunolocalization of the coat protein of two *Potexvirus* in infected *Chenopodium quinoa*. *Virology* **214,** 314-318.

Ruiz, M.T., Voinnet, O. y Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10,** 937-946.

Ruiz-Medrano, R., Xonocostle-Cazares, B. y Lucas, W.J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-4419.

Russo, M., Burgyan, J. y Martelli, G. (1994). Molecular biology of *Tombusviridae*. *Adv. Virus Res.* **44**, 381-428.

Russo, M., Di Franco, A. y Martelli, G.P. (1983). The fine structure of *Cymbidium ringspot virus* infections in host tissues. III. Role of peroxisomes in the genesis of multivesicular bodies. *J. Ultrastruct. Res.* **82,** 52.

Russo, M. y Martelli, G.P. (1972). Ultrastructural observations on *Tomato bushy stunt* virus in plant cells. *Virology* **49,** 122.

Russo, M. y Martelli, G.P. (1982). Ultrastructure of *Turnip crinkle* and *Saguaro cactus virus*-infected tissues. *Virology* **118,** 109.

Ryabov E.V.; Robinson, D.J. y Taliansky, M. (1999). A plant virus encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96,** 1212-1217.

Saito, T., Yamanaka, K. y Okada, Y. (1990). Long-distance movement and viral assembly of *Tobacco mosaic virus* mutants. *Virology* **176,** 329-336.

Sakuth,T., Schobert, C., Pecsvaradi, A., Eichholz, A., y Komor E. (1993). Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization, and *in vivo* labelling. *Planta* **191,** 207-213.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). En: *"Molecular cloning: a laboratory manual"*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samuel, G. (1934). The movement of *Tobacco mosaic virus* within the plant. *Ann. Appl. Biol.* **21,** 90-111.

Sánchez-Navarro, J.A., Cano, E.A. y Pallás, V. (1996). Non-radioactive molecular hybridisation detection of *Carnation mottle virus* in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant Pathology* **45**, 375-382

Sánchez-Navarro, J.A., Cañizares, M.C., Cano, E.A. y Pallás, V. (1999). Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J. Virol. Methods* **82,** 167-175.

Sánchez-Pina, M.A., Más, P. y Pallás, V. (2000). Intracellular localisation of coat protein and genomic RNAs of *Cherry leaf roll virus* and its involvement to viral movement and replication. *J Pytopathol*. (enviado).

Sanger, M., Passmore, B., Falk, B.W., Bruening, G., Ding, B. y Lucas, W.J. (1994). Severity of *Beet western yellow virus* strain ST9 is conferred by the ST9-associated RNA and is not associated with release of the infection from the phloem. *Virology* **200,** 48-55.

Santa Cruz, S., Roberts, A.G., Prior, D.A.M., Chapman, S. y Oparka, K.J. (1998). Cell-to-cell and phloem mediated transport of *Potato virus X*: the role of virions. *Plant Cell* **10,** 495-510.

Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H. y Fujiwara, T. (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol*. **39,** 895-897.

Schaad, M.C. y Carrington, J.C. (1996). Suppression of long-distance movement of *Tobacco etch virus* in a nonsuceptible host. *J. Virol*. **70,** 2556-2561.

Schiefelbein, J.W., Masucci, J.D. y Wang, H. (1997). Building a root: the control of pattering and morphogenesis during root development. *Plant Cell* **9**, 1089-1098.

Schmalsting, J.G. y Geiger, D.R. (1985). Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. I. Evidence for pathway through the symplast. *Plant Physiol*. **79,** 237-241.

Schmalsting, J.G. y Geiger, D.R. (1987). Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. II. Termination of phloem unloading. *Plant Physiol*. **83**, 49-52.

Schneider, I.R. (1965). Introduction, translocation, and distribution of viruses in plants. *Adv. Virus Res.* **11,** 163-221.

Schobert, C., Großmann, P., Gottschalk, M., Komor, E. y Pecsvaradi, A (1995). Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* **196,** 205-210.

Schoumacher, F., Erny, C., Berna, A., Godefroy-Colburn, T. y Stussi-Garaud, C. (1992). Nucleic acid binding properties of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein produced in yeast. *Virology* **188,** 896-899.

Schoumacher, F., Giovane, C., Maira, M., Poirson, A., Godefroy-Colburn, T. y Berna, A. (1994). Mapping of the RNA binding domain of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein. *J. Gen. Virol.* **75,** 3199-3202.

Scott, H.A. y Hoy, J.W. (1981). *Blackgram mottle virus*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. **237**.

Séron, K. y Haenni, A.L. (1996). Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **9,** 435-442.

Shanks, M., Tomenius, K., Clapham, D., Huskisson, N.S., Barker, P.J., Wilson, I.G., Maule, A.J. y Lomonossof, G.P. (1989). Identification and subcellular localization of a putative cell-to-cell transport protein from *Red clover mottle virus*. *Virology* **173**, 400-407.

Shepardson, S., Essau, K. y McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with *Potato leafroll virus*. *Virology* **105,** 379-392.

Simón Buela, L. y Garcia-Arenal, F. (1999). Virus particles of *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12,** 112-118.

Singh, R y Singh, A. (1989). *Aphis gossypii* glover, an insectvector of *Carnation* (*Dianthus caryophyllus* L.) *mottle virus*, a new record. *Current Science*, **58**, 916-936.

Sit, T.L. y AbouHaidir, M.G. (1993). Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of *Papaya mosaic virus*. Effect of mutations to the capsid and polymerase proteins. *J. Gen. Virol.* **74,** 1133-1140.

Sit, T.L., Vaewhongs, A.A., y Lommel, S.A. (1998). RNA-mediated transactivation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**, 829-832.

Sjolund, R.D. y Shih, C.Y. (1983). Freeze-fracture analysis of phloem structure in plant tissue cultures. I. The sieve element reticulum. *J. Ultrastruct. Res.* **82,** 111-121.

Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M., Torronen, M., Burnt, A.A. y Gibbs, A.J. (1993). The genomic sequence of *Cardamine chlorotic fleck carmovirus*. *J. Gen. Virol.* **74**, 1933-1937.

Smookler, M. y Loebenstein, G. (1975). Viruses of carnation identified in Israel. *Phytopath. Medit.* **14,** 1.

Soler, S., Díez, M.J. y Nuez, F. (1998). Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Dis.* **82,** 1199-1204.

Song, C. y Simon, A.E. (1995). Requirement of a 3′-terminal stem-loop in *in vitro* transcription by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **254,** 6-14.

Song, Y.R., Ye, Z.H. y Varner, J.E. (1993). Tissue-printing hybridization on membrane for localization of mRNA in plant tissue. *Meth. Enzymol.* **218,** 671-681.

Sorger, P.K., Stockley, P.G. y Harrison, S.C. (1986). Structure of *Turnip crinkle virus*. II. Mechanism of *in vitro* assembly. *J. Mol. Biol.* **191,** 639.

Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rotteir, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B.A.M. y Siddell, S.G. (1983). *Coronavirus* mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J.* **2**, 1839-1844:

Spurr, A.R. (1969). A low viscosisty epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultr. Res.* **26,**31-43.

Stefanac, Z., Plese, N. y Wrischer, M. (1982). Intracellular changes provoked by *Pelargonium line pattern virus*. *Phytopathol. Z.* **105,** 288.

Stone, O. M. (1980). Nine virus isolated from Pelargonium in the United Kingdom. *Acta Hortic.* **110,** 177.

Stone, O.M. y Hollings, M. (1973). Some properties of *Pelargonium flower-break virus*. *Ann. Appl, Biol.* **75**, 15-23.

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

Stupina, V. y Simon, A.E. (1997). Analisis *in vivo* of *Turnip crinkle virus* satellite RNA C variants with mutations in the 3′-terminal minus-strand promoter. *Virology* **238,** 470-477.

Sudarshana, M.R., Wang, H.L., Lucas, W.J. y Gilbertson, R.L. (1998). Dynamics of *Bean dwarf mosaic geminivirus* cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *MPMI* **11**, 277-291.

Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N. y Takanami, Y. (1991). Functional analysis of deletion mutants of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 using an *in vitro* transcription system. *Virology* **183,** 106-113.

Széczi, J., Ding, X.S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., Nelson, R.S. y Beachy, R.N. (1999). Development of *Tobacco mosaic virus* infection sites in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12,** 143-152.

Takemoto, Y., Kanehira, T., Yamashita, S. y Hibi, T. (2000). The nucleotide sequence and genome organization of *Japanese iris necrotic ring virus,* a new species in the genus Carmovirus. *Arch. Virol*. **145,** 651-657.

Taliansky, M.E. y García-Arenal, F. (1995). Role of *Cucumovirus* capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J. Gen. Virol*. **69,** 916-922.

Taliansky, M.E., Malyshenko, S.I., Pshennikova, E.S. y Atabekov, J.G. (1982). Plant virus-specific transport function. II. A factor controlling virus host range. *Virology* **122**, 327-331.

Tanzer, M.M., Thompson, W.F., Law, M.D., Wernsman, E.A. y Uknes, S. (1997). Characterization of post-transcriptionally suppressed transgene expression that

confers resistance to *Tobacco etch virus* infection in tobacco. *Plant Cell* **9,** 1411-1423.

Tavazza, M., Lucioli, A., Calogero, A., Pay, A. y Tavazza, R. (1994). Nucleotide sequence, genomic organization and synthesis of infectious transcripts from a full-length clone of *Artichoke mottle crinkle virus*. *J. Gen. Virol*. **75,** 1515-1524.

Tecsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. y Leegod, R.C. (1994). Complex, localized changes in CO_2 assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between *Cucumber mosaic virus* and a cucurbit host. *Plant J.* **5,** 837-847.

Tecsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. y Leegod, R.C. (1996). A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with *Cucumber mosaic virus*. *Plant Physiol.* **111,** 975-985.

Tecsi, L.I., Smith, A.M., Maule, A.J. y Leegod, R.C. (1995). Relationships between viral infection and carbohydrate accumulation and metabolism. En: *"Carbon partitioning and source-sink interactions in plants"*. Ed. Mador, M.A. y Lucas, W.J. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. pp. 130-140.

Terry, B.R. y Robards, A.W. (1987). Hydrodinamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* **171,** 145-157.

Thompson, G.A. y Schulz, A. (1999). Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends. Plant. Sci.* **4,** 354-361.

Thompson, J.R. y Garcia-Arenal, F. (1998). The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by *Tomato aspermy virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11,** 109-114.

Thorne, J.A. (1986). Sieve tube unloading. En: "*Phloem transport*". Ed. Cronshaw. J., Lucas W.J. y Giaquinta R.T. A.R. Liss New York. pp.211-224.

Tomenius, K., Clapham, D. y Meshi, T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-encoded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with *Tobacco mosaic virus*. *Virology* **160,** 363-371.

Tucker, E.B. (1982). Translocation in the staminal hairs of Setcreasea purpurea. I. Study of cell ultrastructure and cell-to-cell passage of molecular probes. *Protoplasma* **113**, 193-201.

Turgeon, R. (1986). The import-export transition in dicotyledonous leaves. En: "*Plant Biology*". Vol. 1: Phloem transport. Ed. Cronshaw, J., Lucas, W.J. y Giaquinta, R.T. A.R. Liss New York. pp. 285-291.

Turgeon, R. (1987). Phloem unloading in tobacco sink leaves: Insensitivity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta* **171,** 73-81.

Turgeon, R. (1989). The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40,** 119-138.

Turgeon, R. (1996). Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* **1,** 418-423.

Turgeon, R. y Beebe, D.U. (1991). The evidence for symplastic phloem loading. *Plant Physiol.* **96,** 349-354.

Turgeon, R., Beebe, D.U. y Gowan, E. (1993). The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the *Scrophulariaceae*. *Planta* **191,** 446-456.

Turgeon, R. y Hepler, P.K. (1989). Symplastic continuity between mesophyll and companion cells in minor veins of mature *Cucurbita pepo* L. leaves. *Planta* **179,** 24-31.

Turgeon, R. y Webb, J.A. (1973). Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo:* transition from import to export. *Planta* **113,** 179-191.

Turgeon, R. y Webb, J.A. (1976). Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*. Maturation of the minor veins. *Planta* **129,** 265-269.

Urban, L.A., Ramsdell, D.C., Klomparens, K.L., Lynch, T. y Hanckock, J.F. (1989). Detection of *Blueberry shoestring virus* in xylem and phloem tissues of highbush blueberry. *Phytopathology* **79,** 488-493.

Van Bel, A.J.E. (1993). Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44,** 253-281.

Van Bel, A.J.E. y Kempers, R. (1997). The pore/plasmodesma unit: key element in the interplay between sieve element and companion cell. *Prog. Bot.* **58,** 278-291.

Van den Heuvel, J.F.J.M., de Blank, C.M., Peters, D. y van Lent, J.W.M. (1995). Localization of *Potato leafroll virus* in leaves of secondarily-infected potato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **101,** 567-571.

Van der Kuyl, A.C., Langereis, K., Houwing, C.J., Jaspars, E.M.J., y Bol, J.F. (1990). Cis-acting elements involved in replication of *Alfalfa mosaic virus* RNAs *in vitro*. *Virology* **176,** 346-354.

Van der Kuyl, A.C., Neeleman, L. y Bol, J.F. (1991a). Deletion analysis of *cys* and *trans* acting elements involved in the replication of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 *in vivo*. *Virology* **183,** 687-694.

Van der Kuyl, A.C., Neeleman, L. y Bol, J.F. (1991b). Role of *Alfalfa mosaic virus* coat protein in regulation of the balance between viral plus and minus strand RNA synthesis. *Virology* **185**, 496-499.

Van der Vossen, E.A.G., Neeleman, L. y Bol, J.F. (1994). Early and late functions of *Alfalfa mosaic virus* coat protein can be mutated separately. *Virology* **202,** 891-903.

Van Lent, J.V.M., Storms, M.M.H., van der Meer, F., Wellink, J y Goldbach, R.W. (1991). Tubular structures involved in movement of *Cowpea mosaic virus* are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72,** 2615-2623.

Van Lent, J.V.M., Wellink, J y Goldbach, R.W. (1990). Evidence for the involvement of the 58 K and 48 K proteins in the intercellular movement of *Cowpea mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* **71,** 219-233.

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., McGeoch, D.J., Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R. y Wickner, R.B (2000). Family Tombusviridae. En: "Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh ICTV report". Ed. *Academic prensa*. pp. 791-825.

Vaquero, C., Sanz, A.I., Serra, M.T. y García-Luque, I. (1996). Accumulation kinetics of CMV RNA 3-encoded proteins and subcellular localization of the 3a protein in infected and transgenic tobacco plants. *Arch. Virol.* **141**, 987-999.

Verwoed, T.C., Dekker, B.M.M. y Hoekema, A. 1989. A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Acids Res*. **17**, 2362.

Vilar, M., Esteve, V., Pallás, V., Marcos, J.F. y Pérez-Payá, E. (2001). Structural properties of *Carnation mottle* virus p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J. Biol. Chem*. **276,** 18122-18129.

Voinnet, O. y Baulcombe, D.C. (1997). Systemic signaling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.

Waigmann, E., Lucas, W., Citovsky, V. y Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **91,** 1433-1437.

Waigmann, E. y Zambryski, P. (1995). *Tobacco mosaic virus* movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* **7,** 2069-2079.

Walkey, D.G.A. y Webb, M.J.W. (1968). Virus in plant apical meristems. *J. Gen. Virol*. **3**, 311-313.

Wang, D. y Maule, A.J. (1994). A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analysis of pea embryo invasion by *pea seed-borne mosaic virus*. *Plant Cell* **6**, 777-787.

Wang, D. y Maule, A.J. (1995). Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science*, **267**, 229-231.

Wang, D. y Maule, A.J. (1997). Contrasting patterns in the spread of two seed-borne viruses in pea embryos. *Plant J*. **11**, 1333-1340.

Wang, H.L., Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J. (1996). Spatial and temporal distribution of *Bean dwarf mosaic geminivirus* in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology* **86**, 1204-1214.

Wang, H.L., Wang, Y., Giesman-Cookmeyer, D., Lommel, S.A. y Lucas, W.J. (1998). Mutations in viral movement protein alter systemic infection and identify an intercellular barrier to entry into the phloem long-distance transport system. *Virology* **245**, 75-89.

Wang, J. y Simon, A. (1997). Analysis of the two subgenomic RNA promoters for *Turnip crinckle virus in vivo* and *in vitro*. *Virology* **232**, 174-186.

Watanabe, Y., Emori, Y., Ooshika, I., Meshi, T., Ohno, T. y Okada, Y. (1984). Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: transient expression of the 30K protein and its mRNA. *Virology* **133**, 18-24.

Waterworth, H.E. (1980). *Hibiscus chlorotic ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* No. **227**.

Waterworth, H.E. (1981). *Bean mild msaic virus. CMI/AAB Descriptions Plant Viruses.* No. **231**.

Waterworth, H.E. y Kaper, J.M. (1972). Purification and properties of *Carnation mottle virus* and its ribonucleic acids. *Phytopathology* **62,** 959-964.

Weber, H., Schultze, S. y Pfitzner, A.J.P. (1993). Two aminoacid substitutions in the *Tomato mosaic virus* 30-Kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2^2 resistance gene in tomato. *J. Virol.* **67,** 6432-6438.

Wei, N., Hacker, D.L. y Morris, T.J. (1992). Characterization of an internal element in TCV RNA involved in both coat protein binding and replication. *Virology* **190,** 346-355.

Wei, N., Heaton, L.A., Morris, T.J. y Harrison, S.C. (1990). Structure and assembly of *Turnip crinkle virus* VI. Identification of coat protein binding sites on the RNA. *J. Mol. Biol.* **214,** 85-95.

Wellink, J., Jaegle, M., Prinz, H., van Kammen, A. y Goldbach, R. (1987). Expression of the middle component RNA of *Cowpea mosaic virus in vivo*. *J. Gen. Virol.* **68,** 2577-2585.

Wellink, J. y van Kammen, A. (1989). Cell-to-cell transport of *Cowpea mosaic virus* requieres both the 58K/48K proteins and the capsid protein. *J. Gen. Virol.* **70,** 2279-2286.

Wellink, J., van Lent, J.V.M., Verver, J., Sijen, T., Goldbach, R.W. y van Kammen, A. (1993). The *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded 48 KDa protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. *J. Virol.* **67,** 3660-3664.

Weng, Z. y Xiong, Z. (1997). Genome organization and gene expression of *Saguaro cactus carmovirus*. *J. Gen. Virol.* **78,** 525-534.

White, B.A. y Bancroft, F.C. (1982). Cytoplasmic dot hybridization. *J. Biol. Chem.* **257,** 8569-8572.

White, K.A., Skuzeski, J.M., Li, W., Wei, N. y Morris, T.J. (1995). Immunodetection, expression strategy and complementation of *Turnip crinkle virus* p28 and p88 replication components. *Virology* **211,** 525-534.

Wieczorek, A. y Sanfaçon, H. (1993). Characterisation and subcellular localisation of *Tomato ringspot nepovirus* putative movement protein. *Virology* **194**, 734-742.

Wimmers, L.E. y Turgeon, R. (1991). Transfer cells and solute uptake in minor veins of *Pisum sativum*. *Planta* **186,** 2-12.

Wintermantel, W.M., Aderson, E.J. y Schoelz, J.E. (1993). Identification of domains within the gene VI of *Cauliflower mosaic virus* that influence systemic infection of *Nicotiana bigelovii* in a light-dependent manner. *Virology* **196,** 789-798.

Wintermantel, W.M., Banerjee, N., Oliver, J.C., Paolillo, D.J. y Zaitlin, M. (1997). *Cucumber mosaic virus* is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology* **231**, 248-257.

Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. y Lucas, W.J. (1989). Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmal size exclusion limit. *Science* **246,** 377-379.

Wolf, S. y Lucas, W.J. (1997). Plasmodesmatal-mediated plant communication network: implications for controlling carbon metabolism and resource allocation. En: *"Molecular approach to primary metabolism in plants"*. Ed. Foyer, C.H. y Quick, P. London, Taylor y Francis. pp. 219-236.

Xiong, Z., Kim, K.H., Giesman-Cookmeyer, D. y Lommel, S.A. (1993). The roles of the *Red clover necrotic mosaic virus* capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology* **192,** 27-32.

Xoconostle-Cazares, B., Xiang, Y., Ruíz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R. y Lucas, W.J. (1999). Plant paralog to viral

movement protein potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283,** 94-98.

Yarwood, C.E. (1957). Mechanical transmission of plant viruses. *Adv. Virus. Res.* **4,** 243-278.

Yi, L., Lesemann, D.E., Koening, R., Ruedel, M. y PfeilStetter, E. (1992). Isometric plant viruses in ditches and streams in agricultural areas: Recovery of previously found viruses and identification of hitherto unrecorded carmo and tombusviruses including grapevine Algerian latent virus. *J. Phytopathology (Berlin)* **134**, 121-132.

You, X.J., Kim, J.W., Stuart, G.W. y Bozarth, R.F. (1995). The nucleotide sequence of *Cowpea mottle virus* and its assignment to the genus Carmovirus. *J. Gen. Virol.* **76**, 2841-2845.

Zambryski, P. (1995). Plasmodesmata: plant channels for molecules on the move. *Science* **270,** 1943-1944.

Zandwort, R. (1973). The spread of *Carnation mottle virus* in carnations in glasshouses. *Neth. J. Plant Path.* **79,** 81.

Zhang, A.P., Yue, Y., Ye, R., Zhu, H.Q., Xu, L. y Yu, S.Q. (1999). Infectivity of full-length cDNA of *Carnation mottle virus*. Chin. Sci. Bull. (en prensa).

Zhang, X.M., Liao, C.L. y Lai, M.M.C. (1994). *Coronavirus* isader RNA regulates and initiates subgenomic mRNA transcription both *in trans* and *in cis*. *J. Virol.* **68**, 4738-4746.

Zhu, Y, Green, L., Woo, Y.M., Owens, R. y Ding, B. (2001). Cellular basis of *Potato spindle tuber viroid* systemic movement. *Virology* **279**, 69-77.