



Universidad Miguel Hernández



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura

El Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV): desarrollo de un vector viral y resistencia genética en tomate

TESIS DOCTORAL

RAQUEL NAVARRO SEMPERE

Ingeniera Agrónoma

2009



Universidad Miguel Hernández
Departamento de Tecnología Agroalimentaria



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura

El Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV): desarrollo de un vector viral y resistencia genética en tomate

Memoria presentada por:

Raquel Navarro Sempere

Para optar al grado de Doctora en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de
la Universidad Miguel Hernández

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Aranda Regules y
codirección de la Dra. Verónica Truniger Rietmann en el Departamento de
Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC)

La doctoranda:

Raquel Navarro Sempere

VºBº Director

VºBº Codirectora

Dr. Miguel Ángel Aranda Regules

Dra. Verónica Truniger Rietmann



Universidad Miguel Hernández
Departamento de Tecnología Agroalimentaria



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura

Don **Miguel A. Aranda Regules**, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura de Murcia.

Doña **Verónica Truniger Rietmann**, Doctora en Ciencias Biológicas, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura de Murcia.

CERTIFICAN: que Doña Raquel Navarro Sempere, Ingeniera Agrónoma por la Universidad Miguel Hernández, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con título "El Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV): desarrollo de un vector viral y resistencia genética en tomate", presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste y produzca los efectos oportunos donde proceda, firman le presente certificado en Murcia, 20 Mayo de 2009.

Dr. Miguel Ángel Aranda Regules

Dra. Verónica Truniger Rietmann

RESUMEN

RESUMEN

El Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV; género *Potexvirus*) es un virus de RNA de sentido positivo que causa importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate de Europa y América del Norte. En el presente trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda de fuentes de resistencia natural a PepMV mediante el escrutinio de germoplasma de especies afines al tomate pertenecientes al género *Solanum*. Este estudio ha puesto de manifiesto que las fuentes de resistencia a este virus son muy escasas. De todas las entradas de *Solanum* analizadas en este trabajo, no se encontró ningún caso de resistencia completa a PepMV. Tan sólo la entrada COM-2 perteneciente a la especie *S. corneliomuelleri* mostró una respuesta heterogénea a la infección por PepMV (aislado Sp13). Los resultados obtenidos tras el análisis de la descendencia obtenida a partir de esta entrada sugieren que en la entrada COM-2 existan varios genes con relativamente pequeños efectos aditivos sobre la resistencia a PepMV-Sp13, es decir, que se trate de una resistencia poligénica o cuantitativa.

Por otra parte, en el presente trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento de la biología molecular de PepMV para llevar a cabo el desarrollo de un vector viral de expresión derivado de este virus. Como paso previo y necesario, se ha obtenido un clon agroinfectivo de PepMV (aislado PepMV-Sp13), denominado pBPepXL6. Tras agroinfiltración, pBPepXL6 es capaz de reproducir la misma sintomatología que el virus parental tras la inoculación mecánica sobre plantas de *Nicotiana benthamiana*. Este clon agroinfectivo constituye una herramienta molecular indispensable que ha permitido realizar un análisis funcional de la proteína de la cápsida (CP). Así, mediante técnicas de mutagénesis dirigida sobre el clon pBPepXL6, se han obtenido mutantes que impiden la expresión de la CP. En uno de ellos, denominado pBPepGFP Δ CP1, se ha sustituido el ORF de la CP por el ORF del gen delator de la proteína verde fluorescente (GFP), de modo que los focos de infección iniciados pudieron ser visualizados mediante la detección de la fluorescencia generada por la GFP. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que (1) la CP no es necesaria para la multiplicación de PepMV pero sí para su movimiento célula a célula, (2) es posible expresar un gen foráneo (*GFP*) a partir del genoma de PepMV, condición fundamental para el desarrollo de un vector viral y (3) el número de focos

iniciales de infección a que da lugar la agroinfiltración de clones derivados de PepMV es pequeño. Adicionalmente, se generaron construcciones basadas en pBPepGFP Δ CP1 a las que se les introdujo diferentes tipos de mutaciones en las regiones 5' y 3' terminales del ORF de la GFP. Los ensayos de agroinfiltración llevados a cabo con estas construcciones mostraron que la alteración de dichas regiones puede afectar negativamente a la eficiencia de un potencial vector viral. Para el desarrollo de un vector viral, se generaron dos construcciones derivadas de PepMV (pBPep501 y pBPep5.128) en las que el ORF de la GFP fue situado bajo el control del promotor del RNA subgenómico de la CP duplicado. Los ensayos de agroinfiltración llevados a cabo con ambas construcciones mostraron la capacidad de estos vectores para expresar GFP e infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana*. Sin embargo, se observó que las construcciones eran inestables *in planta*, pues la fluorescencia decaía drásticamente a pocos días post-infiltración, probablemente debido a fenómenos de recombinación homóloga. Por otro lado, estos resultados permitieron delimitar una región en el genoma de PepMV que contiene todos los elementos funcionales (que actúan *in cis*) necesarios para actuar como promotora del RNA subgenómico de la CP. Esta región posee un tamaño de 112 nucleótidos: 38 nt del extremo 3' del ORF 4 seguidos de 38 nt de la región UTR más 36 nt del extremo 5' de la CP. A continuación, con el fin de evitar duplicaciones de secuencias, se ensayó la construcción pBPepGFP Δ CPCh2, en la cual la GFP fue situada bajo el control del supuesto promotor del RNA subgenómico de la CP del aislado PepMV-Ch2. Los resultados obtenidos con esta construcción demostraron que a través de una secuencia control heteróloga también es posible expresar un gen foráneo desde el genoma de PepMV.

Abreviaturas

ABREVIATURAS (por orden alfabético)

VIRUS

AMV	Virus del mosaico de la alfalfa
BaMV	Virus del mosaico del bambú
BMV	Virus del mosaico del bromo
BPYV	Virus del falso amarilleo de la remolacha
BSMV	Virus del mosaico rayado de la cebada
BWYV	Virus del amarilleo occidental de la remolacha
BYDV	Virus del enanismo amarillo de la cebada
BYV	Virus del amarilleo de la remolacha
CABYV	Virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CCMV	Virus del moteado clorótico del cowpea
CLSV	Virus de la mancha de la hoja del pepino
CMV	Virus del mosaico del pepino
CVX	Virus X del cactus
CVYV	Virus del amarilleo de las venas del pepino
CymMV	Virus del mosaico de la orquídea barco
CYMV	Virus del mosaico amarillo del trébol
CYSVD	Virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas
FMV	Virus del mosaico del pasto setaria
HCRSV	Virus de las manchas anulares cloróticas del hibisco
LMV	Virus del mosaico de la lechuga
MNSV	Virus de las manchas necróticas del melón
NMV	Virus del mosaico del narciso
PapMV	Virus del mosaico de la papaya
PepMV	Virus del mosaico del pepino dulce
PLRV	Virus del enrollado de la patata
PMoV	Virus del moteado de la parietaria
PPV	Virus de la sharka
PRSV	Virus de las manchas anulares de la papaya
PSbMV	Virus del mosaico del guisante transmitido por la semilla
PVA	Virus A de la patata
PVX	Virus X de la patata
PVY	Virus Y de la patata
RYMV	Virus del moteado amarillo del arroz
SMV	Virus del mosaico de la soja
SqMV	Virus del mosaico del calabacín
TAV	Virus de la aspermia del tomate
TBSV	Virus del enanismo ramificado del tomate
TCV	Virus del arrugado del nabo
TEV	Virus del grabado del tabaco
TiCV	Virus del amarilleo infeccioso del tomate
TMV	Virus del mosaico del tabaco
ToCV	Virus del amarilleo clorótico del tomate
TomRV	Virus de la mancha anular del tomate

ToMV	Virus del mosaico del tomate
ToTV	Virus del torrado
TSWV	Virus del bronceado del tomate
TVMV	Virus del moteado de las venas del tabaco
TYLCVD	Complejo de virus asociado al rizado amarillo del tomate o de la cuchara
WCIMV	Virus del mosaico del trébol blanco
WMV	Virus del mosaico de la sandía
ZVX	Virus X del zigocactus
ZYMV	Virus del mosaico amarillo del calabacín

OTRAS ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
CP	proteína de la cápsida
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
dpi	días post inoculación
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	DL-Ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ER	resistencia extrema
Et-OH	etanol
GFP	proteína verde fluorescente
GVA	giberelina A
Hel	helicasa
HR	respuesta de hipersensibilidad
kb	kilobase
kDa	kilodalton
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
Mt	metiltransferasa
NB	dominio de unión ácido nucleico-proteína
NBS-LRR	sitios de unión a nucleótidos y residuos repetidos de leucinas
ng	nanogramo
nm	nanometro
nt	nucleótido
NUE	elemento cercano aguas arriba
ORF	marco abierto de lectura
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PTGS	silenciamiento génico post-transcripcional
RdRp	polimerasa de RNA dependiente de RNA
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico

RNAse	ribonucleasa
rNTP	ribonucleótidos
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
SDS	dodecakil sulfato sódico
SGP	promotor subgenómico
siRNA	pequeños RNAs interferentes
SL	tallo bucle
ssRNA	RNA de cadena sencilla
STPs	partículas de cola única
TAE	tampón tris-acetato
TGB	bloque de tres genes
T _m	temperatura de hibridación
U	unidad de actividad enzimática
UTR	región no codificante
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus
VPLs	partículas vacías parecidas a virus
vRNP	complejo ribonucleico
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1.1. El tomate y virus le afectan	4
1.2. El Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV)	7
1.2.1. Distribución y características biológicas de PepMV	7
1.2.2. Control de PepMV	10
1.2.3. Situación taxonómica de PepMV, organización genómica y funciones génicas	11
1.3. Biología molecular de potexvirus	14
1.3.1. Traducción /replicación del genoma viral	15
1.3.1.1. Proteínas implicadas en la replicación	15
1.3.1.2. Elementos de RNA que actúan en <i>cis</i>	16
1.3.2. Movimiento célula a célula	23
1.3.2.1. TGBp1, TGBp2 y TGBp3	23
1.3.2.2. La CP y el movimiento célula a célula de los potexvirus	24
1.3.2.3. Elementos de RNA implicados en el movimiento	25
1.3.3. Movimiento a larga distancia	26
1.3.4. Supresión del silenciamiento génico	27
1.3.5. Estructura y ensamblaje	28
1.4. Uso de la resistencia genética como estrategia de control de enfermedades causadas por virus	31
1.4.1. Búsqueda de fuentes de resistencia	32
1.4.2. Herencia de las resistencias	33
1.4.3. Mecanismos de resistencias	34
1.4.3.1. Resistencia a transmisión	35
1.4.3.2. Resistencia a nivel celular	36
1.4.3.3. Resistencia al movimiento célula a célula	37
1.4.3.4. Resistencia al movimiento a larga distancia	38
1.5. Virus de plantas como vectores de expresión	40
1.5.1. Generación de clones infectivos de virus de RNA	40
1.5.2. Vectores virales	43
1.6. Objetivos	45
CAPÍTULO 2.- BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA NATURAL A PEPMV	49
2.1. Antecedentes	49
2.2. Materiales y métodos	50
2.2.1. Material vegetal y aislado viral	50
2.2.1.1. Acondicionamiento y germinación de semillas de <i>Solanum</i> spp	50
2.2.2. Inoculación de PepMV	51
2.2.3. Evaluación de germoplasma de tomate y especies afines	52
2.2.4. Cruzamientos intraespecíficos	53
2.2.5. Extracción de RNA	54

2.2.6. Detección de PepMV	54
2.2.6.1. Síntesis de sondas	54
2.2.6.2. Hibridación molecular	55
2.2.6.3. Cuantificación de RNA de PepMV en extractos de RNA total	56
2.3. Resultados	57
2.3.1. Puesta a punto de un método de detección de PepMV	57
2.3.2. Evaluación de la susceptibilidad a PepMV de germoplasma de tomate y especies afines	58
2.3.3. Análisis de potenciales resistencias identificadas	61
2.4. Discusión	64
CAPÍTULO 3.- DESARROLLO DE UN VECTOR VIRAL DERIVADO DE PEPMV	71
3.1. Antecedentes	71
3.2. Materiales y métodos	72
3.2.1. Aislados virales y material vegetal	72
3.2.2. Desarrollo de un clon agroinfectivo de PepMV	72
3.2.2.1. Síntesis de un cDNA complementario a la longitud total del genoma	72
3.2.2.2. Clonaje en pTOPO-XL	73
3.2.2.3. Clonaje en pBIN61	74
3.2.2.4. Construcción pT7PepXL6	75
3.2.3. Construcción pTOPO-GFP	76
3.2.4. Construcciones de DNA derivadas del clon infectivo de PepMV	76
3.2.4.1. Construcción pT7PepXL6agg	77
3.2.4.2. Construcciones pBPepGFPΔCP	78
3.2.4.3. Construcción pT7PepGFPΔCP1	82
3.2.4.4. Construcción pBINCPep	82
3.2.4.5. Construcciones PepMV:GFP: pBPep501 y pBPep5.128	83
3.2.4.6. Construcción pBPepGFPΔCPCh2	84
3.2.5. Transcripciones <i>in vitro</i>	86
3.2.6. Aislamiento e inoculación de protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	86
3.2.7. Ensayos de Agroinfiltración	88
3.2.7.1. Transformación de <i>Agrobacterium</i>	88
3.2.7.2. Agroinfiltración	88
3.2.8. Extracción de RNA total de hojas y de protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	89
3.2.9. Detección del RNA viral de PepMV	89
3.2.9.1. Síntesis de sondas	89
3.2.9.2. Análisis por <i>dot blot</i> y <i>tissue-print</i>	90
3.2.9.3. Análisis por Northern blot	90
3.2.10. Análisis de secuencias	90
3.2.11. Predicción de estructuras secundarias	91
3.2.12. Visualización de la GFP	91
3.3. Resultados	92
3.3.1. Obtención de un clon “agroinfectivo” de PepMV	92
3.3.2. Estudio de la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV	94

3.3.2.1. Efecto de la CP sobre la multiplicación de RNA viral en protoplastos de <i>N. benthamiana</i>	95
3.3.2.2. Efecto de la CP sobre la multiplicación de RNA viral en tejido agroinfiltrado	97
3.3.2.3. Suministro de la CP en <i>trans</i> mediante agroinfiltración	99
3.3.2.4. Efecto de modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del ORF de GFP de PepGFP Δ CP1 sobre el número de focos de infección visibles tras agroinfiltración	101
3.3.3. Diseño de un vector viral derivado de PepMV	104
3.3.3.1. Predicción del promotor subgenómico del gen CP de PepMV	105
3.3.3.2. Generación de clones PepMV:GFP: expresión de la GFP a través de la duplicación del promotor del sgRNA de la CP	108
3.3.3.3. Selección y ensayo de un promotor subgenómico heterólogo	113
3.4. Discusión	118
CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES	129
CAPÍTULO 5.- BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	
Anexo I. Entradas de <i>Solanum</i> analizadas	155
Anexo II. Construcciones de DNA y mutantes generados	161

CAPÍTULO 1

Introducción y Objetivos

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los virus constituyen un problema de protección de cultivos a nivel mundial, debido a las graves pérdidas económicas que causan (Barnett y col., 1999; Waterworth y col., 1998) y las dificultades que entraña su control. Durante más de un siglo se han realizado esfuerzos importantes para desarrollar estrategias de control de virus que sean eficientes, así como para entender cómo las plantas se defienden frente a los virus y qué mecanismos emplean éstos para invadirlas (Harrison y Robinson, 2005; Zaitlin y Palukaitis, 2000). A pesar de esto, los virus continúan siendo una de las mayores amenazas en la producción de cultivos de interés agronómico y ornamental en todo el mundo y su control en el siglo 21 continúa siendo un desafío. Para el control de virus no se dispone de agentes antivirales directos, sino que es necesario el desarrollo de medidas indirectas (Hull, 2002). Entre las medidas de control de virus más eficientes y con mayor potencial se encuentra el uso de la resistencia genética de las plantas frente a estos patógenos. Para desarrollar medidas de control es fundamental poseer conocimiento tanto de la biología de los virus como de la disponibilidad de resistencias y los mecanismos que las controlan. Por otro lado, los virus de plantas también pueden constituir herramientas valiosas que puedan ser utilizadas en beneficio nuestro: por ejemplo, durante los últimos años, los genomas de algunos virus de plantas se han manipulado para convertirlos en eficientes vectores de expresión de genes foráneos (Pogue y col., 2002).

Esta tesis trata sobre el Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV; género *Potexvirus*), virus que tiene gran importancia económica en cultivos de tomate de Europa y América del Norte. En el presente capítulo de introducción trataré en primer lugar algunos aspectos generales sobre el tomate y virus que afectan al tomate en España, así como la información más reciente sobre la biología y distribución de PepMV y los últimos avances sobre la biología molecular de virus del género *Potexvirus*. A continuación, haré referencia a la utilización de virus de plantas como vectores de expresión (clones infectivos y vectores virales) por su relevancia en el campo de la Biotecnología. Éstos se han convertido en una herramienta esencial para el estudio de la biología molecular de un virus y de las interacciones que se dan entre virus y planta, así como para el desarrollo de estrategias antivirales (Goldbach y col., 2003; Prins y col., 2008) o

generación de plataformas de expresión de proteínas recombinantes en plantas (Gleba y col., 2007; Lico y col., 2008; Pogue y col., 2002). En esta introducción también trataré brevemente algunos aspectos relacionados con el uso de la resistencia genética como estrategia de control de virus, entre ellos la identificación de nuevas fuentes de resistencia y expresión de las mismas. En el capítulo 2 se describen los resultados obtenidos de la búsqueda de fuentes de resistencia natural a PepMV mediante el escrutinio de germoplasma de especies afines pertenecientes al género *Solanum*. Y por último, en el capítulo 3 se abordarán los resultados concernientes al desarrollo de un vector de viral basado en PepMV.

1.1. El cultivo del tomate y virus que le afectan

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece al género *Solanum* de la familia Solanaceae, la cual engloba unos 90 géneros y más de 3.000 especies, algunas de ellas de gran importancia económica como la patata (*Solanum tuberosum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y el propio tomate. Los centros de origen del género *Solanum* se encuentran tanto en el centro y sur de América (tomate, pimiento y patata) como en la India y China (berenjena). El centro de origen del tomate se encuentra en América y presumiblemente sea Méjico el lugar donde ocurriera la domesticación y Perú el centro primario de diversificación (Bai y Lindhout, 2007; Peralta, 2007).

La clasificación filogenética de las Solanáceas fue revisada recientemente y el género *Lycopersicon* fue reintegrado dentro del género *Solanum* adquiriendo nueva nomenclatura (Tabla 1.1.) (Peralta y col., 2005). Dentro del género *Solanum*, la sección *Lycopersicon* incluye al tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) (única especie domesticada) y 12 especies afines más. Estas especies afines, más conocidas como tomates silvestres, poseen una gran diversidad genética, especialmente entre las autoincompatibles como *S. chilense* y *S. peruvianum* (Rick y Chetelat, 1995). Gracias a su amplia diversidad genética, dichas especies representan en la actualidad el principal recurso genético en la mejora de tomate cultivado (Bai y Lindhout, 2007; Larry y Joanne, 2007; Rick y Chetelat, 1995).

Tabla 1.1. Lista de especies de la sección *Lycopersicon* dentro del género *Solanum* y equivalencias según la nomenclatura anterior (Peralta y col., 2005).

<i>Solanum</i> spp	Equivalencia en <i>Lycopersicon</i> spp
<i>S. arcanum</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> (L. Riley)
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal
<i>S. chmielewskii</i> (C. M. Rick, Fobes y M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson y R. K. Jansen	<i>L. chmielewskii</i> C. M. Rick, Fobes y M. Holle
<i>S. corneliumuellerie</i> J. F. Macbr.	Parte de <i>L. peruvianum</i> , conocida como <i>L. peruvianum</i> var. <i>glandulosum</i>
<i>S. galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>L. cheesmaniae</i>
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp y D. M. Spooner	<i>L. hirsutum</i>
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. neorickii</i> (C. M. Rick, Fobes y M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson y R. K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C. M. Rick, Fobes y M. Holle
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy
<i>S. peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller

El tomate es uno de los principales cultivos hortícolas en extensión y producción a nivel mundial (FAO, 2007) y es la especie hortícola de mayor importancia económica en nuestro país. España es uno de los principales productores mundiales de tomate ocupando dentro de la Unión Europea el segundo lugar en importancia tras Italia tanto por la superficie cultivada como por la producción obtenida (57.061 ha, 3.922.500 Tm) (MAPA 2008). Las principales zonas productoras de tomate en España, por orden en producción, se sitúan en Extremadura y Andalucía. Murcia, Canarias, la Comunidad Valenciana y Baleares son también zonas importantes de cultivo de tomate en nuestro país (MAPA 2008). En España la mayor parte del cultivo de tomate se realiza en regadío y al aire libre (71%); un 28% de la superficie total se destina al cultivo protegido, localizado en su mayor parte, y por este orden, en Andalucía (Almería),

Murcia y Canarias. Por ejemplo, en Andalucía, el 51% de la producción en el 2005 se obtuvo en cultivo protegido (MAPA 2005).

Sin embargo, el cultivo del tomate se ve fuertemente afectado por enfermedades que reducen considerablemente la producción y calidad del producto, pudiendo llegar a ocasionar la pérdida total del cultivo. Entre las numerosas enfermedades que afectan a este cultivo, las provocadas por virus se cuentan entre las más importantes. El cultivo intensivo en invernadero durante casi todo el año, el movimiento de material vegetal entre países y las condiciones climáticas en los invernaderos favorables para el establecimiento de los vectores y el desarrollo de nuevas enfermedades, parecen ser las causas directas de la aparición e incremento de enfermedades víricas en el cultivo del tomate y de sus vectores transmisores.

En España, las principales infecciones virales en los cultivos de tomate son las causadas por el complejo de virus asociado al rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato Yellow leaf curl virus*, TYLCD) (Jordá, 1996; Monci y col., 2000) y por el Virus del amarilleo clorótico del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) (Navas-Castillo y col., 2000), ambos transmitidos por mosca blanca, el Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV) transmitido por contacto y por semilla (Aguilar y col., 2002; Jordá y col., 2000; Ling, 2008), el Virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) transmitido por trips (Roselló y col., 1996), y más recientemente el Virus del torrado (*Tomato torrado virus*, ToTV) (Alfaro Fernández y col., 2006; Verbeek y col., 2007), transmitido por mosca blanca (Amari y col., 2008). Además de los virus anteriormente citados, en España también causan problemas de mayor o menor gravedad en cultivos de tomate los siguientes virus: el Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Blas, 1993; Jordá y col., 1992) y el Virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) transmitidos por pulgones (de Andrés y col., 1998), el Virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) (Alonso y col., 1989) y el Virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) transmitidos por contacto (Alfaro Fernández y col., 2006), el Virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) (Cuadrado, 1995), el Virus de la mancha anular del tomate (*Tomato ring spot virus*, TomRSV) transmitido por nematodos, el Virus del moteado de la parietaria (*Parietaria mottle virus*, PMoV)

(Alfaro Fernández y col., 2006; Aramburu, 2001) y el Virus del amarilleo infeccioso del tomate (*Tomato infectious chlorosis virus*, TiCV) (Font y col., 2002) transmitido por mosca blanca. PepMV, virus del que se ocupa esta tesis, en la actualidad está provocando graves epidemias en cultivos de tomate en España, produciéndose la mayor incidencia de estas enfermedades en Murcia, Canarias, Almería y Alicante (Soler-Aleixandre y col., 2007).

1.2. El Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV)

1.2.1. Distribución y características biológicas de PepMV

PepMV se detectó por primera vez en cultivos de pepino dulce (*Solanum muricatum*) en el valle de Cañete en Perú (Jones y col., 1980), siendo esta planta considerada como su único huésped. En 1999 se identificó infectando plantas de tomate en cultivo bajo invernadero en Holanda (EPPO 2009; van der Vlugt y col., 2000). A partir de esta primera cita en tomate, y en un periodo de 4 años, aparecieron focos de la enfermedad causada por PepMV en las principales zonas productoras de tomate de Reino Unido, Holanda, Alemania, Francia, España, Italia, Noruega, Polonia, Suecia, Eslovaquia, Estados Unidos, Canadá, Austria, Bélgica y Marruecos entre otros (Figura 1.1) (EPPO, 2006).

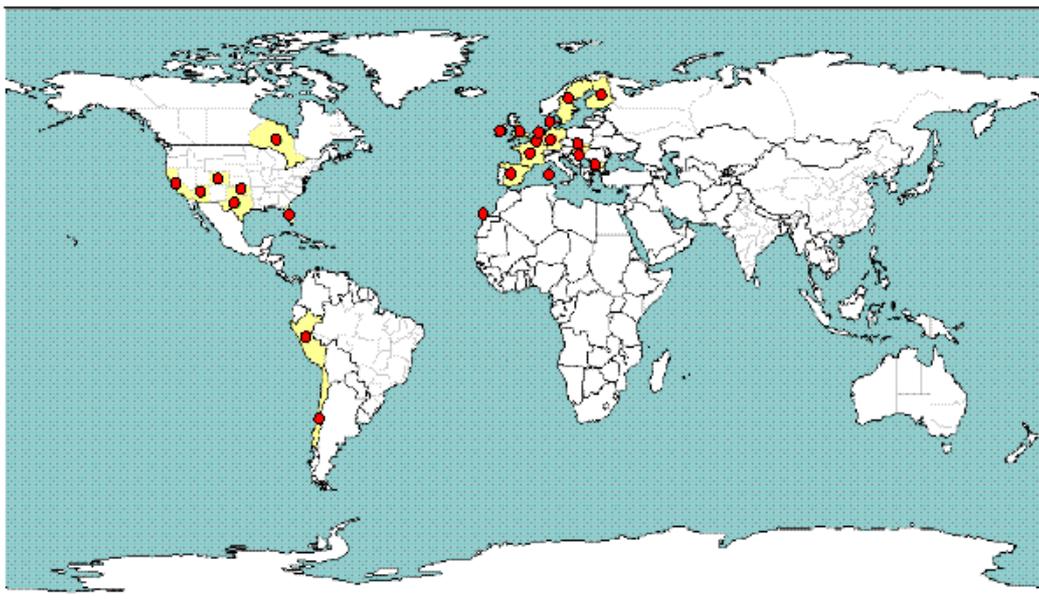


Figura 1.1. Distribución de la enfermedad causada por PepMV a nivel mundial (EPPO 2006).

En España se describió por primera vez en el año 2000 (Jordá y col., 2000), expandiéndose rápidamente y causando graves pérdidas en los cultivos del

Sureste de la península. La mayor incidencia de la enfermedad causada por PepMV se da en las provincias de Murcia, Almería y en el archipiélago canario (Pagán y col., 2006; Soler-Aleixandre y col., 2007).

PepMV se transmite mecánicamente de un modo muy eficiente. La transmisión se produce por contacto entre partes aéreas de las plantas y por acciones mecánicas (manipulación de las plantas, roce con instrumentos y aparatos, e incluso por el roce de la ropa de los operarios). No se tiene constancia de la transmisión de este virus por los vectores que habitualmente transmiten otras virosis que afectan al tomate aunque sí se ha demostrado la implicación de los abejorros utilizados en la polinización en la dispersión del virus (Lacasa y col., 2003). También se ha demostrado la presencia y transmisión del virus en semillas de tomates infectados de forma natural con PepMV, aunque la tasa de transmisión es menor del 2% (Córdoba-Sellés y col., 2007). De hecho, se sospecha que, a pesar de la baja tasa de transmisión por semilla, sea éste el vehículo que ha llevado la enfermedad a los distintos países en que se ha detectado (Córdoba-Sellés y col., 2007; Ling y Carpenter, 2005).

La gama de huéspedes de PepMV está esencialmente limitada a solanáceas (Salomone y Roggero, 2002), aunque parece existir cierta diversidad en este aspecto entre diferentes aislados (Sánchez-Fernández y col., 2006). De forma natural este virus infecta pepino dulce y tomate aunque experimentalmente PepMV es capaz de infectar plantas de 30 especies de la familia *Solanaceae*. Entre los huéspedes experimentales se encuentran plantas de cultivos de importancia económica como la patata, el pimiento o la berenjena (EPPO, 2009), aunque hasta la fecha no se han descrito incidencias de PepMV en dichos cultivos.

La manifestación de la enfermedad causada por este virus resulta muy variable dependiendo del estado fenológico de las plantas y de las condiciones ambientales (luz y temperatura), además del aislado de PepMV que infecte las plantas (Hanssen y col., 2009; Pagán y col., 2006; Soler y col., 2002). Se han asociado una gran variedad de síntomas a las infecciones de PepMV en plantas de tomate (Hanssen y col., 2009; Pagán y col., 2006). Los síntomas comprenden mosaicos verdes suaves, mosaicos amarillos suaves y brillantes (Figura 1.2, A.1 y A.2), abullonados pronunciados, filimorfismos y otras distorsiones en hojas (Figura 1.2, B.1 y B.2), además de estriaduras verdes en los tallos. Los frutos

maduros pueden presentar mosaicos o maduración irregular, manifestando un jaspeado en diferentes tonalidades, como resultado de una distribución irregular del licopeno en la superficie del mismo (Figura 1.2, C.1) (Soler y col., 2000a).

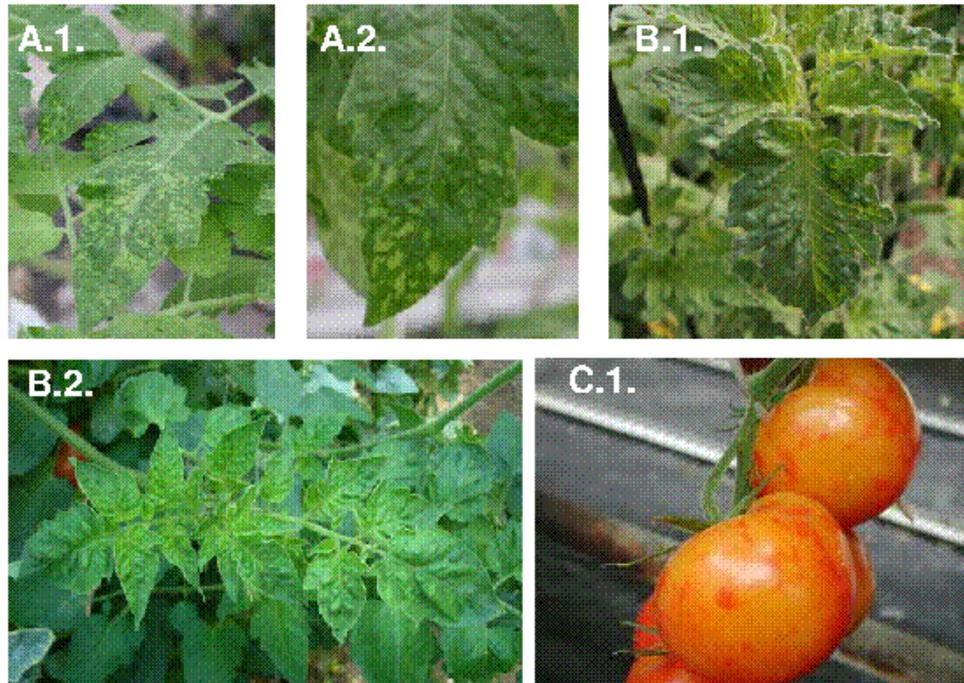


Figura 1.2. Síntomas inducidos por PepMV. **A. 1.** y **A. 2.** Mosaicos amarillos en folíolos. **B. 1.** y **B. 2.** Abullonados y distorsiones en folíolos. **C. 1.** Distribución irregular del licopeno en frutos.

No sólo se ve afectada la calidad de los frutos sino que las plantas infectadas pueden llegar a sufrir una reducción del rendimiento de hasta el 40% (Spence y col., 2006). Los síntomas se ven atenuados cuando la temperatura alcanza valores por encima de los 25 °C y en algunos casos desaparecen por completo (Soler y col., 2002).

En un estudio sobre la estructura genética y evolución de PepMV en España, Pagán y col. (2006) mostraron que las poblaciones de PepMV en este país son genéticamente muy homogéneas. Sin embargo, a pesar de existir altos niveles de homología de secuencia entre los aislados españoles, observaron diferencias en los síntomas que inducían en tomate.

En la actualidad hay al menos 10 aislados de PepMV completamente secuenciados (Aguilar y col., 2002; Cotillon y col., 2002; Ling, 2007; Ling y col., 2008; López y col., 2005; Maroon-Lango y col., 2005; Pagán y col., 2006). La comparación de las secuencias obtenidas entre aislados de tomate procedentes de

varios países europeos (LE 2000, LE 2002, Fr, Sp13, UK2) indica un alto grado de similitud entre éstas (del 99 al 100%), mientras que la comparación de estas secuencias con las de aislados peruanos de *S. peruvianum* (LP 2001) o las de aislados americanos de tomate (US1 y US2) es mucho menor (del 95 % y 78-86%, respectivamente). Más recientemente, Ling (2007) identificó dos nuevos aislados de PepMV (Ch1 y Ch2) en semillas de tomate comercial procedentes de Chile. La comparación de las secuencias de estos aislados de Chile con la secuencia de los existentes hasta el momento mostró que presentaban mayor homología con las de los aislados americanos (entre Ch1 y US1 un 98,7% y entre Ch2 y US2 un 90,7%) que con las de los europeos (78-86%), lo que sugiere que posean un origen común. Por tanto, podrían distinguirse 3 clases de aislados de PepMV (Europeos de tomate, Peruanos, Americanos), posiblemente asociados a un huésped específico o lugar de origen (Pagán y col., 2006).

1.2.2. Control de PepMV

El control de esta enfermedad se realiza principalmente mediante métodos preventivos, como la destrucción de plantas infectadas y la prevención de la transmisión del virus mediante medidas higiénicas durante la propagación y el cultivo, incluyendo el uso de semilla certificada libre de virus. Puesto que las semillas parecen ser el vehículo de dispersión del virus (Ling, 2008), se crea la necesidad de extremar las medidas de seguridad existentes y a su vez implementar en estas medidas métodos de control eficaces para la detección y eliminación de virus en semillas.

En semillas de tomate PepMV se encuentra localizado en la cubierta (Ling, 2008). De hecho, se ha demostrado que tratamientos químicos como la inmersión de las semillas durante 3 h en fosfato trisódico al 10%, no sólo elimina PepMV de las semillas sino que también evita su posterior transmisión a plántulas, además de favorecer la germinación (Córdoba-Sellés y col., 2007). En general, los tratamientos químicos parecen más efectivos que los térmicos para la eliminación de PepMV. Este tipo de tratamientos con fosfato trisódico ya han sido utilizados para la eliminación de otros virus como el Virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) en semillas de tomate (Green y col., 1987).

Por lo que respecta a la disponibilidad de resistencia a PepMV, hasta el momento no se han identificado resistencias completas a este virus. Solamente se han identificado en entradas de especies silvestres del género *Solanum* algunos casos de resistencia parcial las cuales parecen ser específicas de aislado (Ling y Scott, 2007; Soler-Aleixandre y col., 2007). Sin embargo la posibilidad de uso de estas fuentes de resistencia está por determinar pues todavía se desconoce su base genética y su respuesta frente a diferentes a aislados.

1.2.3. Situación taxonómica de PepMV, organización genómica y funciones génicas

PepMV pertenece al género *Potexvirus* de la familia Flexiviridae de virus de plantas (Adams y col., 2004). Esta denominación se debe a que los miembros de esta familia se caracterizan por tener partículas flexuosas. La familia Flexiviridae está compuesta por 8 géneros, *Allexvirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Thricovirus* y *Vitivirus*, además de algunos virus relacionados que no están asociados a ningún género.

Las principales características de los miembros de esta familia son: 1) los viriones son partículas flexuosas de 12-13 nm de diámetro, 2) poseen genomas monopartitos de sentido positivo, formados por una única cadena de RNA poliadenilado, 3) la traducción de algunos marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*, ORFs) se produce a través de RNAs subgenómicos (sgRNA) y 4) están compuestos por hasta 6 ORFs ordenados de 5' a 3' de la siguiente manera: primero proteínas relacionadas con la replicación (150-250 kDa), segundo una o más proteínas de movimiento, tercero una única especie de proteína de la cápsida (CP) (22-44 kDa) (Adams y col., 2004) (Figura 1.3.).

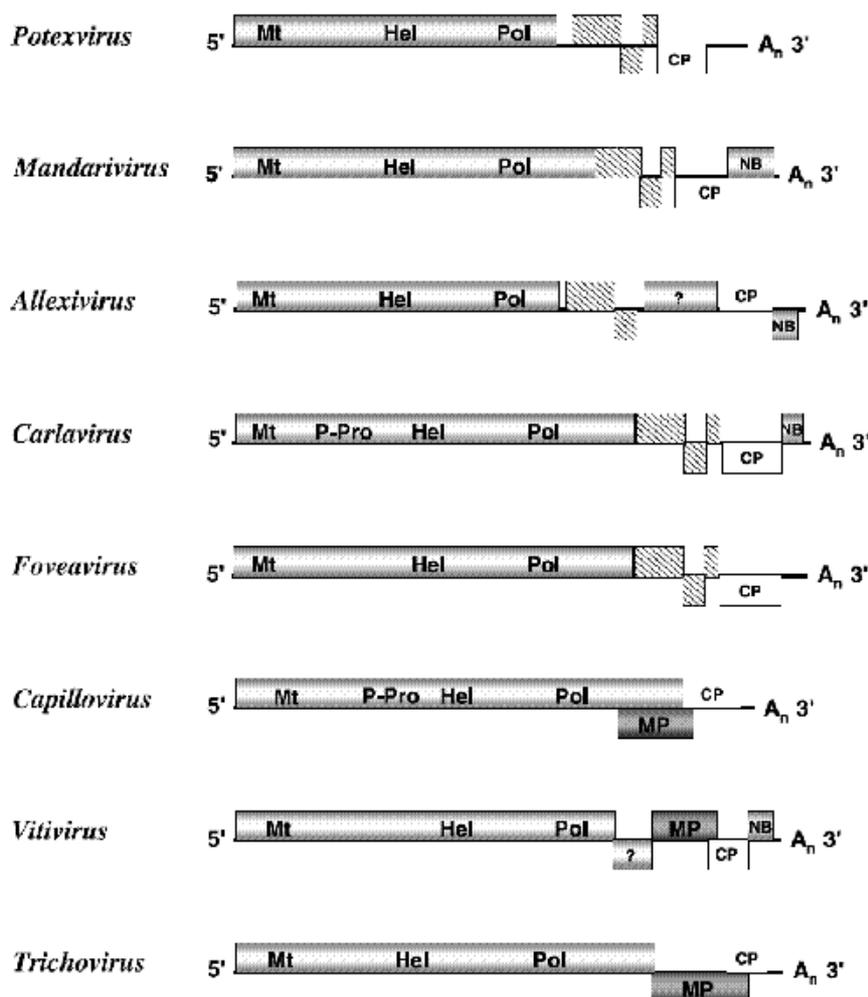


Figura 1.3. Organización genómica de cada uno de los géneros de la familia Flexiviridae. Las cajas representan marcos de lectura abiertos (ORFs). En el primer ORF, ORF1, se indican los siguientes dominios: metiltransferasa (Mt), helicasa (Hel), *papain-like* proteasa (P-Pro) y RNA polimerasa dependiente de RNA (Pol). Las cajas rayadas representan ORFs tipo bloque de tres genes (TGB). CP, proteína de la cápsida; MP, proteína del movimiento; NB, dominio de unión ácido nucleico-proteína (*nucleic acid binding protein*). La mayoría de los géneros poseen estructura cap (m⁷Gp) en el extremo 5' del gRNA (Adams y col., 2004).

Los miembros del género *Potexvirus* se caracterizan por tener partículas flexuosas filamentosas de 470-580 nm de longitud y un diámetro de 13 nm. Poseen genomas monocatenarios de RNA de sentido positivo que oscilan entre 5,9-7 kb, compuestos por 5 ORFs. El primer ORF codifica la replicasa viral que se traduce directamente del RNA genómico (gRNA) durante la infección (Batten y col., 2003). La región central del genoma posee 3 ORFs solapados, conocidos como bloque de 3 genes (*Triple Gene Block*, TGB) y codifica las proteínas implicadas en el movimiento (TGBp1, TGBp2 y TGBp3) (Lough y col., 2000; Verchot-Lubicz, 2005). El último ORF codifica la CP, la cual es requerida para el

ensamblaje de las partículas virales así como para el movimiento célula a célula (Cruz y col., 1998; Chapman y col., 1992a; Huisman y col., 1988). Además, en el extremo 5' poseen estructura cap y en el extremo 3' una cola poliadenilada (Huang y col., 2004; Huisman y col., 1988).

En el caso concreto de PepMV, su genoma está compuesto por una cadena de RNA de sentido positivo de 6,4 kb (van der Vlugt y col., 2000). Mediante análisis computacional de la capacidad codificante del RNA se ha podido mostrar que posee 5 ORFs flanqueados por dos regiones no codificantes (UTRs) (Aguilar y col., 2002). El extremo 5'UTR presenta un tamaño que oscila entre 84 y 86 nt hasta el primer codón AUG. El extremo 5'UTR comienza con una secuencia 5'-GAAAACAAA-3', idéntica en todos los aislados y posee una homología de secuencia significativa entre potexvirus. El extremo 3'UTR posee un tamaño que oscila entre 63 y 69 nt, seguido de una cola poliadenilada. El ORF más próximo al extremo 5' supuestamente codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) (163-164 kDa). Los siguientes ORFs, 2, 3 y 4, los cuales se solapan parcialmente en diferentes marcos de lectura, poseen la organización típica de potexvirus, de proteínas implicadas en el movimiento, TGB, y codifican péptidos de 26 kDa, 14 kDa y 9 kDa, respectivamente (Aguilar y col., 2002). El ORF más cercano al extremo 3' codifica la CP, con un tamaño de 25 kDa, responsable de la encapsidación del genoma viral, y probablemente del movimiento célula a célula e implicada en la acumulación de RNA viral (este último aspecto será tratado en el Capítulo de 3 de esta tesis con mayor profundidad). La estrategia de expresión del genoma de PepMV presumiblemente sea la misma que la de otros potexvirus (Verchot-Lubicz y col., 2007; Verchot y col., 1998) de forma que el gRNA actúe como mensajero para la expresión de la replicasa viral mientras que los ORFs próximos al extremo 3' se expresan a través de sgRNAs. El TGB se expresaría a partir de dos sgRNA (sgRNA1 y 2) y la CP del sgRNA3 (Figura 1.4).

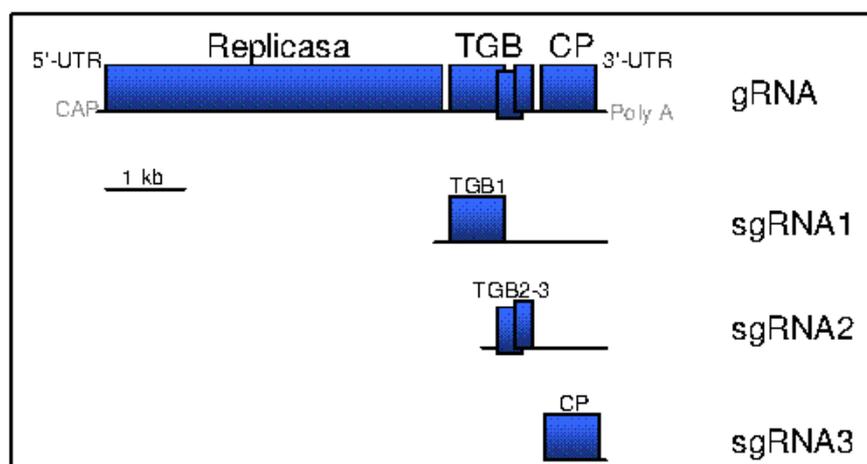


Figura 1.4. Organización genómica y probable estrategia de expresión de PepMV.

1.3. Biología molecular de potexvirus

En la base de datos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) el género *Potexvirus* está compuesto por 25 miembros más 21 especies provisionales (Adams y col., 2004). El miembro tipo de este género es PVX. A parte de PVX, el Virus del mosaico del trébol blanco (*White clover mosaic virus*, WCIMV), el Virus del mosaico del pasto setaria (*Foxtail mosaic virus*, FMV), el Virus X del cactus (*Cactus virus X*, CVX), el Virus del mosaico amarillo del trébol (*Clover yellow mosaic virus*, CYMV) y el Virus del mosaico del bambú (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) han sido importantes para poder definir los posibles mecanismos moleculares que controlan la biología de potexvirus. PVX además está siendo ampliamente utilizado como vector viral para la expresión de proteínas de interés en plantas (Baulcombe y col., 1995; Chapman y col., 1992b), y ha sido una herramienta fundamental para el descubrimiento del silenciamiento génico y pequeños RNAs en plantas (Hamilton y col., 2002; Hamilton y Baulcombe, 1999) así como para el estudio de la resistencia a PVX mediada por el gen *Rx* (Bendahmane y col., 1999). Así, el estudio de la biología de los potexvirus ha contribuido de forma significativa al entendimiento de varios pasos del ciclo viral como son la replicación y los mecanismos de transporte de virus en plantas, además de los mecanismos de resistencia de las plantas y del silenciamiento génico.

En el apartado 1.2.3 se ha realizado una breve descripción de la organización genómica de potexvirus y de las funciones principales de los genes que codifican sus genomas. En el presente apartado se tratarán algunos aspectos relacionados con los mecanismos que controlan la replicación y movimiento, así como los últimos avances relacionados con las distintas interacciones que se dan entre los diferentes elementos virales que ocurren durante el ciclo de infección en potexvirus.

1.3.1. Traducción /replicación del genoma viral

1.3.1.1. Proteínas implicadas en la replicación

Durante la expresión del genoma viral de potexvirus, el gRNA actúa como mensajero para la expresión de la replicasa mientras que las proteínas TGBp1, TGBp2, TGBp3 y la CP se expresan a partir de sgRNAs. Por tanto, la replicasa viral es la única proteína que se traduce directamente del gRNA (a partir del ORF1) durante la infección (Batten y col., 2003). Una vez traducida la replicasa, se inicia la replicación del genoma viral, que incluye la síntesis de la cadena complementaria al gRNA en primer lugar y a continuación la generación tanto de sgRNAs como gRNAs de cadena positiva. En estos eventos, en los que se dan interacciones RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína, además de la replicasa viral, probablemente intervengan otros elementos virales y factores celulares. En potexvirus, la única proteína por ahora descrita requerida en la replicación es la replicasa viral de 125 kDa (Longstaff y col., 1993). En la replicasa de los potexvirus se han identificado 3 dominios asociados a la replicación que incluyen: un dominio en el extremo N-terminal tipo metiltransferasa (Rozanov y col., 1992), un dominio de unión-NTP (NTP-binding)/helicasa (Davenport y Baulcombe, 1997) y un dominio en el extremo C-terminal RdRp (Longstaff y col., 1993). Los potexvirus mantienen estos tres dominios en una sola proteína en lugar de expresarlos por separado en distintas proteínas, como en el caso de otros virus de plantas.

Plante y col. (2000) demostraron que la replicasa de PVX se encuentra asociada a las membranas celulares. Sin embargo, todavía no se sabe qué sección de la membrana es utilizada como centro de replicación (Verchot-Lubicz y col., 2007). Es posible que la replicasa contenga una secuencia que controle

directamente el anclaje del complejo de replicación a la membrana o que factores del huésped interactúen con el complejo de replicación controlando indirectamente la unión de la replicasa a la membrana (Verchot-Lubicz y col., 2007). Hasta el momento sólo existen especulaciones sobre si TGBp2 (proteína esencial para el movimiento en potexvirus) esté implicada de algún modo en la replicación. Estas especulaciones están basadas en estudios recientes realizados por Torrence y col. (2006) en los que detectaron la TGBp2 del Virus del mosaico rayado de la cebada (*Barley stripe mosaic virus*, BMSV; *hordeivirus*) en el cloroplasto en presencia de la replicasa. Aunque por ahora no se haya demostrado que otras proteínas virales, a parte de la replicasa, estén involucradas en la replicación, sí que se conocen elementos de RNA que actúan en *cis* en la replicación y/o traducción del genoma viral, como se describe a continuación.

1.3.1.2. Elementos de RNA que actúan en *cis*

Durante el ciclo de replicación de los potexvirus se producen interacciones dinámicas entre diferentes elementos de RNA del genoma viral y la maquinaria de replicación. Estos elementos, que en algunos casos forman estructuras secundarias, se encuentran situados en los extremos terminales del genoma (5'UTR y 3'UTR) (Figura 1.5) y también en regiones internas como en promotores de sgRNA (Hu y col., 2007). Dichos elementos son esenciales para la síntesis y/o traducción del RNA viral además de estar implicados en otros procesos, como se verá más adelante (Kim y Hemenway, 1996; Pillai-Nair y col., 2003).

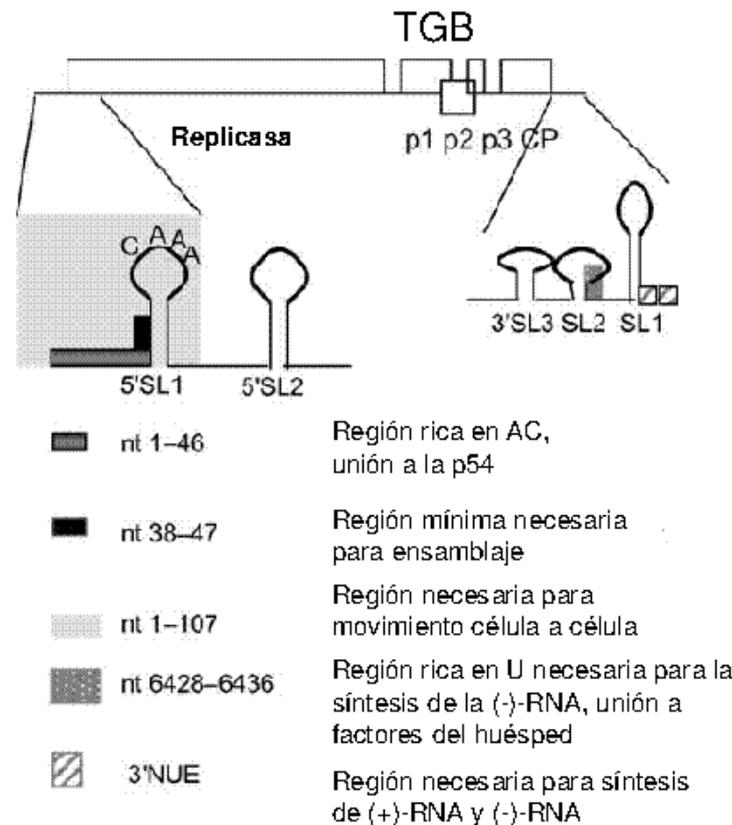


Figura 1.5. Elementos de RNA que actúan *in cis*. El diagrama de cajas representa la organización genómica de PVX. Las cajas representan ORFs y las líneas secuencia de RNA. El nombre de cada ORF se encuentra debajo del esquema genoma. Las regiones 5' y 3' se encuentran detalladas (se indican SL 5'-SL1, 5'-SL2, 5'-SL3, 3'-SL1 y 3'-SL2). Las regiones sombreadas y rayadas, representan regiones importantes de los extremos 5' y 3' UTR que controlan la síntesis de RNA, la encapsidación y movimiento del virus. Las longitudes que se especifican corresponden a PVX. La longitud de los extremos 5' y 3' UTR puede que varíe ligeramente entre potexvirus (Verchot-Lubicz y col., 2007).

A. Elementos situados en el extremo 5'UTR

A.1. Elementos de RNA importantes para la traducción del genoma viral

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre el papel que juegan los elementos de RNA durante la traducción de las proteínas de PVX se han centrado en el estudio de la relación entre el extremo 5'UTR y la traducción de la replicasa (Batten y col., 2003). Smirnyagina y col., (1991) describieron por primera vez que los primeros 84 nt del extremo 5'UTR de PVX contenían dos regiones: una región α (del nt 1 al 41; rica en CA) y otra región β (del nt 42 al 84). Smirnyagina y col. (1991) observaron que situando estas regiones $\alpha\beta$ -promotoras a más de 150 nt del extremo 5' del ORF1, aguas arriba de un gen

delator, aumentaba la eficiencia de la traducción de este gen en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, Tomashevskaya y col. (1993) encontraron que si alteraban la secuencia de la región β se producía un descenso de la traducción *in vitro*. De modo similar, Kim y Hemenway (1996) describieron que esta modificación en la región β provoca un descenso en los niveles de acumulación de gRNA de sentido negativo.

A.2. Elementos de RNA que regulan la replicación

Análisis basados en la delección o mutación de los primeros 84 nt del extremo 5'UTR de PVX han demostrado que en esta región existen múltiples elementos esenciales para la replicación (Miller y col., 1999). Además, el análisis de la estructura secundaria del extremo 5' terminal desveló que en los primeros 182 nt se forman dos estructuras tipo tallo-bucle (*Stem-Loop*, SL), conocidas como 5'-SL1 y 5'-SL2 (Figura 1.5.), que están implicadas en la replicación (Kim y Hemenway, 1996). Por tanto, la región activa se extiende hasta unos 100 nucleótidos dentro del ORF1 (Verchot-Lubicz y col., 2007). El 5'-SL1 es multifuncional, contribuye a la replicación del virus, movimiento célula a célula y ensamblaje del virión. Kwon y Kim (2006) demostraron que tanto la estructura del 5'-SL1 como la secuencia GAAA situada dentro del bucle de dicho SL, eran esenciales para la síntesis de RNA de cadena positiva. Además, observaron que cambios en el 5'-SL1 también afectaban a la acumulación del sgRNA requerido para la producción de CP. Kwon y Kim (2006) sugirieron que tras la desencapsidación, las proteínas del huésped eran capaces de reconocer 5'-SL1 promoviendo la traducción o replicación del gRNA.

Además, el 5'-SL1 puede que regule la producción de CP y TGBp1 por complementariedad a elementos situados en los promotores subgenómicos (*subgenomic RNA promoters*, SGPs) (Kim y Hemenway, 1999). Los potexvirus sintetizan 3 sgRNAs a partir de los cuales expresan el TGB y la CP (Huisman y col., 1988; Lee y col., 2000). En el extremo 5'UTR del genoma de PVX se ha identificado una secuencia de 8 nt (AACUAAAC) que es complementaria a un motivo de 8 nt (GUUAAGUU) conservado entre potexvirus situado en los SGPs de los sgRNAs de la TGBp1 y CP (Batten y col., 2003) (Figura 1.6.). Cualquiera

mutación que altere el grado de complementariedad entre estas secuencias de PVX provoca una reducción en la síntesis de RNAs de cadena positiva (gRNA y sgRNA) sin que se vea afectada la síntesis de RNA de cadena negativa (Kim y Hemenway, 1999). La complementariedad entre dichas regiones puede que provoque cambios en la conformación del RNA viral dando lugar a nuevas “formas activas” requeridas para la transcripción (Figura 1.6.) (Hu y col., 2007).

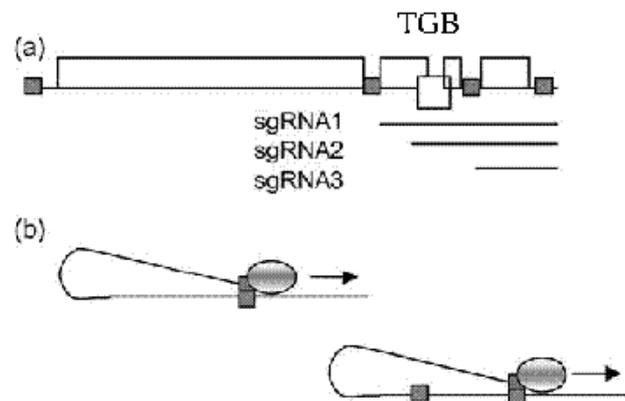


Figura 1.6. Representación esquemática de interacciones a larga distancia que regulan la síntesis de RNA. (a) Los cuadros grises representan elementos de RNA que son complementarios entre sí. Debajo del genoma se encuentran representados los tres subgenómicos. (b) Interacciones entre el extremo 5'UTR y los promotores subgenómicos del sgRNA1 y sgRNA3. Estas interacciones son necesarias para que la replicasa (óvalo grisáceo) sintetice sgRNAs (Verchot-Lubicz y col., 2007).

Solapando con el 5'-SL1 hay una secuencia de 5 nt (ACCAA) que se repite varias veces en el extremo 5'UTR. En PVX, esta secuencia repetida se ha demostrado que es capaz de unirse a una proteína celular de 54 kDa (p54) que también es importante para la replicación (Kim y col., 2002).

B. Elementos situados en el extremo 3'UTR

El extremo 3'UTR de PVX, que tiene 74 nt de longitud, también contiene elementos que actúan *in cis* que controlan la acumulación tanto de la cadena positiva como de la cadena negativa. El estudio de la estructura secundaria permitió identificar 3 SL: 3'-SL1, 3'-SL2 y 3'-SL3 (Figura 1.5). Los elementos del 3'UTR requeridos para la síntesis de la cadena negativa incluyen el 3'-SL3 entero con la secuencia de 6 nt situada en el bucle del 3'-SL3, el lado 3' del tallo del 3'-SL2 (región rica en U) y la cola poliadenilada (Batten y col., 2003). El 3'-SL1 no es esencial para la síntesis de la cadena negativa (Pillai-Nair y col., 2003).

La región rica en U situada en el tallo del 3'-SL2 se ha demostrado que tiene capacidad de unión a factores del huésped que probablemente sean necesarios para la multiplicación del virus (Sriskanda y col., 1996). Estudios recientes demuestran que para la síntesis de la cadena negativa es necesario que ocurran interacciones entre una secuencia de 6 nt presente en el 3'-SL3 y la secuencia de 8 nt presente en los SGPs. Por tanto, los elementos conservados en los extremos del genoma interactúan con el mismo grupo de elementos internos para la síntesis del RNA (Figura 1.6) (Verchot-Lubicz y col., 2007).

Además hay dos regiones ricas en AU cercanas a la cola poliadenilada conocidas como “elementos cercanos aguas arriba” 1 y 2 (*near upstream elements*, NUE1 y NUE2) que contribuyen a la acumulación de RNA de cadena positiva (Huang y col., 2001). Mutaciones en NUE1 y NUE2 afectan más a la síntesis de gRNA de cadena positiva que a la síntesis de cadena negativa.

C. Promotores subgenómicos

La generación de sgRNAs es una de las estrategias utilizadas por los virus de RNA de sentido positivo para la expresión de los genes próximos al extremo 3' del genoma. Los sgRNAs se generan durante la infección y sirven como mensajeros a partir de los cuales se van a expresar proteínas que normalmente son utilizadas por el virus en etapas intermedias o tardías en el ciclo de infección viral (Miller y Koev, 2000). Se han propuesto varias estrategias para la generación de sgRNAs. Las más comunes entre virus de plantas son: la iniciación interna, en la que la replicasa inicia la transcripción de sgRNA internamente en el gRNA de cadena negativa (Miller y col., 1985) y la terminación temprana, en la que se produce una terminación temprana de la síntesis de la cadena de RNA negativa, la cual servirá de molde para la generación del sgRNA (Sit y col., 1998). Existen otros mecanismos para la generación de sgRNA, aunque menos comunes y poco conocidos, como la transcripción discontinua u otros que incluyen fenómenos como el *splicing* del gRNA (Koev y Miller, 2000).

La estrategia utilizada por potexvirus para la generación de sgRNAs es la de iniciación interna (Kim y Hemenway, 1997). Como se ha comentado en el párrafo anterior, la replicasa inicia la transcripción de los sgRNAs internamente

en el gRNA de cadena negativa. En este caso, la RpRd reconoce una secuencia dentro del gRNA de cadena negativa a partir de la cual inicia la síntesis de los sgRNA (Figura 1.7). Esta secuencia es conocida como promotor del sgRNA, SGP.

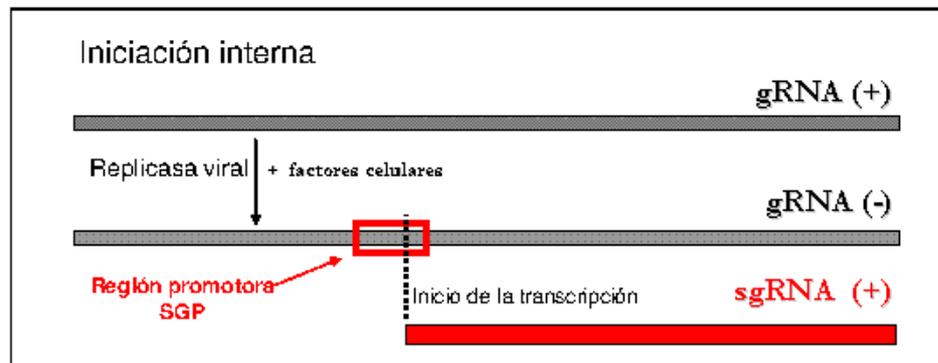


Figura 1.7. Representación esquemática del mecanismo utilizado por potexvirus para la generación de sgRNA, conocido como iniciación interna. Las barras grises representan gRNAs de cadena positiva y negativa y la barra roja, sgRNA. El cuadro rojo marca la región que va a reconocer la replicasa viral para iniciar la síntesis del sgRNA (región promotora de sgRNA, SGP). La línea discontinua indica el lugar de inicio de la transcripción del sgRNA.

El mapeo de SGPs en algunos potexvirus indica que poseen un tamaño que oscila entre los 150-100 nt y suelen encontrarse localizados aguas arriba del codón de inicio del ORF en la cadena negativa de gRNA (Koenig y col., 2006; White y col., 1992). En la mayoría de los casos, nucleótidos situados aguas abajo del codón de inicio del ORF también forman parte del SGP, y su función generalmente es la de potenciar la síntesis de los sgRNA (Lee y col., 2000). Lee y col. (2000) estudiaron el SGP de la CP en BaMV mediante deleciones y mutaciones y concluyeron que esta región se encuentra localizada a 91 nt aguas arriba y a unos 54 nt aguas abajo respecto del sitio de inicio de la traducción de la CP, dentro de los cuales existe un número mínimo de nt esenciales para la síntesis del sgRNA (Lee y col., 2000).

En virus como TMV (Grdzlishvili y col., 2000) o el Virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (Van Der Kuyl y col., 1990), donde los SGPs están muy caracterizados, se han determinado regiones con un número mínimo de nt esenciales para la síntesis del sgRNA que contienen elementos que potencian la síntesis, denominadas “núcleo del promotor” (*core promoter*). Lee y col. (2000) determinaron el núcleo del SGP de BaMV entre los nt -59 y +36,

tomando como +1 el sitio de inicio de la traducción de la CP (Figura 1.8). Para PVX se encuentra entre los nt -59 y +19 (Chapman y col., 1992a) y en el Virus X del zigocactus (*Zigocactus virus X*, ZVX) a -39 y +16 nt (Koenig y col., 2006).

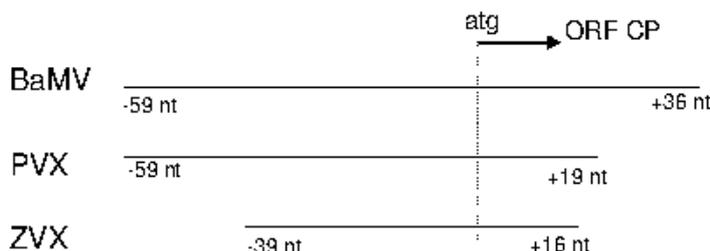


Figura 1.8. Posición del promotor del sgRNA de la CP en potexvirus. Los números indican la posición de los extremos 5' y 3' del promotor respecto del codón de inicio de la traducción de la CP (la línea discontinua corresponde al nt +1, situado en el atg).

En algunos casos, como en PVX, existen además elementos situados en los extremos terminales del genoma que interactúan *in cis* con el SGP (por complementariedad de secuencia) esenciales para la generación del sgRNA (Hu y col., 2007; Kim y Hemenway, 1999). En la mayoría de los casos, la mutación o deleción de alguno de los nucleótidos situados en el núcleo del SGP puede reducir significativamente o incluso anular la síntesis de sgRNA (Grzelishvili y col., 2000; Kim y Hemenway, 1997). El alineamiento de los SGPs de los sgRNAs del ORF2 (TGBp1) y la CP entre varios potexvirus muestra la existencia de una secuencia de 8 nt altamente conservada (3'-GUUAAGUU-5') localizada aguas arriba respecto del sitio de inicio de los ORFs (Skryabin y col., 1988), la cual se ha demostrado que es indispensable para la actividad del promotor (Kim y Hemenway, 1997; Lee y col., 1998; White y col., 1992). La distancia entre el codón de inicio del ORF y el motivo de 8 nt varía entre potexvirus (Kim y Hemenway, 1997). Las secuencias promotoras de los sgRNAs a menudo forman estructuras SL, supuestamente para facilitar la interacción de esta región con la transcriptasa (Li y Wong, 2006). Generalmente, se requiere la combinación de la secuencia primaria con la estructura secundaria para que se inicie la transcripción *in vivo* (Lee y col., 2000).

1.3.2. Movimiento célula a célula

Los potexvirus requieren de 4 proteínas para el movimiento célula a célula. Tres de ellas están codificadas por el TGB (ORFs 2-4). Se ha propuesto que la proteína de 25 kDa codificada por el ORF 2 (TGBp1) se expresa desde su propio sgRNA (2,1 kb), mientras que las proteínas de 12 (TGBp2) y 8 kDa (TGBp3), derivadas de los ORFs 3 y 4, respectivamente, se expresan desde otro sgRNA bicistrónico más corto (1,4 kb) (Verchot y col., 1998). La CP, el cuarto producto requerido para el movimiento del virus, se expresa desde su propio sgRNA. Aunque han sido objeto de intensos estudios, todavía no se dispone de información suficiente para poder explicar completamente cómo se coordinan estas proteínas para facilitar el movimiento del virus célula a célula y a través del floema.

1.3.2.1. TGBp1, TGBp2 y TGBp3

Las proteínas del TGB poseen distintas funciones. Varios experimentos indican que las proteínas del TGB poseen un patrón de acumulación intracelular muy complejo y que probablemente cooperen desde distintos compartimentos subcelulares para promover la infección viral (Samuels y col., 2007).

TGBp1 es una proteína multifuncional requerida para el movimiento célula a célula. Desencadena la dilatación de los plasmodesmos, posee actividad helicasa y puede que sea un componente activo del complejo ribonucleoproteico (vRNP) (formado por RNA viral-CP) que circula entre células transfiriendo las unidades infecciosas (Verchot-Lubicz, 2005). Además, la TGBp1 de PVX, también se ha demostrado que actúa como supresor de silenciamiento (Voinnet y col., 2000) y al igual que otros factores supresores de silenciamiento ha sido localizada en núcleo y en el citoplasma de las células infectadas (Samuels y col., 2007).

Las proteínas TGBp2 y TGBp3 de potexvirus se encuentran unidas al retículo endoplasmático (RE) y según algunos autores modulan las funciones de TGBp1 (Yang y col., 2000). El análisis de la secuencia de aminoácidos en la región N-terminal transmembrana de TGBp2 mostró que ésta posee 2 dominios transmembrana y que TGBp3 posee uno (Mitra y col., 2003). Mutaciones que

alteren la asociación de estas proteínas con las membranas también inhiben la capacidad de movimiento del virus, lo cual indica que la asociación con el RE es importante.

La proteína más conservada de estas tres es la TGBp2 y se ha demostrado que se encuentra asociada a vesículas granulares, las cuales parecen ser estructuras derivadas del RE (Ju y col., 2005). Recientemente, Ju y col. (2007) demostraron que la mutación de los residuos más conservados en la TGBp2 eliminaban la asociación de esta proteína a las vesículas granulares y que además también inhibía el movimiento célula a célula del virus. Por tanto, con estos datos estos autores sugirieron que estas vesículas pueden estar implicadas directamente en el movimiento.

Recientemente Lin y col. (2006) demostraron que la TGBp3 es necesaria para el movimiento célula a célula en BaMV así como lo demostraron Lough y col. (1998) para WCIMV; sin embargo existe cierta controversia sobre si esta proteína es necesaria para el movimiento célula a célula de PVX (Batten y col., 2003). Lough y col. (2000) sugirieron que la TGBp3 funcionaba intracelularmente facilitando la circulación de TGBp2. Por otro lado, Krishnamurthy y col. (2002) demostraron que el movimiento intracelular de TGBp2 y TGBp3 es dependiente del huésped y del estado de desarrollo de las hojas; este autor también sugirió que mientras que la porción C-terminal de TGBp3 no es necesaria para el movimiento célula a célula sí lo es para el transporte vascular.

1.3.2.2. La CP y el movimiento célula a célula de los potexvirus

La CP de PVX es la única proteína viral que se ha localizado a altas concentraciones en los plasmodesmos de células infectadas con PVX, aunque el papel de la CP en los plasmodesmos todavía está por determinar. Según algunos autores la CP forma un complejo vRNP con el RNA durante el movimiento intercelular de PVX a través de los plasmodesmos y durante el movimiento a larga distancia (Cruz y col., 1998; Lough y col., 2001). El complejo vRNP interactúa con las proteínas de la entrada de los plasmodesmos provocando su dilatación y permitiendo así el tránsito del virus de célula a célula. Estudios recientes en PVX, CVX y FMV muestran que la CP de los potexvirus se encuentra localizada en los plasmodesmos durante la infección. Experimentos de

microinyección llevados a cabo por Lough y col. (2000) mostraron que la TGBp1 de potexvirus provocaba la apertura de los plasmodesmos pero que la CP no, sugiriendo que estas proteínas deben actuar juntas promoviendo la apertura de los plasmodesmos y el transporte célula a célula. Estas observaciones apoyan al modelo propuesto sobre la formación de un complejo TGBp1-vRNP-CP que circula entre las células a través de los plasmodesmos (Lough y col., 2001). Este modelo está influenciado por otros elaborados para otros virus como el propuesto para TMV y el Virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), en los que las proteínas del movimiento se unen a una cadena de RNA de forma no específica formando estructuras vRNP lineares que se mueven de una célula a otra (Verchot-Lubicz y col., 2007).

A pesar de las observaciones anteriormente expuestas existe cierta controversia en cuanto al modelo de transporte propuesto, pues se dispone de muy poca información que demuestre que las proteínas del TGB interactúen directamente con la CP y formen un “complejo de transporte” (Samuels y col., 2007). Aunque parece razonable asumir que TGBp2 y TGBp3 coordinan el transporte del complejo TGBp1-vRNP por los laterales y a lo largo del ER hacia los plasmodesmos (Lucas, 2006), hay evidencias más recientes de que la TGBp2 de PVX induce vesículas necesarias para el movimiento célula a célula (Ju y col., 2007). Por tanto, se ha propuesto un modelo alternativo de transporte a través de vesículas donde la TGBp1 sólo actuaría desempeñando una función como guía de las partículas infecciosas a través de los plasmodesmos (Verchot-Lubicz y col., 2007).

1.3.2.3. Elementos de RNA implicados en el movimiento

Existen evidencias recientes acerca de que elementos situados en el extremo 5'-UTR de PVX están implicados en el movimiento. Lough y Lucas (2006), mediante un análisis por delección del extremo 5'UTR, identificaron un segmento de RNA implicado en el movimiento célula a célula, al que denominaron “código zip de RNA” (*RNA zip code*). Diversas delecciones en los primeros 107 nucleótidos del genoma de PVX anulaban el movimiento del virus indicando que el extremo 5'UTR era un elemento activo no sólo en la replicación sino también en el movimiento (Lough y Lucas, 2006). El modelo de interacción

que proponen es que una vez sintetizados los sgRNAs y traducidas las proteínas virales, la CP desplaza a los factores celulares produciéndose la unión de ésta con el 5'-SL1. Como la CP es necesaria para el movimiento célula a célula, la unión de esta proteína al SL probablemente secuestre a los RNAs tras su replicación y los transfiera a las células adyacentes.

1.3.3. Movimiento a larga distancia

Para que un virus invada una planta de forma sistémica deben darse una serie de interacciones compatibles virus-planta, de modo que éste sea capaz de, en primer lugar, multiplicarse en la célula inoculada y después, moverse a través de los plasmodesmos a las células adyacentes. Para virus transmitidos mecánicamente como los potexvirus, la infección se inicia en las células de la epidermis y se distribuye mediante el movimiento célula a célula vía mesófilo y células de la vaina del haz vascular hacia las células del parénquima vascular y células acompañantes. Para que ocurra el movimiento a larga distancia, el virus debe llegar a los tubos cribosos. Una vez en el floema las partículas virales se distribuyen por la planta a través de los mismos canales que los fotoasimilados y demás solutos (Cruz y col., 1998). Los mecanismos que utilizan los virus implicados en la entrada y salida de los tubos cribosos todavía están por conocer.

Como se ha expuesto en apartados anteriores, los mecanismos moleculares que controlan el movimiento célula a célula de los potexvirus están siendo profundamente investigados, sin embargo los estudios centrados en dilucidar la base de los mecanismos que controlan el movimiento a larga distancia son más escasos, por lo que existe poca información disponible.

Varios estudios han demostrado que tanto las proteínas del TGB como la CP y las interacciones que se dan entre ellas son necesarias tanto para el movimiento célula a célula como para el movimiento a larga distancia (Cruz y col., 1998; Lin y col., 2006; Lough y col., 2001). El estudio de virus mutantes de PVX, WCIMV, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) o BaMV que carecían de algunas de las funciones del TGB o CP ha demostrado que el movimiento de éstos se encuentra limitado a células únicas de la epidermis (Ajjikutira y col., 2005; Cruz y col., 1998; Chapman y col., 1992b; Lin y col., 2006; Lough y col., 2001).

Las únicas proteínas que se ha demostrado que circulan a través de los plasmodesmos y se han localizado en el floema son la TGBp1 y la CP (Cruz y col., 1998; Lough y col., 1998). La capacidad de la TGBp1 para moverse célula a célula y por el floema puede que se deba a dos razones principalmente. La primera, es que la TGBp1 sea requerida para mediar interacciones entre componentes virales en el proceso de transporte del RNA viral hacia el floema (Lough y col., 1998), pues según el modelo de transporte propuesto por Verchot-Lubicz y col. (2007) esta proteína actuaría como guía dirigiendo el paso del virus a través de los plasmodesmos y hacia el floema. Y la segunda se debe a su actividad supresora de silenciamiento. Si el silenciamiento de RNA es un sistema de defensa activo del huésped que restringe la dispersión de la infección viral, entonces la TGBp1 puede que se mueva célula a célula, por delante del frente de infección como medida para parar o bloquear el silenciamiento de RNA (Verchot-Lubicz., 2005). Por tanto, la co-traslocación de la TGBp1 y supresión del sistema de defensa de la planta probablemente sirvan de ayuda al virus para establecer una infección sistémica.

1.3.4. Supresión del silenciamiento génico

Por silenciamiento de RNA se entiende la supresión específica de la expresión génica mediada por RNA y dirigida a RNA (Baulcombe, 2002; Carrington y col., 2001; Vance y Vaucheret, 2001; Waterhouse y col., 2001). El silenciamiento de RNA o silenciamiento génico postranscripcional (*Post Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) es un sistema de vigilancia del RNA conservado entre eucariotas y que actúa como mecanismo de defensa natural frente a ácidos nucleicos invasivos (virus, transposones y quizás, secuencias genómicas altamente repetitivas) (Wang y Metzlaff, 2005). En plantas el PTGS opera como sistema de defensa frente a virus (Baulcombe, 2004). Una característica importante del silenciamiento de RNA en plantas es que puede actuar en lugares diferentes a las células en las que inicialmente se manifestó, lo que muestra que la señal de silenciamiento se mueve entre células y a través del sistema vascular de modo que impide el movimiento del virus. Aunque se desconoce la identidad de esta señal es probable que implique ácidos nucleicos porque media un efecto específico de secuencia (Bayne y col., 2005).

Voinnet y col. (2000) realizaron una serie de experimentos utilizando como sistema experimental mutantes de PVX a partir de los cuales establecieron que la proteína de movimiento TGBp1 poseía una capacidad adicional como supresora de silenciamiento. Además describieron que esta proteína debe interferir en alguno de los pasos de la fase de iniciación del PTGS, probablemente impidiendo la conversión del ssRNA en dsRNA. Más recientemente, Bayne y col. (2005) demostraron que el movimiento célula a célula de PVX era dependiente de la supresión del silenciamiento de RNA. Bayne y col. (2005) analizaron una serie de mutantes de PVX, introduciendo mutaciones aleatorias en la TGBp1, y observaron que en la mayoría de mutantes que perdían la capacidad supresora de silenciamiento se inhibía el movimiento célula a célula, lo cual indica que se trata de procesos coordinados. Sin embargo, también identificaron mutantes en los que la TGBp1 mutada actuaba como supresora del silenciamiento pero que no era funcional para el movimiento célula a célula. Por tanto, concluyeron que la supresión del silenciamiento es necesaria pero no suficiente para el movimiento célula a célula y a larga distancia de PVX. Por otro lado, Schwach y col. (2005) demostraron que la invasión sistémica de PVX en los meristemos de las plantas infectadas era dependiente de una RdRp codificada por el huésped, la cual es una parte integral de la maquinaria de silenciamiento de RNA.

1.3.5. Estructura y ensamblaje

En la caracterización de los viriones del Virus del mosaico del narciso (*Narcissus mosaic virus*, NMV) y de PVX, se ha observado que ambos poseen estructuras similares, con altos contenidos en α -hélice (Batten y col., 2003). La hélice de PVX tiene 8,75 subunidades de CP por vuelta. NMV tiene aproximadamente 8 subunidades por vuelta y un radio de 5,5 nm (Blanch y col., 2002; Kendall y col., 2007; Parker y col., 2002). Kendall y col. (2007) sugieren que todos los miembros de potexvirus contienen cerca de 8 unidades de CP por vuelta de hélice. Según algunos autores los viriones de los potexvirus se encuentran rodeados por una columna de moléculas de agua ordenadas que puede que jueguen un papel significativo en el mantenimiento de la estructura de la partícula (Atabekov y col., 2007; Baratova y col., 2004).

Cuando se expresan subunidades de la CP de PVX o del Virus del mosaico de la papaya (*Papaya mosaic virus*, PapMV) en *Escherichia coli*, en ausencia de otros componentes virales, éstas forman discos y partículas vacías parecidas a virus (*virus-like particles*, VLPs) las cuales han sido muy valiosas en estudios sobre los requerimientos del virus para su ensamblaje (Figura 1.9) (Tremblay y col., 2006).

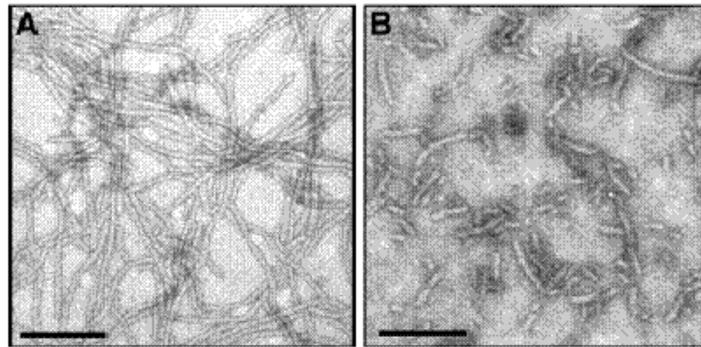


Figura 1.9. Morfología típica de partículas virales de potexvirus. A) Partículas virales de PapMV, B) VPL de PapMV. Fotografías tomadas al microscopio electrónico. Barras de 200nm (Tremblay y col., 2006).

Se ha propuesto que durante la infección, la CP de PapMV forma discos que se acumulan hasta que hay una cantidad suficiente de RNA viral y entonces se produce el empaquetamiento. Probablemente debido a la poca afinidad de las partículas de la CP con el RNA viral sea necesaria una gran cantidad RNA viral para que se produzca el empaquetamiento. El ensamblaje de PapMV, como en otros virus, es un evento que ocurre más bien tarde en el ciclo de infección, pues posiblemente sea dependiente de que haya cantidades abundantes tanto de discos como de RNA genómico (Tremblay y col., 2006).

La región de la CP involucrada en la unión al RNA de PapMV se encuentra localizada entre los aminoácidos 99 y 130 (Lecours y col., 2006). Probablemente el extremo N-terminal de la proteína esté expuesto hacia fuera de la superficie del virión y sea crucial para que ocurra el ensamblaje y puedan darse interacciones entre las distintas subunidades (Tremblay y col., 2006). En el extremo N-terminal de la CP hay 6 residuos de serina que podrían ser dianas de fosforilación para las kinasas del huésped (Tremblay y col., 2006). La fosforilación de la CP de PVX se ha demostrado que potencia la traducción del genoma viral sugiriendo que la fosforilación podría desestabilizar las interacciones entre las subunidades promoviendo el desensamblaje del virus

(Lecours y col., 2006). También hay evidencias de que el extremo N-terminal se encuentra glicosilado en plantas infectadas (Tozzini y col., 1994). La glicosilación es crítica para el mantenimiento de la capa superficial de moléculas de agua, la cual a su vez puede que sea importante para el manteniendo de la estructura del virión (Atabekov y col., 2007). Tales cambios, como la fosforilación o glicosilación, puede que sean esenciales para el desensamblaje del virus y podrían explicar la observación de estructuras anormales en varios trabajos de microscopía electrónica (Baratova y col., 2004; Chapman y col., 1992a).

En el extremo 5' del genoma de los potexvirus se ha encontrado una secuencia responsable del ensamblaje. En un principio se demostró que la secuencia situada entre los nt 37 y 47 del extremo 5' era suficiente para ser el origen del ensamblaje (*Origin of assembly sequence, OAS*) en PapMV (Sit y col., 1994). Curiosamente, este segmento reside en los 107 primeros nt, definido como código zip de RNA, que es requerido para el movimiento célula a célula, y solapa con el 5'-SL1 necesario para la replicación. Según Kwon y col. (2005) el 5'-SL1 de PVX actúa como OAS.

Por otro lado, se ha llevado a cabo una serie de experimentos para explorar la posible implicación de la TGBp1 en el ensamblaje y desensamblaje de PVX. En extractos de germen de trigo, los viriones de PVX no poseen capacidad para traducirse por sí solos, sin embargo, cuando se añadían cantidades crecientes de TGBp1, los viriones adquirían la capacidad para traducirse (Atabekov y col., 2000). El modelo propuesto sugiere que la TGBp1 remodela las partículas virales de tal modo que el RNA queda expuesto para la traducción. De acuerdo con este modelo, la TGBp1 se une a uno de los extremos del virión desestabilizando las partículas. Estas partículas, donde la TGBp1 se encuentra unida a un extremo, son conocidas como partículas de cola única (*Single Tailed Particles, STPs*). Karpova y col. (2006) sugirieron que si el RNA de PVX en estado de STP era traducible pero en forma de virión no, posiblemente la unión de TGBp1 al virión se produzca en una fase temprana de la infección. Por tanto, de acuerdo con estas observaciones, puede que la fosforilación de la CP desencadene la traducción y que se inicie así el ciclo de infección viral. Conforme el virus se desplaza célula a célula, el TGBp1 puede que funcione promoviendo el movimiento de las STPs a las células vecinas o puede que funcione en la misma célula de acogida

asegurando que los complejos CP-RNA permanecen traducibles (Zayakina y col., 2008).

Por tanto, cuando el virus entra en la célula, el desempaquetamiento probablemente empiece con la ayuda de las kinasas del huésped y conforme el virus continúa replicándose y moviéndose, la TGBp1 puede que actúe realizando una función similar a la de las kinasas, eliminando la dependencia del virus del huésped para iniciar la traducción del RNA.

1.4. Uso de la resistencia genética como estrategia de control de enfermedades causadas por virus

Los métodos de control de virosis utilizados más ampliamente son: (1) el empleo de medidas sanitarias y prácticas culturales encaminadas a conseguir la prevención o el retraso de la enfermedad, entre las que se encuentran el empleo de protecciones físicas frente a vectores (ej. mallas antipulgones), el uso de semillas libres de virus, la obtención de material libre de virus propagado vegetativamente y la eliminación de malas hierbas que puedan actuar como reservorios de virus, (2) el empleo de productos químicos contra vectores, con el objeto de minimizar la transmisión de virus y, (3) el control biológico, basado en el empleo de enemigos naturales de los vectores (depredadores, parásitos y patógenos) y en el empleo de variedades resistentes o tolerantes bien al vector de transmisión o al virus transmitido (Hadidi, 1998; Hull, 2002; Jones, 1998; Khetarpal y col., 1998; Lecoq y col., 2004; Maury, 1998; Moriones y Luis-Artega, 1996; Perring y col., 1999).

La utilización de variedades resistentes, siempre que sea posible, es uno de los pilares fundamentales de los programas de control integrado de virosis (Hilje y col., 2001). El uso de resistencia genética a virus ha sido la principal estrategia y en ocasiones ha resultado ser la única para controlar determinadas enfermedades virales (Fraser, 1990). Este método de control es el que se considera mejor a largo plazo, ya que respeta la fauna autóctona de la zona afectada y permite la aplicación de otros métodos de control complementarios. Por ello, la identificación de fuentes de resistencia a enfermedades virales y su aplicación es

una de las estrategias más deseables para reducir las pérdidas que causan los virus (Gómez y col., 2009a; Khetarpal y col., 1998).

En el proceso de obtención de variedades resistentes los mejoradores deben abordar distintos pasos sucesivos para alcanzar este fin. En primer lugar es necesaria la identificación de fuentes de resistencia. Una vez localizadas, es necesario estudiar la herencia genética ya que el conocimiento de este punto es esencial para definir la estrategia para la introgresión del gen o de los genes implicados en la resistencia. También es interesante definir cuál es el mecanismo implicado en la resistencia que permite al huésped inhibir o impedir la invasión por el patógeno (Gómez y col., 2009a; Khetarpal y col., 1998).

1.4.1. Búsqueda de fuentes de resistencia

La obtención de resistencia a virus se basa principalmente en el aprovechamiento de la gran variabilidad genética que presentan las especies en general (Michelmore, 2003; Maule y col., 2007). El primer paso en la mejora de resistencias, como se ha comentado en el párrafo anterior, consiste en la caracterización de colecciones de germoplasma de la especie con respecto a su susceptibilidad a un virus. En las colecciones que se analicen es conveniente abarcar la mayor variabilidad genética posible. Si no se dispone de datos sobre este aspecto, suele ser útil incluir todos los genotipos posibles provenientes de centros de origen y diversificación de la especie en cuestión. También suele ser interesante incluir genotipos que no tengan barreras infranqueables de compatibilidad sexual con la de interés. Con bastante frecuencia, no es posible encontrar resistencia para un cultivo y virus en particular. Así, por ejemplo, ha sido muy complicada la localización de resistencia al Virus del amarilleo occidental de la remolacha (*Beet western yellows virus*, BWYV) en lechuga de forma que el estudio de 70 cultivares y 500 líneas de mejora fue infructuoso (Watts, 1975), aunque estudios posteriores permitieron localizar algunas fuentes de resistencia (Maisonneuve y col., 1991). Del mismo modo, tampoco se encontró resistencia al Virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV) en remolacha (Russell, 1960).

Las principales fuentes de resistencia genética se han localizado en los centros de origen de la especie analizada además de en las áreas de diversificación de las especies cultivadas. Este es el caso, por ejemplo, de las especies de *Solanum* como fuentes de resistencia al TSWV (Roselló y col., 1999), TYLCV (Picó y col., 1996; Zacay y col., 1991) o al Virus del enrollado de la hoja de la patata (*Potato leafroll virus*, PLRV) (Barker y col., 1999). Esto se ha asociado con el hecho de que en los centros de origen y áreas de diversificación las plantas han estado sometidas durante largos periodos de tiempo a la presión de plagas y enfermedades lo que puede haber permitido la selección y acumulación de resistencias (Leppik, 1970).

Es deseable disponer de un buen conocimiento de la variabilidad del virus en la zona donde se pretende emplear las variedades resistentes. La(s) cepa(s) usadas en la inoculación pueden ser determinantes para el éxito del programa de mejora, ya que es frecuente la obtención de resistencia específica a patotipos concretos. Este es el caso, por ejemplo de la resistencia de tomate a TMV (Pelham, 1972), del guisante al Virus del mosaico del guisante transmitido por la semilla (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) (Alconero y col., 1986), la lechuga al Virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*, LMV) (Pink y col., 1992) y el melón al Virus del amarilleo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (Desbiez y Lecoq, 1997). Una vez localizada una resistencia, el conocimiento de su herencia es imprescindible para una adecuada explotación de la misma y para un diseño racional de su uso.

1.4.2. Herencia de las resistencias

Los estudios de herencia de las resistencias implican el esquema clásico de cruzamientos con parentales susceptibles y la caracterización de las generaciones F1, F2 y retrocruces con respecto a su susceptibilidad al virus. Se trata de un trabajo sencillo cuando la resistencia es completa, pero mucho más complicado cuando la resistencia es parcial e implica la determinación del título viral en plantas inoculadas y la definición de umbrales de resistencia para categorizar las generaciones segregantes. Más del 80% de las resistencias a virus descritas son monogénicas (Kang y col., 2005) y controladas en la mayoría de los casos (más del 50% de las resistencias monogénicas) por un gen dominante. Sin embargo, en

ocasiones la resistencia es el resultado de interacciones complejas en las que es difícil dilucidar la base genética que las determinan. En el resto de casos la resistencia parece estar controlada por genes parcialmente dominantes o cuantitativos. Se especula que este tipo de resistencias, las cuales están controladas por varios genes cada uno con posiblemente pequeños efectos aditivos sobre la resistencia, son más duraderas que las controladas únicamente por un gen dominante (Kang y col., 2005; Gómez y col., 2009a). En algunos cultivos, el umbral económico de daños permite ciertos niveles de infección; en estos casos pueden alcanzarse niveles de protección aceptables combinando la resistencia parcial con otras medidas de control como la aplicación de fitosanitarios.

1.4.3. Mecanismos de resistencias

La susceptibilidad de una planta a un virus implica que el patógeno pueda ser transmitido de una planta a otra, y que sea capaz de replicarse en las células inicialmente infectadas, moverse a las células adyacentes a través de los plasmodesmos, colonizar toda la planta desde los focos iniciales de infección utilizando el sistema vascular, y adicionalmente ser adquirido por vectores para reiniciar el ciclo de infección (Carrington y col., 1996). Por tanto, para que un virus pueda infectar a un huésped, tiene que darse una interacción compatible entre factores del virus y factores del huésped. El bloqueo de uno cualquiera de estos pasos, bien por una respuesta de defensa activa (mecanismos de resistencia “activos” o “positivos”) (Fraser, 1990; Palukaitis and Carr, 2008) o bien por una combinación incompatible entre los factores del huésped y del virus (mecanismos de defensa “pasivos” o “negativos”) (Fraser, 1990), puede conducir a la supresión o reducción de la acumulación del virus en la planta inoculada, es decir, a la expresión de una resistencia (revisado en Gómez y col., 2009a).

El análisis experimental de los diversos mecanismos de resistencia es, en general, muy complejo. En primera instancia, no siempre está claramente establecida la forma de herencia de la resistencia (mono u oligogénica). Por otra parte, a menudo es difícil distinguir experimentalmente entre mecanismos de resistencia pasivos y mecanismos que implican una respuesta de defensa, especialmente cuando la resistencia se expresa a nivel unicelular (Johansen y col.,

2001). A continuación se describen brevemente los diferentes mecanismos de resistencia en relación al ciclo de vida del virus en la planta.

1.4.3.1. Resistencia a transmisión

El inicio de una infección puede estar provocado por el uso de propágulos contaminados (principalmente semillas), por la transmisión a través de vectores de virus desde plantas huésped que actúan como reservorios o por contacto mecánico, entre plantas huésped infectadas y suelos o residuos de cultivos previos contaminados. Aproximadamente el 80% de los virus depende de vectores de transmisión, principalmente insectos, aunque también nematodos, hongos y ácaros (Stacesmith y Hamilton, 1988).

La transmisión por semilla puede ocurrir directamente por la infección del embrión después de la fecundación o indirectamente porque los gametos estén infectados antes de la fecundación (Amari y col., 2003; Gómez y col., 2009a; Maule y Wang, 1996). Aunque se han descrito casos de resistencia a través de semilla, los mecanismos fundamentales que la controlan en pocas ocasiones han sido estudiados con detalle. Un ejemplo es la resistencia en cebada (*Hordeum vulgare* cv. Modjo) a la transmisión del Virus del mosaico rayado de la cebada (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV), mediada por el alelo recesivo *rms 1*. Al tratarse de una resistencia recesiva, puede que se deba a la pérdida de algún factor funcional requerido para la replicación o movimiento de BSMV (Weiland y Edwards, 1996; Zheng y Edwards, 1990). Otro ejemplo es la resistencia del guisante (*Pisum sativum*) a la transmisión por semilla de PSbMV, resistencia poligénica y cuantitativa (Wang y Maule, 1994). En este caso, PSbMV no se transmite por pollen y ha sido detectado en los óvulos antes de la fecundación. En un gran número de casos la infección por semilla no solo depende de la infección del embrión, sino también de la estabilidad del virus en el embrión durante el proceso de maduración, almacenamiento y germinación (Bailiss y Offei, 1990; Johansen y col., 1994).

Por otro lado, la transmisión de virus a través de insectos es un proceso muy específico en el que se dan interacciones entre el virus, el vector y la planta (Ng y Falk, 2006). Los mecanismos de resistencia frente a vectores han sido clasificados como *antixenosis*, cuando afecta al comportamiento del vector en

relación con preferencias alimentarias (Kogan y Ortman, 1978), o como *antibiosis*, cuando aumenta la mortalidad, el fitness o la capacidad reproductiva del vector (Smith, 1989). Ambos tipos de resistencia puede que se deban a la presencia de tricomas no-glandulares o superficies cerosas que actúen como barreras físicas, o a la presencia de ciertos metabolitos secundarios o componentes disuasorios en la superficie de las hojas. Además, estos metabolitos puede que jueguen un papel activo en la resistencia ya que su síntesis puede estar potenciada por el ácido jasmónico y suprimida por el ácido salicílico (Li y col., 2004; Traw y col., 2003). Se han identificado y mapeado dos genes que confieren resistencia a áfidos en lechuga, género *Malus* y *Medicago*, melón, tomate, soja y trigo (Gómez y col., 2009a). Sin embargo sólo dos de ellos han sido clonados y caracterizados hasta ahora (Dogimont y col., 2008; Rossi y col., 1998), ambos genes codifican proteínas de la clase NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat*, NBS-LRR). Los dominios NBS-LRR propios de genes de resistencia, parecen ser los principales para el reconocimiento y activación de la respuesta de defensa (Dangl y Jones, 2001; Takken y col., 2006). El primero fue *Mi-1*, procedente de *S. peruvianum* que mostró altos niveles de resistencia a nemátodos, a mosca blanca y a áfidos (revisado en Gómez y col., 2009a). La resistencia que *Mi-1* confiere contra nemátodos ha sido asociada con la respuesta hipersensible (HR) (López-Pérez y col., 2006). La HR se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en los sitios de infección inicial y por el confinamiento del patógeno en esa área, permitiendo que la planta resista al mismo (Dangl y col., 1996). El segundo, *Vat*, confiere resistencia a *Aphis gossypii* y a virus transmitidos por este vector de forma no persistente en melón (Pitrat y Lecoq, 1980).

1.4.3.2. Resistencia a nivel celular

Ciertos genes de plantas confieren una resistencia que se expresa a nivel unicelular y que se caracteriza por la incapacidad del virus para multiplicarse en protoplastos preparados a partir de plantas resistentes. En determinados casos, a este tipo de resistencia se le ha denominado resistencia extrema (*Extreme Resistance*, ER) o inmunidad (Hull, 2001). Algunos ejemplos incluyen las respuestas PVY, a PVX y al Virus del mosaico de la soja (*Soybean mosaic virus*, SMV), controladas por los genes *R: Ryadg*, *Rx* y *RSv1*, respectivamente (Király y

Király, 2006). En el caso de PVX, el inductor de la respuesta de defensa de la planta, que es la CP de PVX, es reconocido por el producto codificado por el gen *Rx*, que codifica una proteína de clase NBS-LRR con un dominio en el extremo N-terminal CC (*coiled coil*, CC) (Bendahmane y col., 2000). Este reconocimiento desencadena una respuesta que consiste en un mecanismo capaz de suprimir la acumulación del virus en protoplastos y en hoja inoculada (Bendahmane y col., 1995). Otro ejemplo de resistencia a nivel unicelular lo proporciona el gen *nsv* de melón frente al Virus de las manchas necróticas del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV). Los experimentos llevados a cabo por Díaz y col. (2004) revelaron la incapacidad del virus de acumularse en protoplastos del genotipo resistente de melón desde el momento inicial de la inoculación, mostrando de esta manera que *nsv* confiere resistencia a nivel unicelular, impidiendo probablemente la traducción viral (Díaz y col., 2004; Nieto y col., 2006; Truniger y col., 2008).

1.4.3.3. Resistencia al movimiento célula a célula

En algunos casos, tras el establecimiento de la multiplicación viral en las células del huésped, el virus queda confinado a los focos iniciales de infección, debido a la incapacidad de éste para moverse a las células adyacentes, lo que se ha denominado infección subliminal (Hull, 2001). La resistencia a este nivel puede ser debida tanto a la interacción incompatible entre los factores virales y del huésped como a una respuesta rápida de la planta que limita la propagación del virus en ésta (Kang y col., 2005). Para el movimiento célula a célula del virus son necesarios componentes codificados por el virus y factores específicos del huésped (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999). La mayoría de los virus de plantas codifican proteínas de movimiento, que poseen una función específica en el movimiento célula a célula mediante la modificación de los canales de transporte de macromoléculas del huésped, de forma que el virus pueda trasladarse (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999). Un ejemplo de ello es la resistencia conferida por el gen recesivo *va* en *Nicotiana tabacum* "TN 86" al Virus del moteado de las venas del tabaco (*Tobacco vein motling virus*, TVMV); en este caso el virus se replica en protoplastos de "TN 86" pero el movimiento queda restringido a unas pocas células en las hojas de "TN 86" después de la inoculación mecánica, por lo que la resistencia de "TN 86" parece

actuar a nivel de movimiento célula a célula del virus (Gibbs y col, 1989). La capacidad de sobrepasar la resistencia conferida por el gen *va* reside en la VPg del virus (Nicolas y col., 1997) y los experimentos de co-inoculación realizados sugieren que la resistencia de "TN86" a TVMV no se produce por la inducción de una respuesta de defensa general. Es posible que este caso sea similar al correspondiente a la resistencia conferida por el gen recesivo *sbm1* frente a PSbMV, que corresponde a *EIF4E*, el cual parece ser necesario para la multiplicación del virus célula a célula (Gao y col., 2004). Otros ejemplos son la resistencia conferida por el alelo recesivo y^2 en pimiento frente a PVY (Arroyo y col., 1996) o la imposibilidad de la cepa M de CMV de infectar maíz, ésta última asociada a la incapacidad de la CP de este virus para promover el movimiento a corta distancia (Ryu y col., 1998). En otros casos se han descrito resistencias parciales asociadas a una alteración en el movimiento a corta distancia. Ejemplos de ello son la resistencia descrita en arroz al Virus del moteado amarillo del arroz (*Rice yellow mottle virus*, RYMV) (Ndjiondjop y col., 2001), en judía de carilla a TMV, en rábano a BMV, en algodón a CaMV (Hull, 1989) o en calabaza a la cepa M de CMV (Wong y col., 1999).

1.4.3.4. Resistencia al movimiento a larga distancia

Existen interacciones virus-huésped en las que el virus se multiplica y se mueve en las hojas inoculadas, pero es incapaz de moverse a otras partes de la planta (movimiento a larga distancia). Esta restricción del movimiento del virus a larga distancia puede ser resultado de un bloqueo físico de la entrada del virus en el floema, traslocación a través de él o salida del mismo. Las partículas virales entran en el floema a través de los mismos canales que los fotoasimilados y demás solutos, aunque no se trata estrictamente de un proceso pasivo (Cruz, 1999; Murphy y Carr, 2002). Sin embargo, debido a la dificultad que supone el estudio del movimiento sistémico de los virus, se conocen relativamente pocos factores del huésped implicados en este tipo de resistencias hasta la fecha.

La restricción también puede ser el resultado del reconocimiento del virus, seguido por una respuesta de la planta que induzca, entre otras posibilidades, una limitación del movimiento del virus en el floema o la inhibición de un factor o factores requeridos por el virus para el movimiento a larga distancia. Dentro de la

hoja se han identificado dominios que pueden regular la acumulación de virus (Nelson y van Bel, 1998). Estos dominios están relacionados con las conexiones entre las células del mesófilo y las células de la vaina del haz vascular, las conexiones entre células de la vaina del haz vascular y las células del parénquima vascular, y las conexiones entre las células acompañantes y los tubos cribosos. Las conexiones entre las células del mesófilo y células de la vaina del haz vascular se han mostrado como la barrera en la restricción del movimiento sistémico del Virus del moteado clorótico del cowpea (*Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV) en soja resistente y del Virus de la aspermia del tomate (*Tomato aspermy virus*, TAV) en pepino (Goodrick y col., 1991; Thompson y Garcia-Arenal, 1998). Las células acompañantes y las del parénquima vascular de las venas menores de las hojas adultas de *Nicotiana tabacum* resultaron ser la frontera responsable del retraso en la acumulación entre dos cepas diferentes de TMV (Ding y col., 1995). El movimiento a larga distancia del Virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) está restringido en la línea de tabaco V20 al nivel de la entrada o salida de los tubos cribosos, y esta restricción se debe probablemente a dos genes recesivos no ligados (Schaad y Carrington, 1996). Otro ejemplo es el bloqueo del movimiento vascular del Virus A de la patata (*Potato virus A*, PVA) en *Solanum tuberosum* subsp *andigena* (Hämäläinen y col., 2000) en el que se ha implicado el gen recesivo *ra*. Se sabe además que la mayoría de los virus requieren la CP para realizar el movimiento a larga distancia, bien sea para su entrada o propagación a través de los elementos cribosos, (ej. TMV y TEV) (Lazarowitz, 2002; Lazarowitz y Beachy, 1999).

1.5. Virus de plantas como vectores de expresión

1.5.1. Generación de clones infectivos de virus de RNA

Los clones infectivos de virus de RNA constituyen una herramienta muy valiosa para la investigación básica en Virología. La posibilidad de obtener clones de DNA complementarios a la longitud total del genoma del virus ha aumentado el potencial de la investigación en este campo. De hecho, ha facilitado el estudio de aquellos virus que se encuentran en la planta a títulos muy bajos o que su purificación resulta muy complicada, además de presentar una ventaja para el estudio y manejo de aquellos virus transmitidos por vectores. Esta herramienta permite manipular el genoma viral, lo cual es de gran importancia puesto que por medio de mutaciones, deleciones, inserciones o experimentos de complementación podemos obtener información relevante sobre la biología molecular del virus (expresión génica, replicación y movimiento) y sobre la interacción virus-planta. Por otro lado, estos clones pueden ser considerados como un conjunto de genes o secuencias de interés para el desarrollo de otro tipo de herramientas como vectores virales (Gleba y col., 2007; Pogue y col., 2002) o estrategias antiviral (Boyer y Haenni, 1994; Goldbach y col., 2003; Prins y col., 2008).

Los clones infectivos de virus de plantas de RNA están compuestos básicamente por: 1) un cDNA complementario al RNA genómico del virus, 2) una secuencia promotora de la transcripción fusionada a dicho cDNA y 3) un vector de clonaje (plásmido bacteriano).

Los principales pasos a seguir para la obtención de un clon infectivo, así como algunas de las limitaciones más comunes encontradas durante el desarrollo se describen brevemente a continuación. El primer paso para la obtención de un clon infectivo es la síntesis de un cDNA complementario a la longitud total del genoma viral. La forma más habitual de obtenerlo es mediante una reacción de transcripción reversa sobre una preparación de virus purificado o extracción de RNA total de planta infectada utilizando un iniciador específico del extremo 3' del genoma viral. La existencia de estructuras secundarias en el molde de RNA viral puede complicar la obtención de la cadena sencilla de cDNA (Boyer y Haenni, 1994). Una vez obtenida, la primera cadena de cDNA se convierte

mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cadena doble, iniciando la síntesis con un segundo iniciador complementario al extremo 5' del RNA viral. Para facilitar pasos posteriores de clonaje, en los extremos de los iniciadores se suelen situar dianas de restricción y así realizar un clonaje dirigido del cDNA en un vector de clonación (Diaz y col., 2004; Pruffer y col., 1995). La obtención de un cDNA complementario a la longitud total del genoma de un virus suele presentar una serie de dificultades sobre todo cuando se trata de genomas de tamaños mayores a 5 kb ya que la fidelidad de las transcriptasas reversas y las DNA polimerasas decrece proporcionalmente a la longitud del RNA (Lai, 2000). Existen alternativas como generar varios cDNAs que unidos cubran la longitud total del genoma (Sato y col., 1999) o una vez obtenido el cDNA corregir las regiones que contengan errores. Factores como el empleo de polimerasas termoestables, de alta fidelidad y que sean procesivas, o incluso la cepa de virus con la que se trabaja puede en ocasiones influir directamente en la infectividad del cDNA obtenido. Además, una vez obtenido el cDNA pueden surgir problemas de distinta naturaleza en los pasos posteriores que dificulten el clonaje en sí, como problemas de toxicidad del cDNA clonado en la bacteria (Yamshchikov y col., 2001) o la falta de vectores de clonación adecuados para tamaños grandes o bien en la expresión *in vivo* de los cDNAs. Este último problema puede estar causado por la presencia de intrones crípticos, sobre todo cuando se trata de genomas de virus de más 7 kb (Marillonnet y col., 2005). Aún así, en la actualidad, y con algunas excepciones, es posible clonar RNAs virales de hasta 19 kb (Lai, 2000).

En cuanto al promotor de transcripción, un aspecto crítico a decidir es si el cDNA va a ser expresado en un sistema *in vitro* o *in vivo*. Si la expresión del cDNA va realizarse *in vitro* la selección del promotor (procedente en la mayoría de los casos de bacteriófagos) será muy importante ya que puede afectar directamente al rendimiento de la transcripción y a la secuencia de los extremos terminales de los transcritos (Boyer y Henni, 1994). En la mayoría de los casos el promotor que se fusiona es el procedente del bacteriófago T7, aunque en algunas ocasiones se ha utilizado el promotor del Sp6 (Beck y col., 1994) y excepcionalmente el del T3. La preferencia del promotor de T7 sobre el de Sp6 probablemente esté relacionada con que la base genética del fago T7 esté mucho más estudiada. La estrategia más utilizada, por su simplicidad y eficacia, es la de

fusionar el promotor al cDNA viral por medio de PCR, introduciendo esta secuencia dentro del iniciador del extremo 5' situándolo aguas arriba de la secuencia del virus. Por otro lado, en el extremo 3' de la secuencia viral se suele situar una diana de restricción, para cortar el plásmido y dirigir la parada de la transcripción. Una vez obtenido el RNA transcrito podrá ser utilizado para la inoculación de plantas (por inoculación mecánica) o de protoplastos.

La expresión del RNA viral mediante un sistema *in vivo* a través de clones de DNA presenta varias ventajas frente a la expresión *in vitro*: 1) La infectividad no depende de la degradación del RNA ya que la transcripción va a ocurrir dentro de la célula; 2) No es necesario realizar transcripción *in vitro*. Esto suele ser de importancia sobre todo en aquellos virus en los que se necesita una gran cantidad de transcrito. Además reduce el costo de los reactivos al no necesitar ni RNA polimerasas ni análogos de cap; 3) La expresión del RNA viral es independiente del proceso de replicación, lo cual permite estudiar el papel o la localización de proteínas expresadas por virus mutantes que no son capaces de replicarse (Boyer y Henni, 1994); 4) La presencia de nucleótidos extra en el extremo 5' entre la secuencia del promotor y la secuencia del virus no afecta a la infectividad del cDNA (Commandeur y col., 1991).

Para expresar *in vivo* los cDNAs existen principalmente dos técnicas: la agroinoculación y la biolística.

En la agroinoculación o agroinfección (Grimsley y col., 1986; Leiser y col., 1992), el cDNA se sitúa bajo el control de un promotor de transcripción (por ejemplo, el del RNA 35S de CaMV) y una señal de terminación (por ejemplo, la señal de terminación del RNA 35S de CaMV o el terminador *nos* de la nopalina sintetasa). La construcción resultante se introduce en un plásmido de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo pBIN61; Bendahmane y col., 2002) que posee la secuencia repetida de los bordes izquierdo (*Left border*, LB) y derecho (*Right border*, RB) del T-DNA. A continuación una suspensión de *A. tumefaciens* transformado con el plásmido de transformación se inyecta en la planta, y durante la infección provocada por *A. tumefaciens* una copia de la región del T-DNA situada entre LB y RB es transferida al núcleo de la célula. Una vez en el interior del núcleo de la célula, la maquinaria de transcripción celular reconoce al promotor de transcripción, se produce la

transcripción y poliadenilación y finalmente el RNA viral es trasladado al citoplasma donde se inicia la infección viral.

Por otro lado, en la biolística, conocida también como bombardeo de partículas (Gal-On y col., 1997), el DNA es introducido en las células mediante el disparo de microproyectiles que van recubiertos de DNA; de esta forma se puede introducir el DNA en el núcleo de la célula. En este caso, el cDNA también se sitúa bajo el control de un promotor de transcripción y señal de terminación (normalmente, 35S de CaMV).

1.5.2. Vectores virales

La facultad que poseen los virus de sRNA para alterar el metabolismo celular y expresar proteínas codificadas por el genoma viral condujo a muchos investigadores a postular que los virus de RNA podían ser usados para producir proteínas recombinantes en las plantas infectadas (Pogue y col., 2002). Poco después de que fuera generado el primer clon infectivo (Alquist y col., 1984), comenzó el cometido de convertirlos en vectores de expresión. En los últimos cinco años los trabajos de investigación en este campo han avanzado significativamente (Gleva y col., 2007).

Existen diferentes estrategias para convertir el genoma de un virus en vector viral (Scholthof y col., 2002). La estrategia a utilizar suele ir marcada por las limitaciones biológicas del virus en cuestión y/o su estrategia de expresión génica. Brevemente, las más utilizadas son: 1) reemplazar un gen viral no esencial (para replicación, expresión, o movimiento) por el gen de interés (Musiychuk y col., 2007), 2) inserción de un nuevo ORF; el gen de interés se sitúa bajo el control de un promotor viral subgenómico potente (Baulcombe y col., 1995; Haviv y col., 2006), 3) fusión a un gen viral, donde el gen de interés es ligado al extremo 5' o 3' de un gen viral dando lugar a una proteína de fusión (Cruz y col., 1996). En estos casos, generalmente, la infección viral es iniciada mediante la inoculación mecánica de las partículas virales infectivas o por agroinfiltración o bombardeo. Este tipo de vectores, presenta a menudo una serie de limitaciones como son la inestabilidad (debido a fenómenos de recombinación homóloga o no homóloga) (Dawson y col., 1989; Haviv y col., 2006; Zhao y col., 2000),

incapacidad del virus de colonizar homogéneamente todos los tejidos de la planta o problemas asociados a la bioseguridad.

En los últimos años se han realizado muchos avances en cuanto a la mejora de los vectores virales dando lugar a vectores muy avanzados conocidos como “vectores virales de segunda generación” (Gleba y col., 2007). En los vectores de segunda generación, la estrategia está basada en la “deconstrucción” del genoma viral y reconstrucción de un nuevo sistema (Gleba y col., 2004). El desarrollo de este nuevo sistema se basa en que: 1) no todos los componentes virales son esenciales o beneficiosos para un vector de expresión y 2) el genoma viral puede partirse en diferentes elementos (o módulos) que operen juntos durante el proceso de infección de igual modo que un genoma “tipo silvestre”. Por tanto, en este sistema, sólo se mantienen intactos aquellos elementos del virus necesarios para una expresión eficiente de la secuencia de interés. Las funciones eliminadas (por ejemplo alguna proteína implicada en movimiento) son aportadas *in trans* por medio de componentes no virales expresados de forma estable en plantas transgénicas o por medio de la co-infiltración (Fujiki y col., 2008; Marillonnet y col., 2004; Sainsbury y col., 2008). Además las secuencias virales son optimizadas para evitar un procesamiento erróneo por parte de la maquinaria celular y conseguir un máximo de eficiencia en la expresión del vector viral (Marillonnet y col., 2005). Para iniciar la infección viral en este caso la técnica utilizada es la agroinfiltración ya que permite la co-inoculación de varios módulos a la vez (Marillonnet y col., 2004) (Figura 1.10).

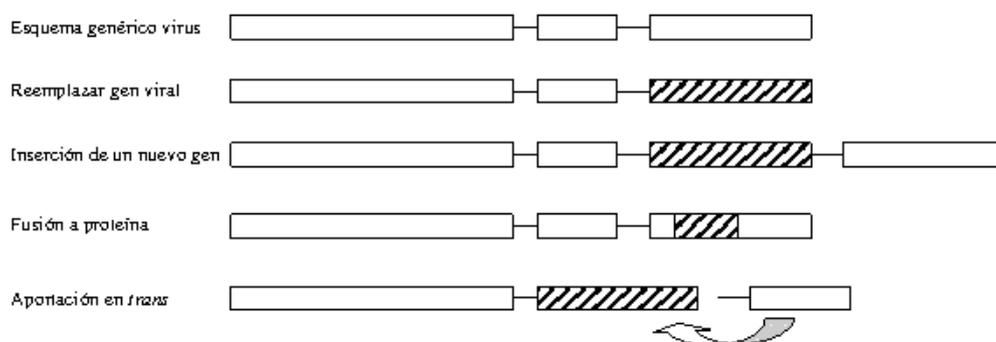


Figura 1.10. Representación esquemática de las diferentes estrategias más utilizadas para la expresión de un gen foráneo a través de un vector viral. Las cajas blancas representan genes virales y las cajas rayadas representan el gen de interés.

1.6. Objetivos

En esta tesis se abordan objetivos que se refieren a dos líneas de investigación independientes en torno a PepMV. Por un lado, se ha realizado un escrutinio de germoplasma de tomate y especies afines para identificar posibles fuentes de resistencia a PepMV. Por otro lado, y considerado este objetivo como el principal, se ha llevado a cabo el desarrollo de un clon agroinfectivo de PepMV a partir del cual obtener información sobre la biología molecular de este virus y desarrollar un vector de expresión.

Concretamente, los objetivos de esta tesis han sido:

1. Búsqueda de fuentes de resistencia natural a PepMV.
2. Desarrollo de un vector viral derivado de PepMV.

CAPÍTULO 2

Búsqueda de fuentes de resistencia natural a PepMV

CAPÍTULO 2.- BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA NATURAL A PEPMV

2.1. Antecedentes

La incidencia de diversas virosis se ha convertido en uno de los principales factores limitantes en la producción de tomate en todo el mundo. El control de las enfermedades causadas por virus se realiza principalmente mediante métodos preventivos, como la destrucción de plantas infectadas y la prevención de la transmisión del virus mediante el control de vectores y medidas higiénicas durante el cultivo y propagación. Como estas prácticas no son siempre efectivas, el uso de cultivares que incorporen genes de resistencia a virus resulta una de las mejores alternativas para su control (Lecoq y col., 2004). Las poblaciones silvestres pertenecientes al género *Solanum* se presentan como el recurso genético más interesante en la búsqueda de fuentes donadoras de resistencia a virus para tomate (*Solanum lycopersicon*), ya que la domesticación de los cultivares de tomate ha generado a lo largo de los años una notable pérdida de la diversidad genética (Picó y col., 2002; Rick y Chetelat, 1995). Especies como las pertenecientes al complejo *peruvianum* (*S. peruvianum* y *S. chilense*), alógamas y altamente polimórficas, ya han sido utilizadas como donadoras de genes de resistencia a virus, como en el caso de *S. peruvianum* para TSWV (Roselló y col., 1999) y TMV (Young y col., 1988) o *S. chilense* para TYLCV (Picó y col., 1999; Zamir y col., 1994) y CMV (Stamova y Chetelat, 2000).

Desafortunadamente, hasta el momento no existe en el mercado ninguna variedad de tomate resistente a PepMV y existe poca información publicada sobre resistencia a este virus. En estudios recientes se han descrito posibles fuentes donadoras de resistencias en especies silvestres del género *Solanum* (Ling y Scott, 2007; Soler-Aleixandre y col., 2007; Soler y col., 2000b), aunque se desconoce el control genético de estas resistencias y en algunos casos su respuesta frente a diferentes aislados de PepMV. Partiendo de estos antecedentes, el objetivo que se planteó para este trabajo fue la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia natural a PepMV en tomate y la evaluación de potenciales resistencias encontradas, así como las descritas por otros autores, frente al aislado español PepMV-Sp13.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal y aislado viral

Las entradas incluidas en la búsqueda de fuentes de resistencia a PepMV fueron obtenidas de los bancos de germoplasma de la Estación Experimental La Mayora-CSIC, del *Tomato Genetic Resource Centre* (TGRC; Davis, California, EEUU) y del *United States Department of Agriculture-Nacional Plant Germplasm System* (USDA-NPGS; California, EEUU). En total se analizaron 240 entradas de 12 especies distintas del género *Solanum* de diversos orígenes. La denominación taxonómica, código y origen de todas las entradas analizadas se muestran en el Anexo 1. Entre los criterios de selección de las entradas se tuvieron en cuenta: 1) que éstas provinieran de diversas regiones geográficas intentando cubrir fuentes genéticas variadas y 2) que se incluyeran entradas descritas por otros autores como posibles fuentes de resistencia a otros aislados de PepMV.

Para la evaluación de susceptibilidad a PepMV se utilizó como control positivo tomate susceptible a PepMV (cv. 04-TF 1616-2; *Zeta Seeds*, Almería) y como control de la inoculación *Nicotiana benthamiana*.

El aislado de PepMV que se empleó en este estudio se revivió a partir de material liofilizado de *N. benthamiana* infectada mecánicamente con PepMV-Sp13 (Aguilar y col., 2002).

2.2.1.1. Acondicionamiento y germinación de semillas de *Solanum* spp

Previamente a la evaluación de las entradas se realizó un acondicionamiento de las semillas para maximizar el porcentaje de germinación. En primer lugar se efectuó un tratamiento de esterilización. Este tratamiento consistió en la inmersión de las semillas en lejía comercial al 50% durante 30-60 min. A continuación se eliminó el desinfectante mediante 3 lavados sucesivos de 15, 10 y 5 min con agua destilada estéril. Inmediatamente después se colocaron en placas Petri sobre papel de filtro y algodón, humedecidos con agua estéril. Las placas fueron selladas con parafilm y mantenidas en oscuridad a 26°C alrededor de 2-3 días. En aquellos casos en los que el porcentaje de germinación fue menor

al 50% se realizó adicionalmente un tratamiento con giberelina A (GVA) (SIGMA ref. G7645). En estos casos, una vez esterilizadas las semillas se mantuvieron inmersas en una solución de GVA a 1 mg/ml en oscuridad durante un mínimo de 16 h. Una vez germinadas las semillas, las plántulas se traspasaron a turba y se mantuvieron en el invernadero hasta su evaluación. Se plantaron 20 plantas por entrada.

2.2.2. Inoculación de PepMV

La inoculación con PepMV de las plantas de *N. benthamiana*, tomates susceptibles y especies afines se realizó como sigue. En *N. benthamiana*, transcurridos unos 25 días después de la siembra (con 5-6 hojas), se espolvoreó carborundo en las 3 hojas más jóvenes y se extendió el inóculo suavemente con los dedos protegidos por guantes estériles. En tomate y especies afines se realizó la inoculación del mismo modo sobre las dos primeras hojas de 15-17 plantas, aproximadamente 10 días después de la siembra. Para evitar posibles escapes, las plantas se volvieron a inocular una semana más tarde. Como controles negativos se inoculaban dos plantas de cada entrada sólo con el tampón fosfato. Como controles positivos se inocularon 2 plantas de tomate susceptible y 2 plantas de *N. benthamiana*.

Como fuente de inóculo se utilizaron hojas jóvenes con síntomas de *N. benthamiana* (Figura 2.1) previamente inoculadas (entre 10 y 15 días antes) con material vegetal liofilizado infectado con el aislado PepMV-Sp13. Dichas hojas se homogeneizaron en un mortero con tampón fosfato (K_2HPO_4 - K_2HPO_4 30 mM, pH 7) y carborundo con un tamaño de grano de 0,083 mm, manteniendo el homogeneizado en hielo durante todo el proceso de inoculación. Una vez inoculadas las hojas de las plantas a ensayar, se eliminaron los restos con agua.

Tras la inoculación las plantas se mantuvieron en invernadero con unas condiciones día y noche de 16 h a 24-28°C y 8 h a 16-20°C respectivamente.



Figura 2.1. Síntomas característicos de PepMV en hojas de *N. benthamiana* donde se pueden observar mosaicos verdes suaves.

2.2.3. Evaluación de germoplasma de tomate y especies afines

La evaluación de las entradas de tomate y especies afines se llevó a cabo como se describe a continuación. Puesto que la expresión de síntomas causados por PepMV es muy variable y dependiente de condiciones ambientales, se analizaron todas las plantas independientemente de si expresaban síntomas o no.

- **Primera evaluación:**

1. Toma de muestras. Transcurrida una semana desde la última inoculación se anotaron síntomas y se muestrearon todas las plantas. La toma de muestras se realizó cortando el pecíolo de la primera hoja por encima de los cotiledones (hoja inoculada) y otra apical (hoja no inoculada).

2. Detección. El análisis de las muestras recogidas se hizo mediante hibridación molecular de improntas de secciones de pecíolo. En cada membrana de nailon se incluyeron controles tanto de planta susceptible infectada como de RNA transcrito *in vitro*, además de improntas de secciones de pecíolo de plantas sanas.

3. Evaluación. Se consideraron susceptibles aquellas entradas en las que más del 80% de las plantas se infectaron y como candidatas a portar caracteres de resistencia aquellas en las que el porcentaje resultó ser menor o dieron un resultado heterogéneo.

- Segunda evaluación:

Las plantas consideradas como candidatas a portar caracteres de resistencia se volvieron a inocular como se describe en el apartado 2.3.2 y se repitieron los mismos pasos que en la primera evaluación, para confirmar su comportamiento.

Las entradas seleccionadas se mantuvieron en el invernadero para la obtención de semillas y realizar estudios de la descendencia. Estas entradas se conservaron en el invernadero bajo las condiciones de temperatura y fotoperiodo recomendadas (Rick, C. TGRC) para estimular la floración. En el caso de las *S. corneliomuelleri*, ciclos cortos de luz (12 h) y temperaturas de 25-27°C.

2.2.4. Cruzamientos intraespecíficos

Para el estudio de la descendencia de la entrada COM-2 (*S. corneliomuelleri*) se realizaron cruzamientos intraespecíficos. Se partió de 10 plantas, numeradas de forma aleatoria de 1 a 10. Estas plantas fueron clasificadas como susceptibles o potencialmente resistentes de acuerdo a la intensidad de la señal obtenida en la hibridación en comparación con la señal obtenida en el tomate control tras la segunda evaluación. De modo que aquellas en las que la intensidad de la señal fue alta o similar a la del tomate control fueron consideradas como susceptibles (S) y aquellas en las que intensidad de la señal fue baja fueron consideradas como potencialmente resistentes (pR).

Se utilizó el polen de dos o tres flores de cada una de las plantas seleccionadas y se realizaron fecundaciones de S x S y pR x pR mediante polinización manual. La extracción del polen de las flores se realizó a primeras horas de la tarde (de 16 a 17 h) con el fin de evitar valores de humedad relativa (HR) altos (60-70% HR). La extracción del polen se realizó con la ayuda de tubos eppendorf de 0,5 ml introduciendo el estigma en el interior del tubo y golpeando suavemente la flor. El polen obtenido se mantuvo en el eppendorf etiquetado y sellado con parafilm y se conservó a 4°C (dentro de cajas selladas y en presencia de gel de sílice) hasta su posterior uso. Por otro lado, las polinizaciones se realizaron por las mañanas (11 a 13 h), de nuevo evitando valores humedad relativa altos y también temperaturas superiores a 26°C. La polinización se llevó a

cabo introduciendo la flor dentro del tubo eppendorf (previamente aclimatado) hasta que el estigma entrara en contacto con el polen. Se observó que el estado fenológico de la flor óptimo para realizar la polinización (considerando éste como el momento en el que se producía una polinización efectiva obteniendo máximo porcentaje de frutos cuajados) era justo cuando la flor acababa de abrirse y el color de ésta todavía no había virado a amarillo intenso (código 61 601, según escala BBCH para identificación del estado fenológico en frutos de Solanáceas, Feller y col., 1995). Dado que se trata de una especie alógama autoincompatible no fue necesaria la emasculación de las flores. En los cruzamientos todos los parentales seleccionados actuaron como padre y como madre.

Para el estudio del comportamiento de la descendencia frente a PepMV se evaluaron 10 plantas de cada F1 siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.2.3.

2.2.5. Extracción de RNA

Para la preparación de RNA total de plantas se partió de 0,1 g de tejido vegetal fresco. El tejido fue triturado con nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1,5 ml y se homogeneizó con 1 ml de TRI-reagent (Sigma). Las preparaciones de RNA total se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se disolvió en 50 µl de agua estéril.

2.2.6. Detección de PepMV

2.2.6.1. Síntesis de sondas

La sonda utilizada para detectar el RNA de PepMV se obtuvo por transcripción *in vitro* del plásmido pLMPepMV 0.5 (Aguilar y col., 2002). Este plásmido lleva inserto un fragmento de 600 pb complementario a una región del gen de la replicasa viral del genoma del virus.

Para preparar la sonda, el plásmido fue digerido con la enzima de restricción *Sph* I, y para la transcripción se usó la RNA polimerasa SP6 (*New England Biolabs*). La reacción de transcripción *in vitro* se realizó en un volumen

final de 50 μ l, se utilizó 0,5 μ g del DNA linearizado, 5 μ l del tampón de transcriptasa concentrado a 10x suministrado por el fabricante, 2 μ l de una mezcla de rNTPs 2,5 mM que contiene DIG-11-UTP en una concentración 1 mM (Roche diagnostics), 20 U de inhibidor de RNAsas (Amershan Pharmacia Biotech) y 20 U de RNA polimerasa SP6. La mezcla se incubó a 40°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo se añadieron 10 U de DNasa libre de RNAsas (Roche) y se continuó la incubación a 37°C durante 15 min. A continuación la reacción se paró añadiendo EDTA a una concentración de 20 mM y se precipitó con 0,1 volúmenes de etanol absoluto durante 30 min a -80°C. Por último se centrifugó y se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril.

La sonda obtenida se utilizó a una dilución 1:10.000 mezclada con tampón estándar al 50% de formamida (5xSSC (NaCl 750 mM y citrato sódico 75 mM, pH 7,0), 0,1% de N-Laurilsarcosina, 50% de formamida, 0,02% de SDS y 2% de agente bloqueante (Roche).

2.2.6.2. Hibridación molecular

El análisis de las entradas para la detección de PepMV se realizó por hibridación molecular sobre improntas de secciones de pecíolo y sobre extractos de RNA total. El RNA viral fue detectado con una sonda marcada con digoxigenina complementaria al gen de la replicasa de PepMV. El proceso de hibridación y detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo esencialmente siguiendo el protocolo propuesto por Roche (*RNA labeling and detection kit*): tras la fijación de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta (CL-1000 “*Ultraviolet Crosslinker*” UPV) se prehibridó la membrana durante dos horas en tampón estándar a 68°C y se hibridó durante toda la noche a 68°C con la sonda en este mismo tampón, al que se le añadió la sonda. Tras la hibridación las membranas se lavaron una vez con SSC2X, SDS0,1% durante 5 min a temperatura ambiente y dos veces con SSC1X, SDS0,1%, durante 15 min a 68°C. Seguidamente se realizó el proceso de detección a temperatura ambiente y con agitación suave: se enjuagó durante 5 min la membrana en solución de lavado (0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl, pH 7,5 y 0,3% Tween 20 v/v) 15 min en solución I (0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl, pH 7,5), 30 min en solución II (solución I más 1% agente

bloqueante), 30 min en solución II más el anticuerpo de la DIG conjugado con la fosfatasa alcalina (PA) a la dilución recomendada, y 2x15 min en solución de lavado. Finalmente se equilibró la membrana durante 5 min en solución III (0,1 M Tris-HCl, 0,1 NaCl, pH 9,5), se añadió el sustrato luminiscente de la PA (CSPD, Roche, dilución 1:100 en solución III) y se incubó en oscuridad 5 min. La luz emitida impresionó películas para rayos X (Roche) que se revelaron según métodos convencionales.

2.2.6.3. Cuantificación de RNA de PepMV en extractos de RNA total

El análisis de acumulación de virus en cada una de las muestras procedentes de los cruces se realizó mediante dot-blot cuantitativo. Trascurridos 12 dpi se prepararon extractos de RNA total de hojas apicales y se cuantificaron con un espectrofotómetro (*Spectrophotometer nanodrop*, ND-1000). A continuación se ajustó la concentración de los extractos a 150 ng/ μ l. A partir de esta concentración se realizaron 3 diluciones seriadas (1/3) de los extractos incluyendo 1 μ l de cada dilución sobre una membrana de nailon cargada positivamente (Roche). Una vez que se fijaron las muestras de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta en la membrana de nailon, se hibridaron con la sonda de RNA obtenida a partir del plásmido pLM_{PepMV} 0.5. Como control se incluyó en la membrana 1 μ l de RNA sintetizado *in vitro* a partir del mismo plásmido que la sonda, a una concentración de 117 ng/ μ l y 4 diluciones seriadas (1/5) de ésta. Además se incluyeron en la misma membrana extractos de RNA total de plantas de tomate susceptible y *N. benthamiana* inoculadas con PepMV. La comparación del contenido de RNA viral de cada muestra se realizó mediante la medida de las señales (que equivaldría al número de píxeles por señal) obtenidas en las películas fotosensibles de las hibridaciones. La medida de la intensidad de la señal se realizó con los sistemas de análisis y adquisición de imágenes GeneSnap y Genetools (Syngene). Los datos resultantes correspondientes al RNA transcrito proporcionaron los valores para calcular la recta patrón que relacionó la intensidad de la señal (medida en número de píxeles) y cantidad de RNA viral. Esta calibración se utilizó para interpolar los datos de los valores de RNA viral en el resto de puntos. En todos los casos, para las

comparaciones se utilizaron los valores correspondientes a las diluciones situadas dentro del rango lineal de la relación entre la dilución y las medidas obtenidas.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con ayuda del grupo de los programas informáticos SPSS 15.0 para Windows (SPSS inc., Chicago) y SigmaPlot 2000.

2.3. Resultados

2.3.1. Puesta a punto de un método de detección de PepMV

La sonda de RNA marcada con digoxigenina para la detección de PepMV fue sintetizada por transcripción *in vitro* del DNA inserto en el plásmido pLMPepMV 0.5 (Figura. 2.2), de manera que se transcribió la cadena complementaria a una región de la replicasa de PepMV.

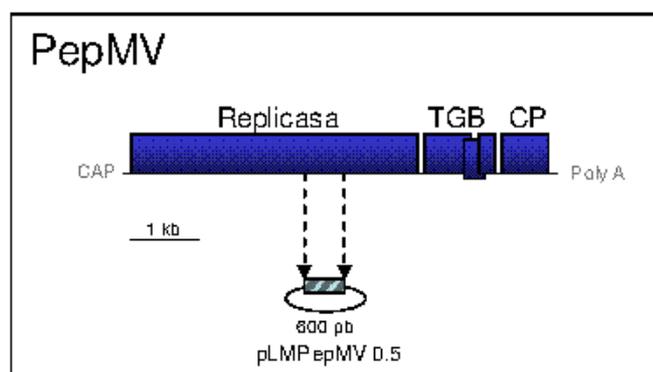


Figura 2.2. Diagrama mostrando la organización genómica de PepMV. La caja rayada indica la zona complementaria al inserto del plásmido a partir del que se preparó la sonda para detectar PepMV (pLMPepMV 0.5).

Para determinar la sensibilidad del método de detección, se incluyeron en una misma membrana 1 μ l de RNA sintetizado *in vitro* (a 100 ng/ μ l) y 4 diluciones seriadas (1/5) de éste, junto con improntas de pecíolos de tomate susceptible y *N. benthamiana* previamente inoculadas con PepMV 10 días antes. También se incluyeron improntas de pecíolo de plantas de tomate y *N. benthamiana* sanas.

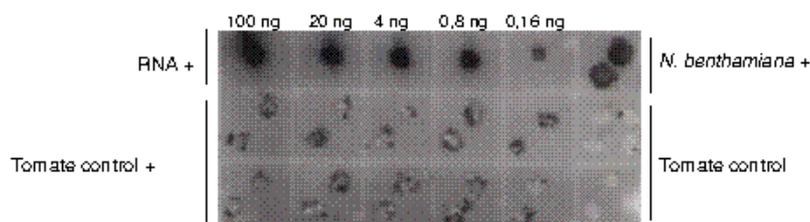


Figura 2.3. Resultado de hibridación en membrana ilustrando la sensibilidad del método de detección. En la fila superior de la figura aparecen las diluciones de RNA transcrito indicando la cantidad insertada. En esta misma fila, también aparece la impronta de pecíolos de una planta de *N. benthamiana* infectada. En la parte inferior aparecen las improntas de pecíolo del tomate control, a la izquierda las plantas infectadas y a la derecha los controles sanos.

Como muestra la figura 2.3, fue posible la detección del RNA viral hasta cantidades de 0,16 ng/ μ l. Además, también se puede observar que se detectó señal en todas las improntas de secciones de pecíolos realizadas a partir de las plantas utilizadas como control positivo, y no se detectó señal en los controles negativos. Por tanto, este método pareció adecuado para evaluar la susceptibilidad a PepMV.

2.3.2. Evaluación de la susceptibilidad a PepMV de germoplasma de tomate y especies afines

En total se analizaron 240 entradas de 12 especies distintas del género *Solanum*.

El número medio de plantas evaluadas por entrada fue 18, aunque para algunas entradas se redujo a 10 debido a los bajos porcentajes de germinación obtenidos en algunos casos.

Tras la primera evaluación, el 98,35% de las entradas de *Solanum* analizadas presentaron porcentajes de infección muy altos, alcanzando el 100% de infección en la mayoría de los casos. No se observó ningún caso de resistencia completa a PepMV, aunque alguna de ellas (ver más adelante) mostró una respuesta heterogénea. Cabe destacar que a pesar de obtener altos porcentajes de infección, no se observaron síntomas en ninguna de las entradas evaluadas.

Tabla 2.1. Especies de *Solanum* y número de entradas evaluadas frente a PepMV

Especie	N° de entradas
<i>S. cheesmaniae</i>	7
<i>S. chilense</i>	25
<i>S. chmielewskii</i>	18
<i>S. corneliomuelleri</i>	13
<i>S. galapagense</i>	7
<i>S. habrochaites</i>	30
<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	14
<i>S. lycopersicon var. cerasiforme</i>	2
<i>S. neorickii</i>	22
<i>S. pennelli</i>	10
<i>S. peruvianum, S. arcanum, S. huaylasense</i> ^a	52
<i>S. pimpinellifolium</i>	40
12 especies	240

^a *S. peruvianum, S. arcanum, S. huaylasense*: con la anterior nomenclatura pertenecían todas a una única especie, *S. peruvianum* (Peralta y col., 2005).

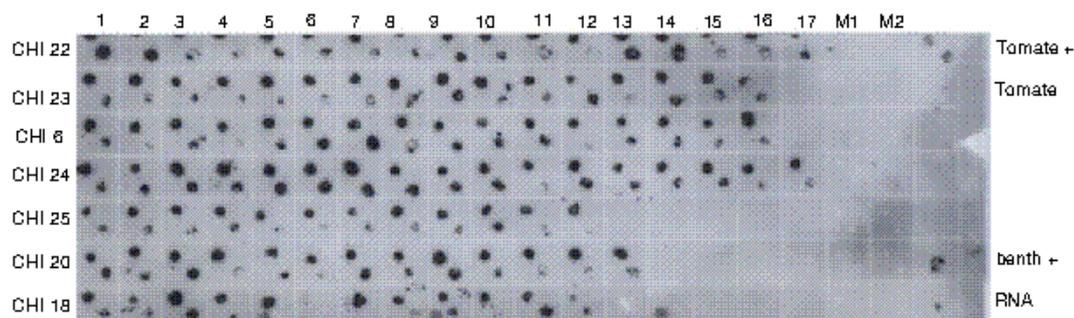


Figura 2.4. Ejemplo de resultado de hibridación en membrana ilustrando la respuesta a la inoculación con PepMV-Sp13 de 7 entradas de la especie *S. chilense*. En la parte izquierda de la figura se indica el código de las entradas, organizadas por filas. En la parte superior aparecen numeradas de 1 a 17 las improntas de pecíolos de las plantas infectadas y M1 y M2 representan las improntas de planta no inoculada. De cada planta, se incluyen dos improntas, una de hoja inoculada (impronta izquierda) y otra de hoja apical (impronta derecha). En la parte superior derecha se encuentran los controles positivo y sano de tomate susceptible y en la parte inferior derecha aparece un control positivo de *N. benthamiana* (*benth +*) infectada junto a un control de RNA sintetizado *in vitro*.

Las entradas que tras la primera evaluación mostraron una respuesta heterogénea fueron sometidas a un segundo análisis. Los resultados obtenidos en la segunda evaluación permitieron descartar las entradas PER-17 (*S. peruvianum*), COM-4 (*S. corneliomuelleri*) y HAB-8 (*S. habrochaites*). En cambio, la entrada

COM-2 (*S. corneliomuelleri*) tuvo de nuevo una respuesta heterogénea, presentando más de la mitad de las plantas unos niveles de acumulación de virus aparentemente menores que el resto y que el tomate control (Figura 2.5). Estos resultados sugieren que la entrada COM-2 podría ser una posible candidata a portar caracteres de resistencia. Además, es de resaltar que las plantas pertenecientes a esta entrada presentaron con respecto al resto de las entradas de *S. corneliomuelleri* y entre ellas fenotipos diferentes y un desarrollo poco homogéneo.

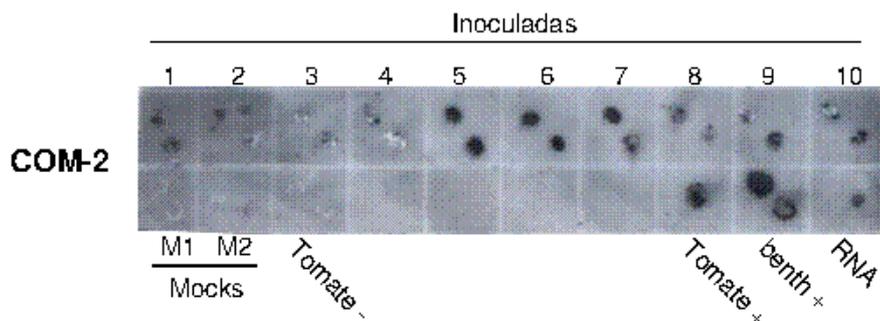


Figura 2.5. Respuesta a la inoculación con PepMV-Sp13 de la entrada de COM-2 (*S. corneliomuelleri*). En la parte superior de la figura aparecen numeradas de 1 a 10 las improntas de pecíolos de las plantas infectadas. En la parte inferior izquierda de la figura aparecen M1 y M2, los controles sanos de COM-2 y de tomate susceptible y a en la parte inferior derecha los controles positivos, tomate susceptible y *N. benthamiana* infectadas junto a un control de RNA sintetizado *in vitro*.

Notablemente, entradas clasificadas en otros trabajos (ver tabla 2.2) como parcialmente resistentes o resistentes a ciertos aislados de PepMV (Ling y Scott, 2007; Soler y col., 2000b; Soler-Alexandre y col., 2007), en nuestros experimentos fueron evaluadas y clasificadas como susceptibles a PepMV-Sp13. Si bien alguna de ellas, como HAB-5 (*S. habrochaites*), presentó un comportamiento más o menos heterogéneo, en todos los casos se alcanzó el 80% de plantas infectadas.

Tabla 2.2. Entradas de *Solanum* susceptibles a PepMV-Sp13 clasificadas como parcialmente resistentes o resistentes a otros aislados de PepMV.

Código	N° de entrada	Especie	Aislado	Fuente
PER-13	LA 1708	<i>S. peruvianum</i>	LE 2000	Soler y col., 2000b
PER-44	PI 143679	<i>S. peruvianum</i>	LE 2000	Soler y col., 2000b
PER-32	PI 126935	<i>S. peruvianum</i>	LE 2000	Soler y col., 2000b
PER-48	LA 107	<i>S. peruvianum</i>	Ch1 y Ch2	Ling y Scott, 2007
CHI-6 ^a	LA 1963	<i>S. chilense</i>	LE 2002	Soler-Aleixandre y col., 2007
CHI-14	LA 1938	<i>S. chilense</i>	LE 2000	Soler y col., 2000b
CHI-2	LA 470	<i>S. chilense</i>	LE 2002	Soler-Aleixandre y col., 2007
CHI-18 ^a	LA 1971	<i>S. chilense</i>	Ch1 y Ch2/LE 2002	Ling y Scott, 2007; Soler-Aleixandre y col., 2007
CHI-22	LA 2748	<i>S. chilense</i>	Ch1 y Ch2	Ling y Scott, 2007
HAB-5	LA 1731	<i>S. habrochaites</i>	Ch1 y Ch2	Ling y Scott, 2007

^a La respuesta a la inoculación con PepMV-Sp13 de estas entradas se muestra en la figura 2.4.

2.3.3. Análisis de potenciales resistencias identificadas

Como se indica en el apartado anterior, entre las entradas de *Solanum* analizadas, la que mostró el comportamiento más interesante fue COM-2 (*S. cornerliomuelleri*). Esta entrada presentó una respuesta heterogénea tras repetidas inoculaciones con PepMV. Para discernir si esta respuesta heterogénea era el resultado de diferencias genéticas entre los individuos analizados resultado (o consecuencia) de la variabilidad genética en la población de las semillas empleadas o dependiente de factores ambientales se decidió analizar el comportamiento de la descendencia.

La descendencia F1 se obtuvo a partir de cruces intraespecíficos entre las plantas de esta entrada clasificadas previamente como susceptibles o potencialmente resistentes. La clasificación de los parentales en susceptibles o potencialmente resistentes se realizó de acuerdo al nivel de intensidad de la señal obtenida en la hibridación en comparación a la señal obtenida para el tomate control (ver Figura 2.5, apartado anterior). De las 10 plantas de partida fueron seleccionados 3 parentales como potencialmente resistentes (1pR, 3pR y 4pR) y tres como susceptibles (7S y 8S) para realizar los cruzamientos. Se realizaron los cruces de S x S y pR x pR que se presentan en la Tabla 2.3.

Previamente a la inoculación se analizaron las plantas por hibridación molecular sobre improntas de secciones de pecíolo para descartar la transmisión del virus a través de las semillas. El resultado de este análisis previo (resultados no mostrados) fue negativo para todos los casos.

Tabla 2.3. Descendencia generada a partir de plantas candidatas a portar caracteres de resistencia de la entrada COM-2 (*S. corneliumuelleri*)

Cruce-F1	Nº plantas ^a
pR^b	
1x4	10
4x1	10
3x1	10
1x3	10
S^c	
8x7	10
7x8	10
Controles	
Tomate control	2
<i>N. benthamiana</i>	3

^a Nº de plantas analizadas por cruce

^b pR: cruces procedentes de parentales clasificados como potencialmente resistentes

^c S: cruces procedentes de parentales clasificados como susceptibles

Se estudió el comportamiento de los cruces obtenidos frente a la inoculación mecánica con PepMV-Sp13. A los 12 dpi, el análisis de la presencia de PepMV en hoja apical indicó que todos los cruces generados eran susceptibles y como cabía esperar ninguno de ellos mostró síntomas de infección.

Los valores obtenidos relativos a la acumulación viral en los distintos cruces se encuentran representados gráficamente en la figura 2.6. Como puede observarse en la figura, la variabilidad presente entre los cruces generados no fue muy elevada. Aunque en general en los cruces se obtuvieron valores de acumulación viral menores que en el tomate control, en la mayoría de los casos las diferencias no fueron significativas. Tan sólo los cruces 4x1 y 1x4, resultado del cruzamiento de los parentales potencialmente resistentes 1pR y 4pR,

mostraron unos niveles de acumulación viral significativamente inferiores a los obtenidos en el tomate control. Estos resultados indican que, a pesar de que PepMV infecta plantas de los cruces procedentes de COM-2, parece existir una cierta resistencia a la acumulación del virus en las plantas infectadas.

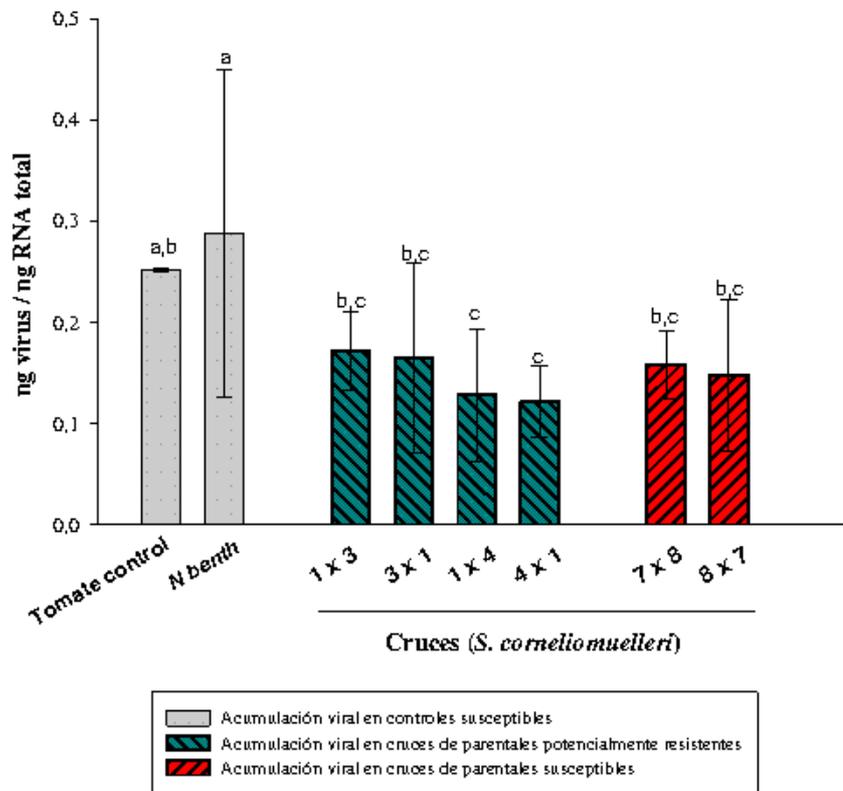


Figura 2.6. Acumulación de PepMV-Sp13 en cruces procedentes de la entrada COM-2 (*S. corneliomuelleri*). La acumulación de virus se cuantificó por dot-blot cuantitativo en hoja apical (a los 12 dpi) a partir de 0,1 g de tejido vegetal. Cada medida resulta de la media de los valores de 10 plantas en ng RNA viral/ng RNA total. a, a,b, b,c y c representan grupos homogéneos de acuerdo al valor medio de acumulación de virus; cruces con la misma letra no muestran diferencias significativas al mismo nivel de probabilidad del 95%, de acuerdo al Test de Tukey's-b.

2.4. Discusión

Desde la aparición de PepMV en Europa en 1999 (van der Vlugt y col., 2000) y su rápida expansión hacia otros países en estos últimos años, los estudios para la búsqueda de fuentes de resistencia natural a este virus únicamente han descrito algunas entradas de silvestres del género *Solanum* parcialmente resistentes, no existiendo ninguna fuente de resistencia completa (Ling y Scott, 2007; Soler y col., 2000b; Soler-Aleixandre y col., 2007). Además, en algunas de las fuentes de resistencia descritas, se desconoce tanto el control genético de la resistencia como su respuesta frente a distintos aislados virales.

De acuerdo con resultados de otros autores, nuestros resultados han puesto de manifiesto las escasas fuentes de resistencia natural a PepMV en el género *Solanum*. De todas las entradas de *Solanum* analizadas en este trabajo, no se encontró ningún caso de resistencia completa a PepMV. En recientes estudios llevados a cabo por Ling y Scott (2007) se encontraron tres entradas de *S. habrochaites* que presentaron niveles de resistencia moderada, siendo la entrada HAB-5 (LA 1731) la más prometedora. El estudio del comportamiento de la descendencia de esta entrada mostró que la descendencia generada no sólo presentaba resistencia a los aislados Ch1 y Ch2 de PepMV sino también a un aislado europeo (PepMV-TX1) (Ling y Scott, 2007). Por otro lado, en escrutinios realizados por Soler-Aleixandre y col. (2007) se describieron varias entradas que presentaban una resistencia moderada al aislado español LE 2002 en las especies *S. chilense* y *S. peruvianun*. En este caso la más prometedora fue una entrada de *S. chilense*, CHI-2 (LA 470), pues se infectaron solamente el 30% de las plantas evaluadas. Sin embargo, bajo nuestras condiciones de trabajo y de acuerdo con nuestros criterios, todas estas entradas descritas como resistentes o parcialmente resistentes se mostraron susceptibles al aislado PepMV-Sp13, presentando unos porcentajes de infección superiores al 80%. Este hecho también fue observado por Ling y Scott (2007) al analizar la entrada CHI-6 (LA 1963, *S. chilense*). Esta entrada estaba clasificada previamente por Soler y Nuez (2000) como parcialmente resistente a los aislados europeos PepMV-LE 2000 y -LE 2002, pero se mostró susceptible a la infección por PepMV-Ch2 y -Ch1. En nuestro estudio, la entrada CHI-6 (LA 1963) también se comportó como susceptible, infectándose el 100% de las plantas inoculadas.

Las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores podrían deberse, entre otras causas, a que existan interacciones diferenciales entre ciertas entradas de *Solanum* con distintos aislados de PepMV. Sin embargo, la variabilidad en la respuesta de algunas de las entradas frente a los diferentes aislados europeos de PepMV no se corresponde con la poca variabilidad que parece existir entre éstos (Hansenn y col., 2008). Los análisis realizados por Pagán y col. (2006) de la estructura genética de poblaciones naturales de PepMV muestran que a pesar de la aparente alta diversidad biológica existe una gran homogeneidad genética entre las poblaciones de PepMV que infectan tomate, tanto en España como en toda Europa (Pagán y col., 2006). No se han realizado estudios para la identificación de qué mutación o mutaciones provocan que un aislado sea más agresivo o sea capaz de superar resistencias ampliando su gama de huéspedes, pero cabe la posibilidad de que se deban a relativamente pocas mutaciones (Pagán y col., 2006; Whitham y Wang, 2004). Esta hipótesis se corresponde con lo observado por Sánchez-Fernández y col., (2006) al identificar un aislado de PepMV (To201) que comparte una homología del 99% con los aislados europeos hasta ahora secuenciados y sin embargo es más agresivo y capaz de infectar *N. tabacum Xanthi-nc* y *N. tabacum Samsun*, especies no incluidas en la gama de huéspedes de PepMV (Vlugt y col., 2002).

Este tipo de comportamiento, en el que las resistencias son específicas de aislado, ha sido observado en otros muchos casos, como la resistencia en *Solanum* spp CMV (Abad y col., 2000; Cillo y col., 2007; Stamova y Chetelat, 2000), resistencia del melón a CMV o ZYMV (Desbiez y Lecoq, 1997; Leroux y col., 1979; Risser y col., 1977) o la resistencia del guisante a PSbMV (Alconero y col., 1986).

Por otro lado, las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo también podrían explicar parte de la discordancia de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores. Por ejemplo, independientemente del aislado, el método de detección utilizado en este trabajo, hibridación molecular, podría ser más sensible o apropiado para el diagnóstico de PepMV en especies silvestres que el ELISA, utilizado en otros trabajos. Aunque los dos métodos citados sean adecuados en la mayoría de los casos, dependiendo del virus puede ser más aconsejable la aplicación de uno u otro (Hull, 2002). Además, otros factores como

la temperatura (25–28°C) o el estado fenológico en el que se encuentre la planta cuando se toma la muestra (15 dpi vs 30-60 dpi) pueden influir directamente sobre el título viral y su estima.

Otro de los aspectos observados durante el escrutinio de germoplasma fue la incapacidad de PepMV-Sp13 de inducir síntomas en las distintas especies de *Solanum* evaluadas. Según Soler y col. (2000a), la manifestación de la enfermedad causada por este virus resulta muy variable dependiendo del estado fenológico de las plantas, de las condiciones ambientales y del aislado viral que las infecta. Bajo nuestras condiciones de trabajo, durante el escrutinio realizado en distintas épocas del año, el aislado Sp13 no fue capaz de inducir síntomas en ninguna de las especies silvestres. El hecho de que la capacidad de inducir síntomas sea dependiente del aislado está de acuerdo con la experiencia de otros autores (Soler y col., 2002; van der Vlugt y col., 2000; Verhoeven y col., 2003). Soler y col. (2002) observaron que en general los aislados procedentes de Perú no inducían síntomas ni en tomate ni en especies del género *Solanum* mientras que los aislados europeos sí. Sin embargo, también observaron que algunos aislados procedentes de plantas de *S. peruvianum* infectadas eran capaces de acumularse en tomate al mismo nivel que aislados europeos e inducir síntomas graves. Hasta el momento no se ha encontrado relación entre genotipos y fenotipos (aislado viral e inducción de síntomas) (Pagán y col., 2006).

Entre el material analizado, el comportamiento más interesante se observó en la entrada COM-2 perteneciente a la especie *S. corneliomuelleri*. Esta entrada mostró una respuesta heterogénea a la infección por PepMV-Sp13 tras repetidas inoculaciones por lo que fue considerada como potencial fuente de resistencia. La mitad de las plantas de esta entrada mostró resistencia a este virus, que se manifestó en una limitación de su acumulación tras la inoculación mecánica con este aislado. De forma consistente con una determinación genética de la resistencia, los cruces obtenidos con los parentales clasificados como potencialmente resistentes 1pR y 4pR obtuvieron valores de acumulación viral significativamente menores que los obtenidos en tomate. Sin embargo, este resultado no parece claramente generalizable, ya que no se pudieron detectar otras diferencias significativas entre los cruces que procedían de parentales clasificados como potencialmente resistentes y los cruces que procedían de parentales

clasificados como susceptibles. Estos resultados sugieren que en la entrada COM-2 existan varios genes con efectos aditivos relativamente pequeños sobre la resistencia a PepMV-Sp13. Se trataría, pues, de una resistencia parcial o cuantitativa (Kang y col., 2005; Parlevliet, 1977). La obtención de una F2 a partir de estos cruces y el análisis de un alto número de plantas en la descendencia obtenida podría proporcionar información sobre el número genes implicados en el control de la resistencia y así validar la hipótesis de una resistencia poligénica.

Los esfuerzos realizados hasta el momento para la búsqueda de fuentes de resistencia a PepMV sólo han descrito resistencias parciales, y además parece que en algunos casos se trata de resistencias específicas de aislado. Como el caso de la entrada COM-2, clasificada por Ling y Scott (2007) como susceptible al aislado PepMV-Ch2. Las discrepancias observadas entre resultados obtenidos por diferentes autores crean la necesidad de realizar estudios adicionales para confirmar los fenotipos de resistencia y su comportamiento frente a diferentes aislados.

La obtención de plantas que posean altos niveles de resistencia cuando sólo hay a nuestra disposición fuentes de resistencia parcial o poligénica es un desafío al que se enfrentan fitopatólogos y mejoradores. En estos casos, para la obtención de líneas resistentes, la meta no debe ser crear plantas con inmunidad total al virus, sino mantener niveles reducidos de acumulación de virus de modo que no cause pérdidas económicas significativas. Además, hay autores que sugieren que este tipo de resistencias que limitan pero no impiden la acumulación de virus son más duraderas en campo (Lecoq y col., 2004; Padgget y col., 1990; Palloix y col., 2009). Según Palloix y col. (2006) la identificación de los componentes que controlan la resistencia parcial y la acumulación de éstos en una línea de mejora abre la posibilidad de construir nuevos genotipos con altos niveles de resistencia. Por ejemplo, en el patosistema CMV/pimiento, la combinación de más de un mecanismo de resistencia (resistencia a la acumulación, resistencia al movimiento a larga distancia y tendencia al escape) en una línea de mejora dio lugar a una resistencia efectiva en campo (Palloix y col., 2006).

Paralelamente, la búsqueda de fuentes de resistencia podría extenderse al análisis de colecciones de mutantes. La mutagénesis inducida mediante la aplicación de sustancias químicas o diferentes tipos de radiación sigue siendo una

fuelle a explorar para obtener nuevas resistencias. En el sistema experimental *Arabidopsis thaliana*, ya han sido identificados factores requeridos para la replicación o expresión de genes virales mediante el escrutinio de mutantes (revisado en Gómez y col., 2009a)

CAPÍTULO 3

Desarrollo de un vector viral derivado de PepMV

CAPÍTULO 3.- DESARROLLO DE UN VECTOR VIRAL DERIVADO DE PEPMV

3.1. Antecedentes

La posibilidad de manipular el genoma de un virus *in vitro* mediante clones infectivos permite explotar la capacidad de algunos virus para expresar proteínas foráneas, no codificadas de forma natural por el genoma viral (Scholthof y col., 1996). En la actualidad existen varios ejemplos de virus utilizados como vectores virales (Jia y col., 2003; Lico y col., 2008; Marillonnet y col., 2005; Porta y Lomonosoff, 2002). Entre los vectores virales de plantas que se han desarrollado, los más estables y eficientes son los que están basados en virus de RNA compuestos por una sola cadena de sentido positivo. Algunos ejemplos relevantes son los derivados de TMV (*Tobamovirus*) (Gleba y col., 2007; Jia y col., 2003; Marillonnet y col., 2005) y de PVX (*Potexvirus*) (Baulcombe y col., 1995; Chapman y col., 1992b).

En el presente capítulo, basándonos en lo demostrado para otros potexvirus y siguiendo como modelo las construcciones generadas con PVX (Baulcombe y col., 1995), nos propusimos generar un clon agroinfectivo de PepMV a partir del cual desarrollar un vector viral. Previamente al desarrollo del vector viral se consideró importante realizar un estudio sobre la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV. Adicionalmente, se realizó un estudio sobre el posible efecto que podría tener la alteración de las regiones 5' y 3' terminales del gen CP sobre la eficiencia del vector viral. Con estos datos, se diseñó, construyó y caracterizó un vector viral que expresa el gen *GFP*. Como este vector resultó tener limitaciones importantes, se examinó la posibilidad de expresar *GFP* desde el genoma de PepMV utilizando una secuencia de control heteróloga.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Aislados virales y material vegetal

El aislado viral empleado para el desarrollo del clon agroinfectivo (PepMV-Sp13) se revivió a partir de material infectado y liofilizado de *N. benthamiana* (Aguilar y col., 2002). Para ello, se inocularon plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 25 días (5-6 hojas). Tras la inoculación las plantas fueron mantenidas en un invernadero con unas condiciones de día y noche de 16 h a 25-26° C y 8 h a 19° C, respectivamente.

Para el desarrollo de la construcción quimérica pBPepGFP Δ CPCh2 se utilizó el clon PeMU08/44, que procede de un aislado de campo tipo PepMV-Ch2 (Gómez y col. 2009b).

3.2.2. Desarrollo de un clon agroinfectivo de PepMV

Para la generación de un clon agroinfectivo de PepMV se siguieron los pasos que se detallan a continuación.

3.2.2.1. Síntesis de un cDNA complementario a la longitud total del genoma

La generación del cDNA correspondiente a la longitud total del gRNA de PepMV se realizó por RT-PCR usando como molde el RNA total obtenido con TRI-reagent (apartado 3.2.8) e iniciadores con secuencias nucleotídicas específicas de los extremos 5' y 3' del genoma, diseñados en base a la secuencia publicada del aislado de PepMV-Sp13 (Aguilar y col., 2002). Los iniciadores fueron: CE-42 complementario al extremo 5' de la secuencia del virus, que contiene una diana *Bam* HI, y CE-43, complementario al extremo 3', que contiene una cola de 20 dTTP seguida de las dianas de restricción: *Xma* I, *Sma* I, *Apa* I, *Sac* II y *Kpn* I (Tabla 3.1).

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se emplearon 3 μ l (\approx 2 μ g) de RNA total. La reacción de transcripción reversa se hizo en un volumen final de 20 μ l que contenía 4 μ l del tampón de transcriptasa reversa concentrado 5 veces, 7,5 μ l del iniciador CE 43 10 μ M, 1,5 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1,5 μ l de DTT 100 mM, 20 U de inhibidor de RNAsas (Roche) y 100 U de transcriptasa reversa (Roche). Esta mezcla se incubó a 43°C durante 70 min. Tras la reacción de

retrotranscripción el producto se purificó utilizando columnas GENECLEAN turbo (Q-Biogene) para eliminar las sales de la reacción.

La primera cadena del cDNA se amplificó por PCR en un volumen final de 50 μ l. En la PCR se utilizaron 6 μ l del producto de transcripción reversa, 0,8 μ M de cada iniciador (CE 42 y CE 43), 200 μ M de la mezcla de dNTPs y 3,75 U de Pfu Pyrobest (Takara) en el tampón suministrado por el fabricante, en un volumen final de 50 μ l. El DNA se desnaturalizó durante 2 min a 94°C y se realizaron 20 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación a 55°C y 12 min de polimerización a 72°C. Al final de los 20 ciclos se dio un tiempo de elongación de 10 min a 72°C.

Tabla 3.1. Iniciadores empleados en la amplificación del cDNA de longitud total de PepMV.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-42	5'- CGCGGATCCGGAAAACAAAATAAATAA -3'	54
CE-43	3'- GGGGTACCGCGGGCCCGGG(T)20-5'	62

3.2.2.2. Clonaje en pTOPO-XL

Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron de un gel de agarosa al 0,8% con cristal violeta recomendado para la purificación de fragmentos de 3-10 kb que ofrece el kit TOPO-XL PCR *Cloning Kit* (Invitrogen).

Una vez purificadas las bandas se sometieron a una reacción de *A-tailing* con el fin de añadir un dATP en los extremos 5' del inserto y prepararlo para la ligación en el pTOPO-XL. La adición de los dATPs en los extremos se realizó en un volumen de reacción de 20 μ l. Para ello se emplearon 16 μ l (\approx 150 ng) del producto de PCR purificado, 0,8 μ l de dATP a una concentración final de 0,2 mM, 2 μ l de tampón 10x de reacción de la Taq polimerasa y 10 unidades de Ecotaq (Ecogen). La mezcla se incubó a 72°C durante 30 min. Finalizada la incubación la reacción fue purificada con el kit ULTRAKIT™ 15 (MO BIO) para la eliminación de sales.

La banda purificada se sometió a una reacción de ligación estándar siguiendo el manual del Kit pTOPO-XL. El producto final fue transformado en

Escherichia coli TOP10 mediante electroporación (*Gene pulser II* y *capacitance extender*; Bio-Rad laboratories, CA, USA) siguiendo las instrucciones del kit.

Las colonias obtenidas fueron analizadas tras su multiplicación en medio LB (Luria-Bertoni). La preparación del DNA plasmídico se llevó a cabo mediante cultivos a partir de colonias aisladas en 3 ml de medio LB a 37°C toda la noche. Los cultivos se centrifugaron durante 3 min a 7.500 rpm a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 250 µl de tampón de resuspensión 1 (Tris-Cl 50 mM pH8,0; EDTA 10 mM; 100µg/ml de RNase A, Qiagen). Posteriormente se añadieron 250 µl de tampón de lisis 2 (NaOH 200 mM, 1% SDS), se agitó 6-7 veces y se añadieron 250 µl del tampón de neutralización 3 (AcNa 3M pH5,5), se agitó 6-7 veces y se dejó incubar en hielo 5 min. Tras la incubación se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se añadió 1 ml de Et-OH 100% para precipitar el DNA. Seguidamente se centrifugó a 14.000 rpm, 15 min a 4°C. El pellet final se resuspendió en 50 ml H₂O estéril.

Una alícuota del DNA obtenido así fue digerido con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI (New England Biolabs) para realizar un análisis de restricción y comprobar la dirección del inserto. Los clones portadores del inserto fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Xma* I, dianas de corte único situadas en los extremos del genoma del virus y que liberan al inserto del vector preparándolo así para el clonaje en pBIN61. Los clones seleccionados fueron denominados pTPepXL6, pTPepXL7 y pTPepXL9.

3.2.2.3. Clonaje en pBIN61

El vector binario pBIN61 y los clones portadores de los insertos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Xma* I. Para ello se emplearon 1,500 µg de DNA en cada caso, a los que se le añadieron 10 unidades de cada enzima y el tampón recomendado por el fabricante para digestiones dobles en un volumen final de 50 µl. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 37°C. Los DNAs digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,7%, se recuperaron las bandas de interés del gel y se purificaron utilizando el kit GENCLEAN Turbo (Q-biogene). Una vez purificadas las bandas se estimó la concentración del DNA por electroforesis.

En las ligaciones se emplearon 100 ng de vector defosforilado y 100 ng de inserto (ratio 1:2) a los que se le añadieron 40 unidades de ligasa (T4 DNA ligase; New England Biolabs) más el tampón adecuado en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche para obtener el máximo número de transformantes. El producto de la ligación fue concentrado a un volumen final de 3 μ l por medio de precipitación etanólica sin sales con glicógeno (Roche) y se transformó en *E. coli* TOP10 mediante electroporación.

Para la electroporación se siguieron las condiciones estándar recomendadas para *E. coli* (25 μ F de capacitancia, 200 Ω de resistencia, 2500 V) en cubetas de 0,2 cm. Se añadieron 1,5 μ l de la reacción de ligación concentrada a 40 μ l de células competentes. Después de la electroporación, las células se transfirieron a 1 ml de LB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación suave (100 rpm), para dejar que las células pudieran expresar el gen de resistencia al antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas Petri con medio LB-Agar que contenían kanamicina (50 ng/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

La preparación del DNA plasmídico se realizó del mismo modo que para los clones de pTOPO-XL, es decir, a partir de colonias aisladas en 3 ml de LB. El pellet en este caso fue resuspendido en 30 μ l.

Alícuotas de 4 μ l del DNA obtenido fueron digeridas con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI (New England Biolabs) para realizar el análisis de restricción. De cada reacción de ligación fueron seleccionados de nuevo tres clones a los que denominamos: pBPepXL6.1, pBPepXL6.2, pBPepXL6.3, pBPepXL7.7, pBPepXL7.8, pBPepXL7.9, pBPepXL9.1, pBPepXL9.2 y pBPepXL9.3.

3.2.2.4. Construcción pT7PepXL6

Con el fin de situar el cDNA de PepMV bajo el control del promotor de transcripción T7 se realizó una nueva reacción de PCR. Se tomó como molde el clon pTPepXL6 (resultado del apartado 3.2.2.2) y se amplificó la longitud total del genoma con la pareja de iniciadores CE-484 (el cual incluye la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7) (5'-AATACGACTCACTATAGGGAAAACAAAATAAATAA-3', Tm: 51°C; en subrayado

aparece la secuencia promotora) y CE-43 (Tabla 3.1). La PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la descrita en el apartado 3.2.2.1. El fragmento resultante fue clonado en el vector pTOPO-blunt dando lugar al clon pT7PepXL6.

3.2.3. Construcción pTOPO-GFP

El clon pTOPO-GFP, portador del gen que codifica la GFP, se obtuvo a partir de la amplificación del ORF de la GFP del plásmido PVX:GFP 208 (Baulcombe y col., 1995). El ORF fue amplificado con los iniciadores CE-236, que contiene diana *Sac* II y CE-227 (Tabla 3.2), que contiene una diana *Mlu* I, con las secuencias nucleotídicas específicas de los extremos 5' y 3' del gen *GFP*, respectivamente. La PCR se llevó a cabo con 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. Como molde de las PCR se utilizó el plásmido PVX:GFP 208 (Baulcombe y col., 1995). La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: un ciclo durante 2 min a 94°C, 20 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 53°C y 1 min de polimerización a 72°C. Al final de los 20 ciclos se dio un tiempo de elongación de 6 min a 72°C. El producto resultante fue directamente clonado en el pTOPOblunt dando lugar a la construcción pTOPO-GFP.

Tabla 3.2. Iniciadores empleados para generación del clon pTOPOGFP.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-236	5'-CGCCGCGGATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3'	59
CE-227	3'-GCGACGCGTTTATTTGTATAGTTCATCCATG-5'	55

3.2.4. Construcciones de DNA derivadas del clon infectivo de PepMV

Para la realización de los estudios sobre la implicación de la CP en la multiplicación viral fueron desarrolladas una serie de construcciones que dieran lugar a mutantes de PepMV que no expresan la CP, denominadas pT7PepXL6agg y pBPepGFP Δ CP1, 2, 3, y 4 (a las que se les introducen diferentes modificaciones) y pT7PepGFP Δ CP1, además de la construcción pBINCPep.5, en la cual se encuentra clonada la CP de PepMV. Para el desarrollo del vector viral se generaron dos construcciones portadoras del gen *GFP* que darían lugar a dos

versiones de un mismo vector, denominadas: pBPep501 y pBPep5.128. Para el ensayo de un promotor heterólogo fue generada la construcción pBPepGFP Δ CPCh2. En el Anexo 2, se presenta una tabla la cual reúne todas las construcciones virales (denominación y esquema) utilizadas en este capítulo. A continuación se presenta con detalle los pasos realizados para la obtención de cada una de las construcciones mencionadas.

3.2.4.1. Construcción pT7PepXL6agg

La obtención del fragmento PepXL6agg se realizó por mutagénesis dirigida utilizando el método de PCR solpante. La mutación consistió en el cambio del segundo nucleótido del codón de inicio de la traducción de la CP, de ATG a AGG. Se llevaron a cabo tres PCRs (Figura 3.1). En la PCR1 se amplificaron 5.640 nt, los cuales contienen el gen de la replicasa, el TGB y los 11 primeros nt de la proteína de la cápsida; los iniciadores empleados fueron CE-42 (Tabla 3.1) y CE-199 (Tabla 3.2) portador de la mutación deseada. Paralelamente, en la PCR2 se amplificó la CP completa y el extremos 3'UTR utilizando los iniciadores CE-198 (con el mismo cambio de nucleótido que el CE199) y el CE-43 (Tabla 3.1).

Como molde de las PCR1 y 2 se utilizó el plásmido pTPepXL6 (obtenido en el apartado 3.2.2.2). Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,8 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: un ciclo durante 2 min a 94°C, 15 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 51°C y 10 min (PCR1) o 4 min (PCR2) de polimerización a 72°C. Al final de los 15 ciclos se dio un tiempo de elongación de 12 min (PCR1) o 6 min (PCR2) a 72°C.

Para la PCR3 el molde utilizado fue el producto mezclado de las PCRs 1 y 2 previamente purificados. La mezcla de PCR3 se desnaturalizó durante 2 min a 94°C y se realizaron en primer lugar 3 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 40°C y 12 min de polimerización a 72°C, posteriormente se sometió 15 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de

hibridación a 52°C y 12 min de polimerización a 72°C. Al final de los 15 ciclos se dio un tiempo de elongación de 12 min a 72°C.

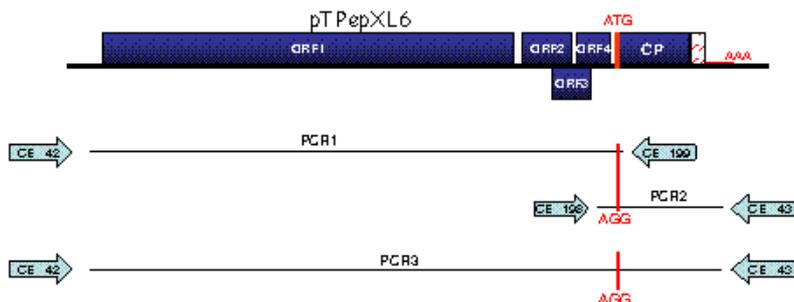


Figura 3.1. Estrategia utilizada para la generación del fragmento PepXL6agg. Se indica la posición y orientación de los iniciadores.

El fragmento resultante fue clonado en el vector pTOPO-XL, dando lugar al clon pTPepXL6agg. A continuación para situar la construcción bajo el control del promotor de transcripción T7, se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.2.2.4. El fragmento resultante fue clonado en el vector pTOPO-blunt dando lugar al clon pT7PepXL6agg.

Tabla 3.3. Iniciadores empleados para generación del mutante PepXL6agg. Los nucleótidos subrayados introducen la mutación correspondiente.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE198	5'-CAATAACAATCAGGCCTGACAC-3'	48
CE-199	3'-GTGTCAGGCCTGATTGTTTATTG-5'	48

3.2.4.2. Construcciones pBPepGFPΔCP

Se generaron cuatro construcciones diferentes en las que la CP de PepMV fue reemplazada por la GFP: pBPepGFPΔCP1, pBPepGFPΔCP2, pBPepGFPΔCP3 y pBPepGFPΔCP4. Los principales pasos para la generación de dichas construcciones fueron los siguientes:

Paso 1: PCR solapante que diera lugar a un fragmento GFP-3'UTR (en el caso de las construcciones 1 y 2) o fragmento GFP-120.3'UTR (en el caso de las construcciones 3 y 4), portador del gen de la GFP fusionado al extremo 3' de PepMV (Figura 3.2).

Para la obtención del fragmento GFP-3'UTR, se amplificó en primer lugar el gen de la GFP (PCR1) con los iniciadores CE-236 (Tabla 3.2) y CE-456 (Tabla 3.4), el cual incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3' UTR de PepMV. Paralelamente, en la PCR 2 se amplificó el extremo 3'UTR de PepMV utilizando los iniciadores CE-457 (Tabla 3.4), que incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3' del gen de la GFP y CE-43 (Tabla 3.1). Los iniciadores CE-456/CE-457 complementarios entre sí, permitieron el solapamiento de los fragmentos anteriores utilizando la combinación de los iniciadores CE-236 y CE-43.

En el fragmento GFP-120.3'UTR se incluyeron 120 nt adicionales del extremo C- terminal de la CP. Este fragmento fue generado del mismo modo que GFP-3'UTR (Figura 3.2) utilizando como iniciadores complementarios CE-460 y CE-461.

Como molde de la PCR1 se utilizó el plásmido pTOPOGFP y como molde de la PCR2 se tomó el plásmido pTPepXL6 (obtenido en el apartado 3.2.2.2). Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en el apartado 3.2.4.1 ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la temperatura de los iniciadores (T_m) utilizados y el tamaño del fragmento amplificado en cada caso.

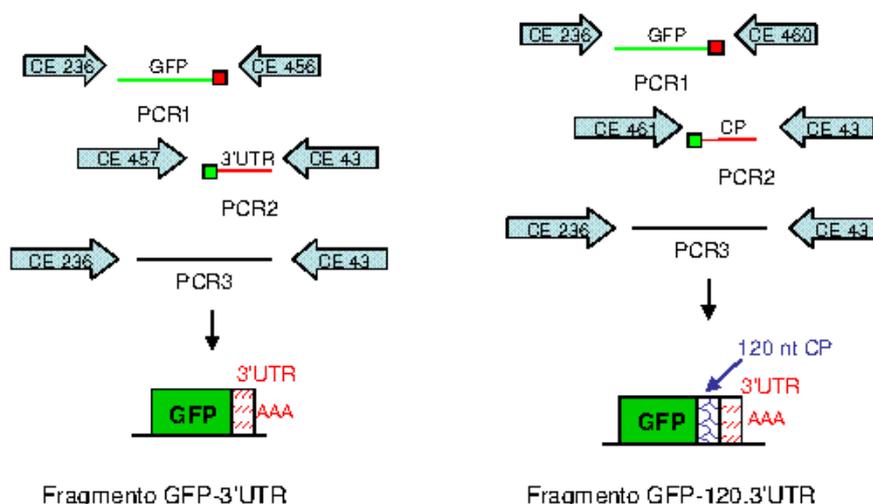


Figura 3.2. Estrategia utilizada para generación de los fragmentos GFP-3'UTR y GFP-120.3'UTR. Se indica la posición y orientación de los iniciadores en cada caso.

Paso 2: PCRs solapantes para la generación de fragmentos PepGFP Δ CP

Los fragmentos PepGFP Δ CP fueron generados a través de PCRs solapantes. En la figura 3.3 se especifican los plámidos, regiones amplificadas e iniciadores específicos utilizados en cada caso.

En la PCR1 se amplificaron 1.100 nt del genoma de PepMV los cuales contienen parte del TGB y el inicio del ORF de la CP con los iniciadores Pep303 y CE-458/CE-351 (Tabla 3.4) según el caso, que incluyen una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' del gen del *GFP*. Para la obtención de los fragmentos PepGFP Δ CP1 y 3 se tomó como molde de la PCR1 el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-458, que sitúa el ORF de la GFP (codón de inicio modificado a AGG) a 36 nt del codón de inicio de la CP. Para la obtención de los fragmentos de PepGFP Δ CP 2 y 4 como molde de la PCR1 fue utilizado el plásmido pTPepXL6agg con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-351, que sitúa el ORF de la GFP (con su propio ATG) a 38 nt del codón de inicio de la CP (codón de inicio modificado a AGG), y además incluye una diana *Sac* II justo aguas arriba del codón de inicio del ORF de la GFP.

En la PCR2 se amplificó el fragmento GFP-3'UTR o GFP-120.3'UTR utilizando los iniciadores CE-459 (en el caso de PepGFP Δ CP 1 y 3) o CE-352 (en el caso PepGFP Δ CP 2 y 4) (Tabla 3.4) que incluyen una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' de la CP y el CE-43. Los iniciadores CE-458/CE-459 y CE-351/CE-353 complementarios entre sí, permitieron el solapamiento de los fragmentos anteriores utilizando la combinación de los iniciadores Pep303 y CE-43.

Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μ M de los iniciadores, 200 μ M de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en el apartado 3.2.4.1 ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la T_m de los iniciadores utilizados y el fragmento amplificado en cada caso.

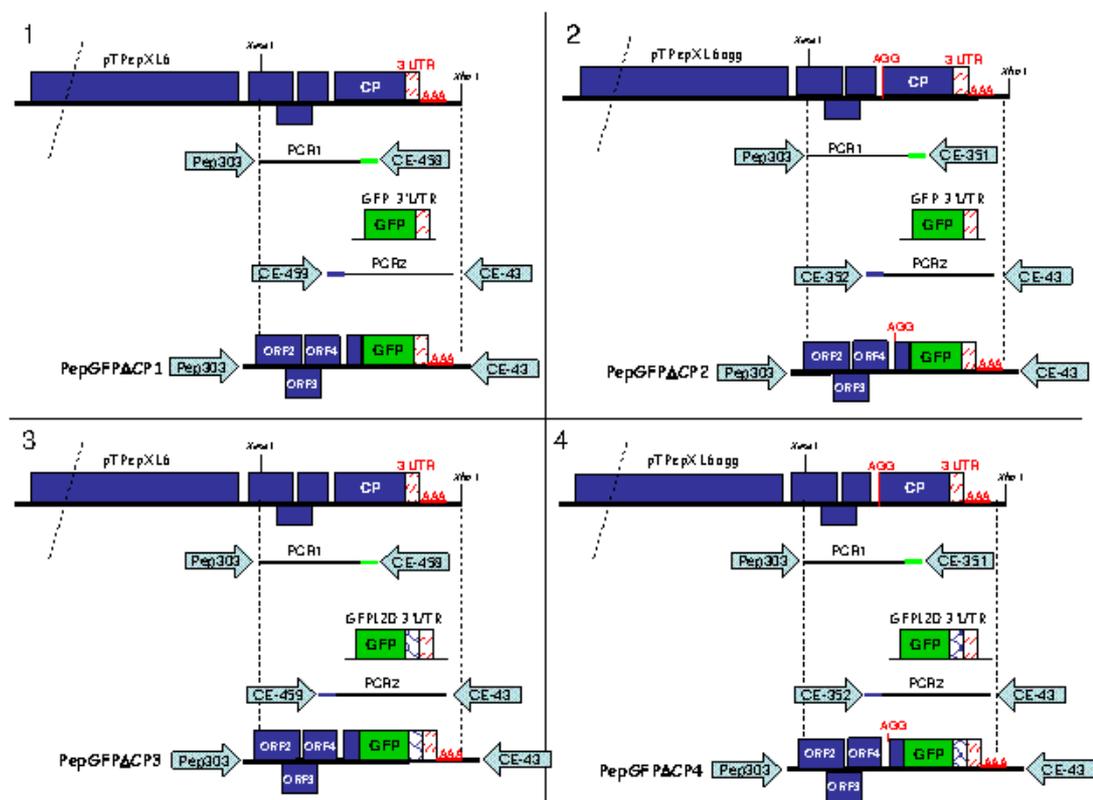


Figura 3.3. Esquema seguido para la generación de los mutantes PepGFP Δ CP. Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores en cada caso y los sitios de restricción utilizados. 1) PepGFP Δ CP1, 2) PepGFP Δ CP2, 3) PepGFP Δ CP3 y 4) PepGFP Δ CP4.

Tabla 3.4 Iniciadores utilizados para la generación de los mutantes PepGFP Δ CP.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
Pep303	5'-CGGAATTGCAGGCACTGGG-3'	52
CE-351	3'- CTCCTTTACTCATCCGCGGGCACTTGAAGTGGCAGC -5'	65
CE-353	5'- GCTGCCACTTCAAGTGCCCGCGGATGAGTAAAGGAG -3'	65
CE-456	3'- CTGATTAAGTTTCGAGTGTTTATTTGTATAGTTCATC -5'	54
CE-457	5'- GATGAACTATACAAATAAACACTCGAACTTAATCAG -3'	54
CE-458	3'- TTCTTCTCCTTTACTCCTACTTGAAGTGGCAGCAAC -5'	59
CE-459	5'- GTTGCTGCCACTTCAAGTAGGAGTAAAGGAGAAGAA -3'	59
CE-460	3'- CTTTTGCCTAGCCAAGGCTTATTTGTATAGTTCATC-5'	57
CE-461	5'-GATGAACTATACAAATAAGCCTTGGCTAGGCCAAAAG-3'	57

Paso 3: Los fragmentos resultantes de la PCR 3 fueron clonados en el vector pTOPO-blunt y posteriormente secuenciados. Una vez confirmadas las secuencias, los clones fueron digeridos con *Xmn* I y *Xho* I (flanquean la región modificada dentro del pTPepXL6) y subclonados en pTPepXL6. De este modo se obtuvieron los clones: pTPepGFPΔCP1, 2, 3 y 4. Por último los fragmentos fueron situadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61, entre las dianas *Bam*HI y *Xma* I dando lugar a los clones pBPepGFPΔCP1, 2, 3 y 4.

3.2.4.3. Construcción pT7PepGFPΔCP1

Para la generación de la construcción pT7PepGFPΔCP1 se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.2.2.4, utilizando en este caso como molde el clon pTPepGFPΔCP1, obtenido en el apartado anterior.

3.2.4.4. Construcción pBINCPep

La construcción pBINCPep, portadora del gen que codifica la CP de PepMV, se obtuvo a partir de la amplificación del ORF de la CP del plásmido pTPepXL6 con los iniciadores CE-356, complementario al extremo 5' de la CP, y un oligo d(T) (Tabla 3.6). El fragmento obtenido fue clonado en pBIN61 previamente digerido con *Sma* I que permite la ligación de extremos romos.

La amplificación de la CP se llevó a cabo por PCR. Se utilizaron 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara) ,0,5 μM de los iniciadores, 200 μM de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μl. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: un ciclo durante 2 min a 94°C, 20 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 s de hibridación a 40°C y 2 min de polimerización a 72°C. Al final de los 20 ciclos se dio un tiempo de elongación de 5 min a 72°C.

Tabla 3.6. Iniciadores empleados para generación del clon pBINCPep.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-356	5'-CGCGGATCCCAATCATGCCTGACAC-3'	58
Oligo d(T)	d(T)16	40

3.2.4.5. Construcciones PepMV:GFP: pBPep501 y pBPep5.128

Fueron generadas dos construcciones de PepMV portadoras del gen *GFP*: pBPep501 y pBPep5.128. La estrategia utilizada en los dos casos fue básicamente la misma que para la generación de las construcciones pBPepGFPΔCP, es decir a través de PCRs solapantes y posterior subclonaje en pTPepXL6 (apartado 3.2.4.2., a partir del paso dos). Para la generación de la construcción pBPep501 (Figura 3.4) se tomaron como moldes en la PCR1 el plásmido pTPepGFPΔCP1 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-502 (Tabla 3.7) y en la PCR2 el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores CE-501 (Tabla 3.7) y CE-43.

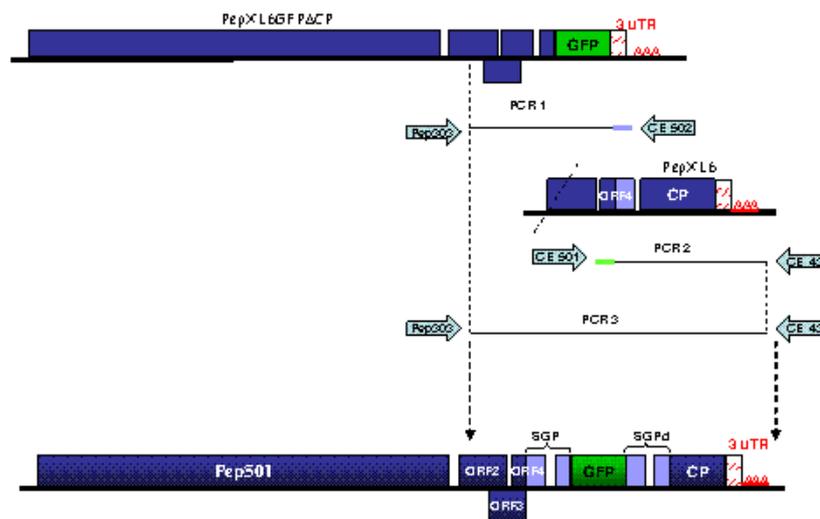


Figura 3.4. Esquema seguido para la generación de la construcción pBPep501. Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores.

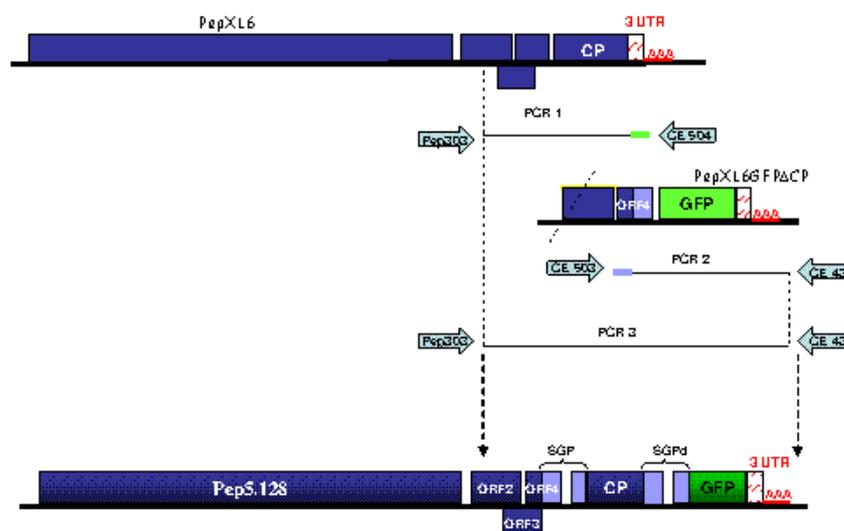


Figura 3.5. Esquema seguido para la generación de la construcción pBPep5.128. Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores.

Para la generación de la construcción pBPep5.128 (Figura 3.5) se tomaron como moldes en la PCR1, el plásmido pTPepXL6 con la combinación de iniciadores Pep303 y CE-504 (Tabla 3.7) y en la PCR2 el plásmido pTPepGFPΔCP1 con la combinación de iniciadores CE-503 (Tabla 3.7) y CE-43.

Tabla 3.7. Iniciadores empleados para generación de los mutantes Pep501 y Pep5.128.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-501	GAAAACTTAACCCGTTCCAAGTTATTTGTATAGTTCATC	56
CE-502	GATGAACTATACAAATAACTTGGAACGGGTAAAGTTTTC	56
CE-503	GAAAACTTAACCCGTTCCAAGTTAAAGTTCAGGGGGTG	58
CE-504	CACCCCCTGAACTTTAACTTGGAACGGGTAAAGTTTTC	58

Las PCRs se llevaron a cabo con 5 ng de molde, 2,5 U de Pfu Pyrobest (Takara), 0,4 μM de los iniciadores, 200 μM de los dNTPs en el tampón suministrado por el fabricante y en un volumen final de 50 μl. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las utilizadas en el apartado 3.2.4.1 ajustando las condiciones de temperatura de hibridación y tiempos de polimerización a la Tm de los iniciadores utilizados y el fragmento amplificado en cada caso.

3.2.4.6. Construcción pBPepGFPΔCPCh2

El fragmento PepGFPΔCPCh2 fue el resultado de la sustitución de la región seleccionada como SGP de la CP de PepMV-Sp13 por la de PepMV-Ch2 (PeMU08/44). Para ello se siguieron los pasos que se detallan a continuación y se muestran en la figura 3.6:

1º) Amplificación del SGP de PepMV-Ch2 con la pareja de iniciadores CE-497 (incluye una secuencia adicional de 17 nt complementarios al extremo 3' del ORF 4 de PepMV-Sp13) y CE-498 (incluye una secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 5' del ORF de la GFP). Como molde de la reacción se utilizó el plásmido PeMU08/44 (apartado 3.2.1).

2º) Amplificación del ORF de la GFP con los iniciadores CE-499 (incluye secuencia adicional de 18 nt complementarios al extremo 3' de SGP de PepMV-

Ch2) y CE-43. Como molde de la reacción se utilizó el plásmido pTPepGFPΔCP1.

3°) PCR solapante de los fragmentos 1 y 2 obtenidos en los pasos anteriores utilizando la pareja de iniciadores CE-497 y CE-43.

4°) Amplificación de parte del TGB de PepMV-Sp13 con los iniciadores Pep303 y CE-500 (incluye una secuencia adicional de 16 nt complementarios al extremo 5' del SGP de PepMV-Ch2).

5°) PCR solapante de los fragmentos obtenidos en los pasos 3 y 4 utilizando la pareja de iniciadores Pep303 y CE-43.

6°) Clonaje de la PCR resultado del paso 5 en pTOPOblunt

7°) Subclonaje a pTPepXL6 entre las dianas *Xmn* I y *Xho* I, dando lugar a la construcción pTPepGFPΔCP1.

8°) Subclonaje a pBIN61 entre las dianas *Bam*H I y *Xma* I.

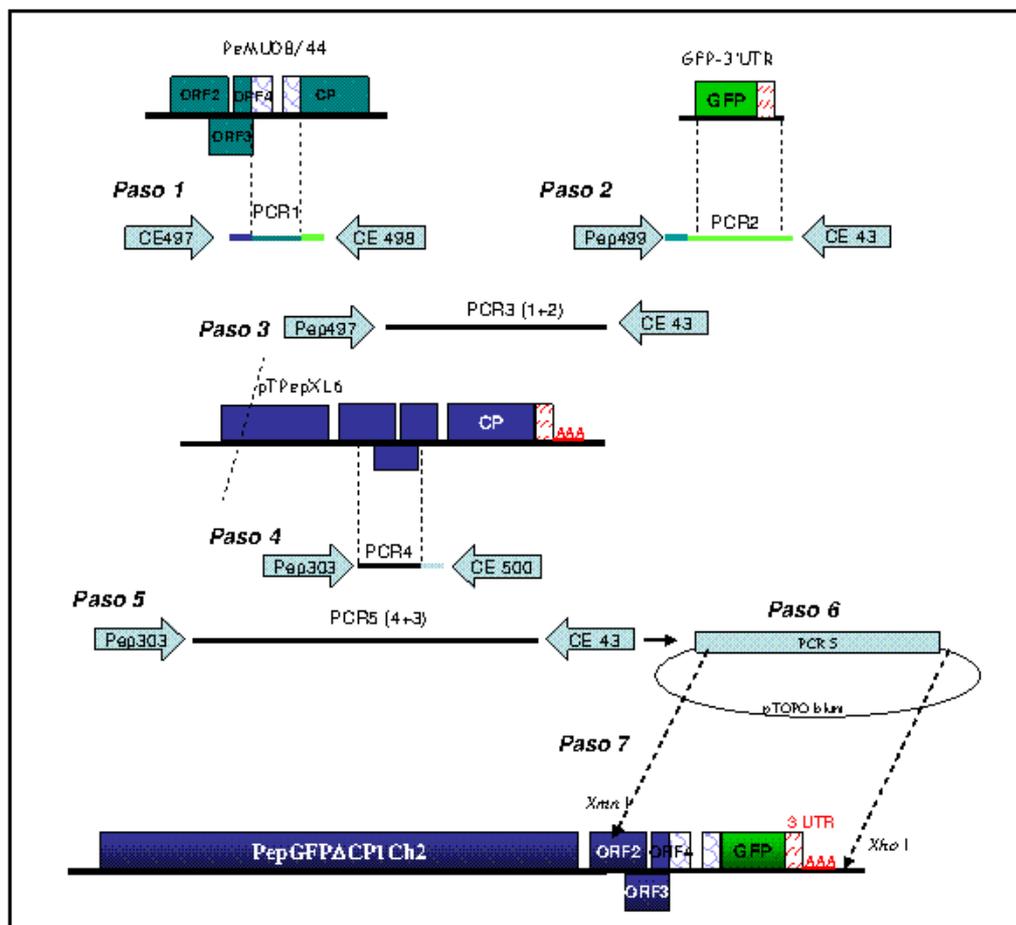


Figura 3.6. Pasos seguidos para el desarrollo de la construcción pBPepGFPΔCPCh2. Se indican los moldes utilizados, la región amplificada, la posición y orientación de los iniciadores en cada caso y los sitios de restricción utilizados en el subclonaje.

Tabla 3.8. Iniciadores empleados para generación de la construcción PepGFPΔCPCh2.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
CE-497	GCAATAAACTTCTCCCCTTGGAACGGGTTAAGT	58
CE-498	TTCTTCTCCTTTACTCATATCTGATGGGTTAGAAGC	57
CE-499	GCTTCTAACCCATCAGATATGAGTAAAGGAGAAGAA	57
CE-500	ACTTAACCCGTTCCAAGGGGAGAAGTTTATTGC	58

3.2.5. Transcripciones *in vitro*

Los clones pTPepXL6, pTPepXL6agg y pTPepGFPΔCP previamente digeridos con la enzima *Kpn* I fueron utilizados como molde en la reacción de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa de T7 en presencia de estructuras cap (m^7G^5pppNp). Para la reacción de transcripción se utilizó el kit de Promega, RiboMAX™ *Large Scale RNA Production Systems*.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl con 1 µg de DNA, 6 µl de rNTPs (25 mM ATP, CTP y UTP y 2 mM GTP), 10 µl de T7 RNA polimerasa mix, 40 mM de Ribo m^7G CAP análogo en 4 µl del tampón suministrado por el fabricante. La mezcla se incubó durante 3 h a 37°C. La presencia de los transcritos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los transcritos obtenidos fueron utilizados para inocular protoplastos de *N. benthamiana*.

3.2.6. Aislamiento e inoculación de protoplastos de *N. benthamiana*.

El protocolo de aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* que se utilizó es una adaptación del protocolo descrito en *Plant Virology Protocols*, volumen 81 (Weston y Turner, 1998). Para el aislamiento de protoplastos de *N. benthamiana* se partió de plantas de 5 semanas de edad cultivadas en fitotrón con un fotoperiodo de 16 h de luz a 25°C y 8 h de oscuridad a 18°C. Las hojas totalmente expandidas se esterilizaron superficialmente por inmersión, durante 30 min, en una solución de hipoclorito sódico al 10% a la que se le añadieron 2-3 gotas de Tween-20. La solución desinfectante se eliminó mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 min respectivamente) con agua destilada estéril. Los procesos de desinfección y lavado se realizaron bajo una suave y discontinua

agitación manual. Una vez desinfectadas, se realizaron cortes transversales desde el nervio central hacia el borde de la hoja, dejando una distancia aproximada entre cortes de 1-2 mm. Las hojas cortadas fueron colocadas (haz hacia arriba) en placas Petri grandes (15 cm de diámetro), conteniendo 25 ml de tampón MMC (13% Manitol, 5mM MES y 10 mM CaCl₂, pH 5,8) y se mantuvieron así 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el tampón MMC y se añadieron 25 ml de solución enzimática por placa. La solución enzimática consistió en 0,5 g *Onozuka Cellulase R-10 (Yakult Honsha)*, 0,25 g *Macerozime R-10 (Duchefa Biochemies)*, y 100 ml tampón MMC, a pH 5,8. La esterilización del medio enzimático se realizó por filtración a través de filtros de 45 µm de tamaño de poro (*Millipore Corporation, Bedford, Madison, USA*). Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25°C toda la noche. Finalizada la digestión, la suspensión cruda de protoplastos fue retirada de las placas con cuidado de no coger restos vegetales, y se distribuyó en tubos falcon de 50 ml. Se centrifugaron a 1.000 rpm durante 4 min a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el precipitado en 15 ml de tampón MMC. La suspensión de protoplastos fue centrifugada de nuevo a 1.000 rpm durante 4 min a 20°C. El precipitado resultante fue resuspendido en 6 ml de tampón MMC y situado sobre un colchón de sacarosa (tubo falcon de 15 ml el cual contenía 7 ml de sacarosa al 20,5%). Tras una centrifugación a 1.500 rpm durante 15 min, el anillo de protoplastos formado en la interfase se recogió con una pipeta Pasteur, se resuspendió en 50 ml de tampón de electroporación frío (150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0,4 M Manitol y 10 mM Hepes, pH 5,8) y se procedió al recuento. Se centrifugaron a 1.000 rpm durante 4 min y el precipitado se resuspendió de modo que contuviese 1x10⁶ protoplastos/ 500 µl de tampón de electroporación. Se repartieron en tubos eppendorf y se mantuvieron en hielo.

Los protoplastos fueron inoculados con RNA transcrito mediante electroporación. Para ello, se mezclaron 5 y/o 10 µg de RNA transcrito con 1x10⁶ de protoplastos. La electroporación se llevó a cabo en el *Gene pulser II y capacitance extender* (Bio-Rad laboratories, CA, USA) a 1.000 µF, 180 V y 100 Ω. Tras la electroporación, los protoplastos se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 ml, se dejaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 70 g, 5 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 1,5 ml de medio de cultivo Aoki & Takebe

(13% Manitol, 5 mM MES y 10x Sales Aoki & Takebe: 2mM KH₂PO₄, 10mM KNO₃, 10mM MgSO₄, 10 μM KI, 1μM CuSO₄, 100mM CaCl₂) y se sembraron en placas de Petri con un diametro de 2,5 cm que previamente se habían recubierto con una solución que contenía 1% de agarosa, 13% de manitol y 1% de sacarosa. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C. Finalizada la incubación se recogieron los protoplastos y se centrifugaron a 70 g, 5 min a 4°C. El pellet resultante fue congelado inmediatamente con Nitrógeno líquido y se procedió a la extracción de RNA.

3.2.7. Ensayos de Agroinfiltración

3.2.7.1. Transformación de *Agrobacterium*

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58C1 y plásmido de virulencia pCH32) se transformaron por electroporación con el plásmido correspondiente en cada caso. Las electroporaciones se llevaron a cabo en el electroporador *Gene pulser II* y *capacitance extender*, en cubetas enfriadas en hielo y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (25 μF de capacitancia, 400 Ω de resistencia, 2500 V). Se añadieron 0,5 μl de plásmido a 20 μl de células electrocompetentes de *Agrobacterium*. Después de la electroporación, las células se transfirieron a 1 ml de medio LB y se cultivaron durante 3 h a 28°C con agitación suave (80 rpm) para permitir que las células expresaran los genes de resistencia a los antibióticos. Se sembraron en placas de Petri con medio LB-Agar que contenían los antibióticos correspondientes y se cultivaron a 28°C durante 48 h.

3.2.7.2. Agroinfiltración

Las colonias aisladas de *Agrobacterium* transformadas se inocularon en 3 ml de medio LB con los antibióticos tetraciclina (5 ng/mL) y kanamicina (50 ng/mL) y fueron incubadas a 28°C durante la noche con agitación enérgica (150 rpm). Las células se precipitaron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6 en la solución de agroinfiltración [MgCl₂ 10 mM; MES 10 mM pH 5,6 y acetosyringona 150 μM (Sigma)]. Los cultivos se incubaron durante 2 h mínimo a temperatura ambiente antes de la agroinfiltración. En las co-infiltraciones de las

construcciones de los mutantes de PepMV en presencia de CP, se mezclaron volúmenes iguales de ambos cultivos antes de la agroinfiltración. En las co-infiltraciones en presencia de p19 se añadieron a la mezcla 0,3 volúmenes de cultivo de la construcción para expresar la proteína supresora.

Las agroinfiltraciones se realizaron sobre el envés de hojas de *N. benthamiana* (de unos 25 días aproximadamente) con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml.

3.2.8. Extracción de RNA total de hojas y de protoplastos de *N. benthamiana*

Para la preparación de RNA total de hoja se partió de 0,1 g de tejido vegetal fresco. El tejido fue triturado con nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1,5 ml y se homogeneizó con 1 ml de TRI-reagent (Sigma). En el caso de las preparaciones a partir de protoplastos, el pellet resultante fue homogeneizado con 0,25 ml de TRI-reagent. En ambos casos las preparaciones de RNA total se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.9. Detección del RNA viral de PepMV

3.2.9.1. Síntesis de sondas

Las sondas utilizadas para detectar el RNA de PepMV se obtuvieron por transcripción *in vitro* del DNA inserto en los plásmidos pGPepORF1+ y pGPepCP0.3 (Figura 3.7). El plásmido pGPepORF1+ lleva inserto un fragmento de 3.500 pb correspondiente a una región del gen de la replicasa viral del genoma del virus. El plásmido pGPepCP0.3 lleva un inserto 850 pb complementario a parte del TGB y parte de la CP.

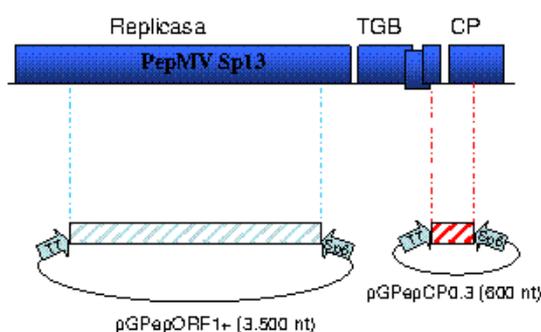


Figura 3.7. Plásmidos utilizados para la generación de sondas de PepMV. pGORF1 contiene región complementaria a la replicasa y pGPepCP0.3 región complementaria a la CP. Las cajas rayadas indican las zonas complementarias al fragmento de RNA utilizado en cada caso.

La sonda utilizada para la detección de GFP se obtuvo a partir del plásmido pG208GFP (Baulcombe y col., 1995). Este plásmido lleva inserto un fragmento complementario al gen GFP10 y a la CP de PVX.

La preparación de las sondas se encuentra descrita en el apartado 2.2.6.1 del Capítulo 2.

3.2.9.2. Análisis por *dot blot* y *tissue-print*

El análisis de las muestras por *tissue-print* se efectuó sobre improntas de pecíolo de hoja y el análisis por *dot-blot* sobre extractos de RNA total, ambos en membranas de nailon cargadas positivamente (Roche). El proceso de hibridación se encuentra descrito en el apartado 2.2.6.2 del Capítulo 2.

3.2.9.3. Análisis por Northern blot

Para el análisis por Northern blot se desnaturalizaron 5 µg de RNA total durante 4 min a 65°C en el volumen correspondiente del tampón de carga 5X (bromofenol, EDTA, formaldehído, glicerol, FA y agua estéril), después se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel. Las muestras desnaturalizadas se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón que contenía HEPES 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,0 y formaldehído al 6%. La electroforesis se realizó a 30 V durante 4 h aproximadamente. Tras la electroforesis, los RNAs se transfirieron a una membrana de nailon⁺, se fijaron mediante luz ultravioleta y se hibridaron con sondas de RNA marcadas con digoxigenina según se describe en el apartado anterior.

3.2.10. Análisis de secuencias

El análisis y la alineación de las secuencias se llevó a cabo utilizando los programas ClustalXW disponible en www.ebi.ac.uk/clustlw (Thompson y col., 1997) y Bioedit v.7.0 disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>. A partir de los alineamientos se calcularon los porcentajes de similitudes nucleotídicas con ClustalXW.

3.2.11. Predicción de estructuras secundarias

Las predicciones de estructura secundaria del RNA se realizaron utilizando el programa Mfold 3.2 (Zuker, 1989) disponible en <http://bioinfo.rpi.edu/~zukerm/ma>.

3.2.12. Visualización de la GFP

La fluorescencia emitida por la GFP en las hojas de *N. benthamiana* se visualizó con una lámpara de ultravioleta 100 W Handheld long-wave (UV products, Upland, CA 91786, Black Ray model B 100AP) y con un microscopio láser confocal invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Alemania).

3.3. Resultados

3.3.1. Obtención de un clon “agroinfectivo” de PepMV

Para el desarrollo de un clon infectivo de PepMV se planteó una estrategia basada en los siguientes pasos: 1) obtención de cDNAs que cubran la longitud completa del genoma del virus, 2) clonación de los cDNAs en un vector intermediario (pTOPO-XL) y 3) subclonación en un vector binario (pBIN61; Bendahmane y col., 2000) de modo que el cDNA quede bajo el control del promotor 35S. Este vector binario debe permitir la síntesis del RNA viral *in vivo*.

En base a la secuencia del aislado PepMV-Sp13 (Aguilar y col., 2000) se diseñaron los iniciadores CE-42 y CE-43 (Tabla 3.1). Estos iniciadores incluían dianas *Bam* HI y *Xma* I para los extremos 5' y 3', respectivamente, de forma que los cDNAs obtenidos pudiesen ser clonados direccionalmente en pBIN61. Utilizando estos iniciadores en experimentos de RT-PCR sobre un extracto de RNA total de una planta de *N. benthamiana* infectada, se obtuvieron cDNAs correspondientes a la longitud total del RNA genómico (gRNA) de PepMV-Sp13 (6,4 Kb). Además del fragmento de DNA del tamaño esperado, en la RT-PCR se generaron otros fragmentos de menor tamaño, posiblemente producto de iniciación inespecífica de los iniciadores (Figura 3.8).

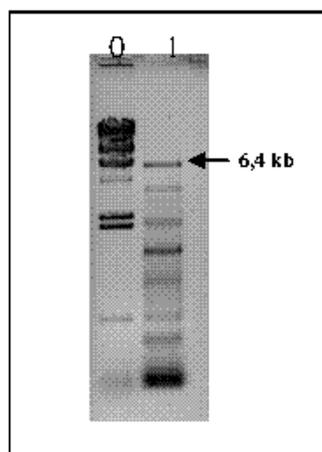


Figura. 3.8. Producto de RT-PCR utilizando los iniciadores CE-42 y CE-43 sobre extracto de RNA total *N. benthamiana* inoculada con PepMV-SPI3. Marcador DNA λ Hind III (calle 0) y producto de RT-PCR (calle 1)

El fragmento de DNA de 6,4 Kb fue purificado, ligado y clonado en *E. coli* en el plásmido pTOPO-XL como se describe en los apartados 3.2.2.1 y 3.2.2.2 de materiales y métodos. Se decidió seguir adelante con tres clones resultantes de la ligación, ya que, a pesar de utilizar polimerasas de alta fidelidad en la amplificación y un número de ciclos bajo, podrían introducirse mutaciones deletéreas que se individualizarían en cada clon independiente. Los clones generados fueron pTPepXL6, pTPepXL7 y pTPepXL9. A continuación, el fragmento de DNA de 6,4 Kb fue subclonado en pBIN61 entre las dianas *Bam* HI y *Xma* I. De nuevo se seleccionaron tres clones para cada uno de los clones de partida dando lugar a nueve clones: pBPepXL6.1, pBPepXL6.2, pBPepXL6.3, pBPepXL7.7, pBPepXL7.8, pBPepXL7.9, pBPepXL9.1, pBPepXL9.2 y pBPepXL9.3.

Se transformó *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones en pBIN61, y los cultivos líquidos de las cepas resultantes se infiltraron en plantas de *N. benthamiana*. Tras 5 días post-agroinoculación (dpi) se observaron síntomas en el 100% de las plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL6 (1 a 3) y pBPepXL9 (1 a 3). Las plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL7 (1 a 3) mostraron síntomas a los 7 dpi. Los síntomas fueron similares a los típicamente inducidos por PepMV-Sp13.

Para verificar la presencia de virus en las plantas agroinoculadas se realizó un ensayo de hibridación (Figura 3.9.). El análisis se realizó en improntas de secciones de pecíolos de hojas agroinoculadas y de hojas no inoculadas a 5 dpi. El resultado de la hibridación fue, como cabía esperar, positivo para todas las plantas, por lo que se pudo deducir que los clones eran efectivamente infectivos.

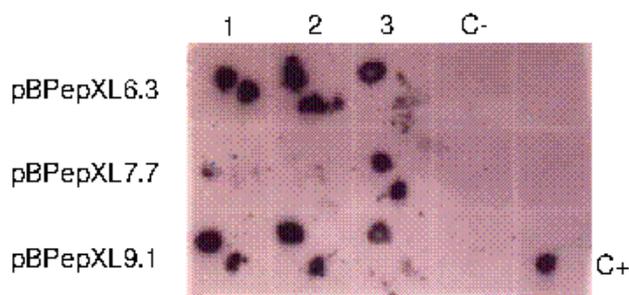


Figura 3.9. Resultado de una hibridación en membrana mostrando la presencia de PepMV en plantas agroinfiltradas con los clones pBPepXL6.3, pBPepXL7.7 y pBPepXL 9.1 a 5 dpi. En la parte superior aparecen numeradas de 1 a 3 las improntas de secciones de pecíolos de 3 plantas agroinfiltradas. Se incluyen dos improntas, una de hoja agroinfiltrada (impronta izquierda) y otra de hoja infectada sistémicamente (impronta derecha). C- corresponde a las improntas de plantas agroinfiltradas con los controles negativos, pBIN61 y pBGFP. En la parte inferior derecha se encuentra un control positivo de RNA transcrito a partir del clon pLMepMV 0.5. El RNA viral fue detectado con una sonda marcada con digoxigenina complementaria al gen de la replicasa de PepMV.

De los clones obtenidos se optó por el pBPepXL6.3 (a partir de ahora pBPepXL6) para trabajar en posteriores ensayos. La secuenciación parcial de este clon reveló la existencia de mutaciones que provocaban cambios de aminoácidos y mutaciones silenciosas con respecto a la secuencia publicada de PepMV-Sp13. Se detectaron un total de 4 mutaciones, de las cuales sólo una, situada en el gen *TGB3*, da lugar a un cambio de aminoácido. Sin embargo, éstas parecieron no afectar a la infectividad del clon.

3.3.2. Estudio de la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV

Puesto que la construcción de un vector viral basado en PepMV podía afectar a la expresión del gen CP (ver más adelante), previamente se decidió realizar un estudio sobre la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV.

Para llevar a cabo este estudio se diseñaron a partir del clon agroinfectivo de PepMV construcciones que alteraran la expresión de la CP. Se introdujeron dos tipos de modificaciones. Por un lado, se introdujo una mutación puntual en el supuesto codón de inicio del ORF de la CP, cambiándolo de ATG a AGG (Figura 3.10, B). Muy posiblemente esta mutación anule la iniciación de la traducción de la CP ya que los siguientes codones ATG del ORF de la CP de PepMV no se encuentran en un contexto favorable para el inicio de su traducción (Kozak, 1986). Por otro lado, se sustituyó parte del ORF de la CP por el ORF completo de

la GFP, situándolo a 36 nt del codón de inicio de la CP y en la misma pauta de lectura (Figura 3.10, C). El efecto de las modificaciones realizadas fue evaluado en protoplastos de *N. benthamiana* y mediante ensayos de agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Con el primer tipo de ensayos pretendíamos determinar efectos en células únicas directamente inoculadas, y con el segundo tipo de ensayos pretendíamos analizar también posibles efectos de las mutaciones en el movimiento célula a célula y a larga distancia del virus.

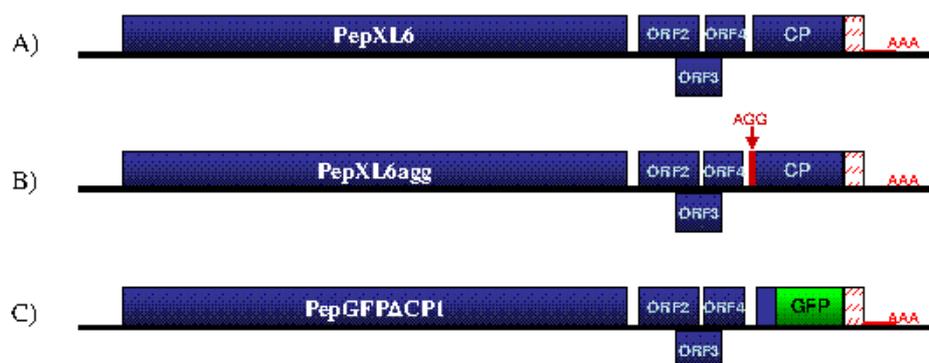


Figura 3.10. Construcciones de DNA utilizadas para el estudio de la implicación de la CP en la multiplicación de PepMV. A) PepXL6 (del clon agroinfectivo), genoma de PepMV sin modificar. B) Construcción PepXL6agg, la flecha roja indica mutación puntual de ATG a AGG del codón de inicio de la CP. C) Construcción PepGFPΔCP1, en la que se ha sustituido parte del ORF de la CP por el ORF completo de la GFP.

3.3.2.1. Efecto de la CP sobre la multiplicación de RNA viral en protoplastos de *N. benthamiana*

Para estudiar el efecto de las mutaciones en células aisladas, se generaron los clones pT7PepXL6agg (PepXL6agg), pT7PepGFPΔCP1 (PepGFPΔCP1) y pT7PepXL6 (PepXL6, clon infectivo), de modo que cada una de las construcciones de DNA quedase situada bajo el control del promotor de transcripción T7.

En primer lugar se estudió el comportamiento de PepXL6agg. Para ello, se inocularon protoplastos de *N. benthamiana* por electroporación con RNAs transcritos sintetizados *in vitro* a partir de pT7PepXL6agg y pT7PepXL6. Transcurridas 24 h post-inoculación se realizaron extracciones de RNA total.

El análisis por Northern blot de las muestras obtenidas mostró una diferencia notable de acumulación de RNA viral entre los extractos de RNA total procedentes de protoplastos inoculados con RNA de PepXL6 y los inoculados con

RNA de PepXL6agg (ver figura 3.11). Estos resultados, que se repitieron consistentemente en tres experimentos independientes, indicaban que la modificación introducida en PepXL6agg provoca una reducción de los niveles de acumulación de RNA viral en células inoculadas. Esta reducción podría deberse a una implicación directa o indirecta de la CP en la multiplicación a nivel unicelular de PepMV, pero también podrían ser el resultado de la inestabilidad del RNA viral debida a la no traducibilidad del ORF de la CP (Shyu y col., 2008; Sullivan y Green, 1993). Para investigar este aspecto, se preparó y ensayó PepGFPΔCP1 (Figura 3.11).

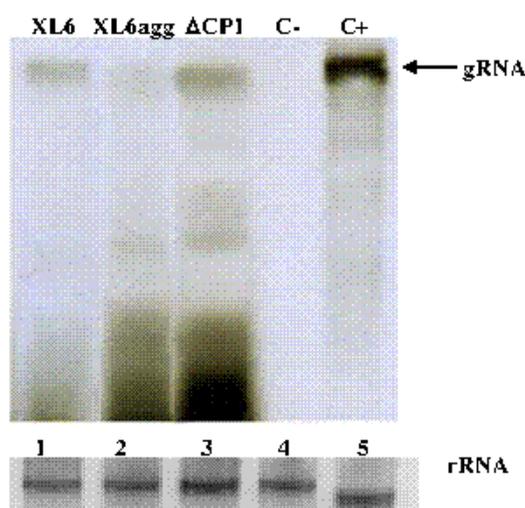


Figura 3.11. Análisis por Northern-blot de extractos de RNA total de protoplastos de *N. benthamiana* inoculados PepXL6 (XL6), PepXL6agg (XL6agg) y PepGFPΔCP1 (ΔCP1). C- corresponde a extractos de RNA total de protoplastos sin inocular y C+ corresponde a extractos de RNA total de hoja agroinfiltrada con el clon agroinfectivo. El RNA viral fue detectado por hibridación molecular con una sonda marcada con digoxigenina complementaria a la replicasa de PepMV. El control de carga se muestra en el panel inferior. Se indica el tamaño del RNA genómico de PepMV (gRNA)

En las muestras procedentes de extractos de RNA total de protoplastos inoculados con RNA de PepXL6 y PepGFPΔCP1 (Figura 3.11, calles 1 y 3, respectivamente) se detectaron niveles similares de RNA viral genómico (gRNA), significativamente superiores a los obtenidos con PepXL6agg (Figura 3.11, calle 2). Los resultados obtenidos indican que la CP no es necesaria para la multiplicación de PepMV a nivel unicelular y sugieren que la reducida acumulación de RNA viral de PepXL6agg se deba a la inestabilidad del RNA asociada con la no traducibilidad del ORF de la CP.

3.3.2.2. Efecto de la CP sobre la multiplicación de RNA viral en tejido agroinfiltrado

A continuación estudiamos el comportamiento de PepGFP Δ CP1 en tejido agroinfiltrado. Para ello, la misma construcción utilizada en el apartado anterior fue situada bajo el control del promotor 35S en pBIN61, dando lugar a pBPepGFP Δ CP1.

Esta construcción fue ensayada mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* totalmente expandidas. Como controles de la agroinfiltración se utilizaron los clones pBGFP (expresa el ORF de la GFP) y pBIN61 (control negativo). pBPepGFP Δ CP1 y pBGFP se co-agroinfiltraron con pB19 (p19), que expresa el ORF de la P19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), supresor del silenciamiento de RNA, para evitar el decaimiento de la expresión de la GFP tras varios días post-inoculación (Voinnet y col., 2003). Estas plantas fueron expuestas a luz UV mediante una lámpara de mano y observadas por microscopía láser confocal a 4, 6 y 10 dpi.

Bajo la lámpara UV ninguna de las plantas agroinfiltradas con pBPepGFP Δ CP1 emitió fluorescencia verde, mientras que el control positivo pBGFP generó fluorescencia a 4 dpi. Sin embargo, la observación de las regiones agroinfiltradas con pBPepGFP Δ CP1 mediante microscopía láser confocal mostró la expresión de GFP en células aisladas a partir de 4 dpi (Figura 3.12).

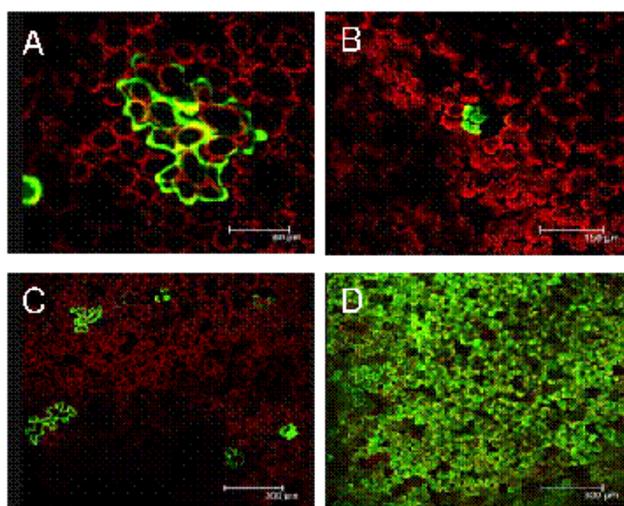


Figura 3.12. Focos de infección iniciados por PepGFP Δ CP1 en células de la epidermis y mesófilo de hoja *N. benthamiana* directamente agroinfiltrada. A) Célula aislada de la epidermis. B) Grupo de 3 células del mesófilo. C) Área agroinfiltrada donde se observan varios focos de infección. D) Área agroinfiltrada con la construcción control pBGFP. Todas las imágenes fueron tomadas a 6 dpi en el microscopio confocal.

Al observar las imágenes de la figura se puede apreciar cómo los focos de infección iniciados por PepGFP Δ CP1 permanecieron restringidos a una única célula o unas pocas transcurridos varios días post-infiltración. Se observó fluorescencia verde en células aisladas de la epidermis y en células del mesófilo (Figura 3.12, paneles A y B, respectivamente). Con menor frecuencia aparecieron grupos de hasta tres células (Figura 3.12, panel B); estos grupos no aumentaron de tamaño en ningún momento. Por otro lado, cabe resaltar el reducido número de células que expresaron GFP en un área determinada de tejido agroinfiltrado con pBPepGFP Δ CP1 (Figura 3.12, panel C) en comparación con el elevado número de células (casi la totalidad) que expresaron fluorescencia en tejido agroinfiltrado con el clon pBGFP (Figura 3.12, panel D). Estos resultados confirman que la CP no es necesaria para la multiplicación de PepMV en células inoculadas, pero sí para el movimiento célula a célula del virus, en concordancia con resultados que otros autores han obtenido para virus del mismo género (Chapman y col., 1992a; Lough y col., 2000). Además, estos resultados indican que es posible la expresión de un gen foráneo (*GFP*) a partir del genoma de PepMV, aunque el número de focos iniciales de infección obtenidos con PepGFP Δ CP1 fue muy reducido en

comparación con su máximo potencial (i.e., aquellas células que expresaron GFP tras agroinfiltración de pBGFP).

3.3.2.3. Suministro de la CP en *trans* mediante agroinfiltración

Los resultados anteriores mostraban la capacidad de PepGFP Δ CP1 de multiplicarse e iniciar focos de infección. Estudios previos con otros potexvirus demuestran que es posible complementar el movimiento de mutantes que no expresan la CP aportando la proteína en *trans* (Cruz y col., 1998; Lough y col., 2001). En este apartado se estudió la posibilidad de restaurar el movimiento de PepGFP Δ CP1 mediante un nuevo ensayo de agroinfiltración en el que se aportó la CP en *trans*.

Para llevar a cabo este ensayo se clonó el gen de la CP de PepMV bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando la construcción pBINCPep. Se realizaron co-infiltraciones de pBPepGFP Δ CP1 más p19 en presencia y ausencia de la CP. Las hojas agroinfiltradas fueron observadas por microscopía láser confocal y expuestas a luz UV mediante una lámpara de mano a 4, 6 y 10 dpi.

Los resultados obtenidos del seguimiento de la infección se muestran en la figura 3.13. La aportación de la CP en *trans* mediante agroinfiltración restauró el movimiento del mutante PepGFP Δ CP1 de un modo muy eficiente. Transcurridos 4 dpi en las regiones agroinfiltradas en presencia de CP se detectaron focos de infección formados por grupos de alrededor de 4-9 células (Figura 3.13, panel c). También a 4 dpi se observaron otros focos en los que la infección permaneció restringida a una o tres células (Figura 3.13, paneles a y b). A 6 dpi, los focos de infección aumentaron de tamaño pudiendo distinguirse grupos de células de diferentes tamaños (Figura 3.13, paneles d, e y f). Finalmente a 10 dpi, casi la totalidad de los focos estaban formados por grupos de más de 20 células, visibles bajo luz UV (Figura 3.13, paneles g, h e i). En las regiones agroinfiltradas en ausencia de CP los focos de infección permanecieron restringidos a una única célula transcurridos 10 dpi.

Estos resultados indican que es posible restaurar el movimiento de mutantes de PepMV aportando la CP en *trans*. Además, estos resultados

confirman que el número de focos iniciales de infección a que da lugar la agroinfiltración de clones derivados de PepMV es pequeño.

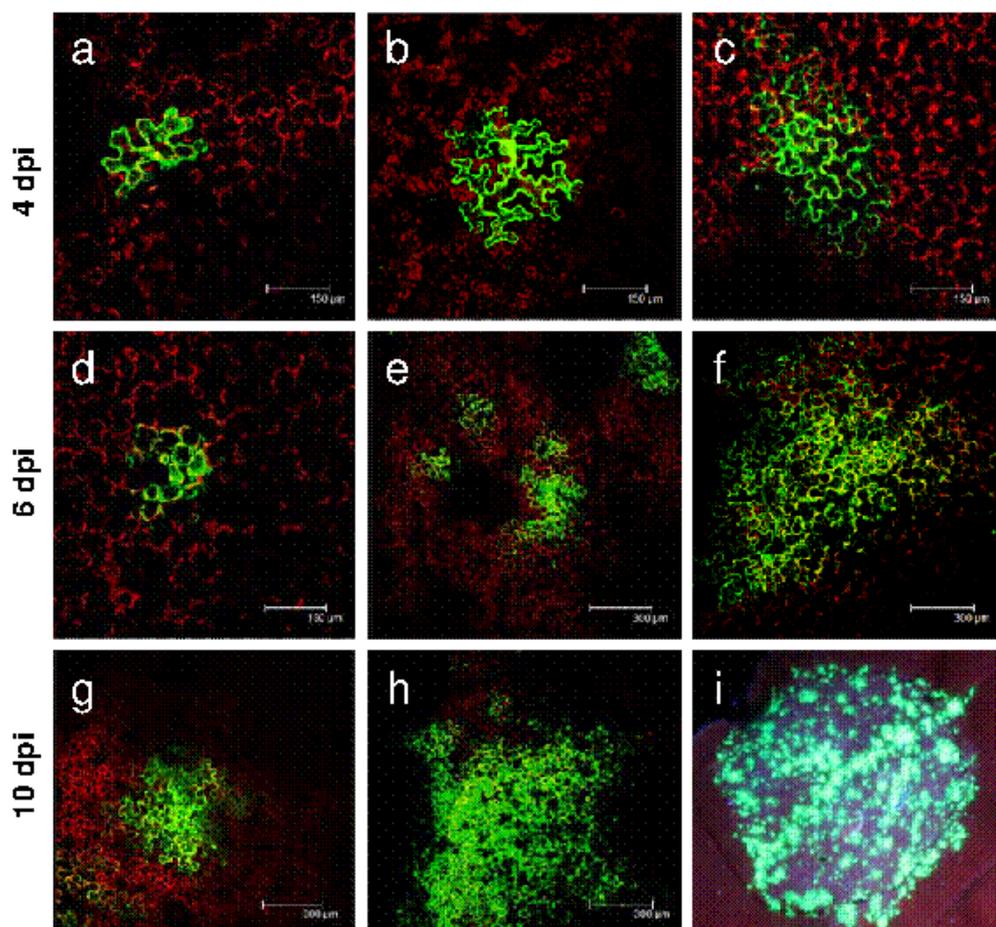


Figura 3.13. Restauración del movimiento de PepGFP Δ CPI mediante el suministro de la CP *in trans* por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. La expresión de GFP en células de la epidermis y mesófilo permitió distinguir diferentes tipos de focos de infección. A 4 dpi: a) célula de la epidermis aislada, b) Grupo de 3 células y c) Grupos de 4-9 células. A 6 dpi: d) Grupos de 4-9 células, e) imagen donde se muestran focos de infección de diferentes tamaños y f) grupos de más de 20 células. A 10 dpi: g) grupos de alrededor de 20 células, h) grupos de más de 20 células e i) Imagen de la región agroinfiltrada vista bajo luz UV en oscuridad. Imágenes tomadas al microscopio láser confocal a 4 dpi (a-c), 6 dpi (d-f) y 10 dpi (g-h) y lámpara UV a 10 dpi (i).

El análisis por Northern blot de extractos de RNA total de las regiones agroinfiltradas en ausencia y presencia de CP confirmó la restauración del movimiento de los mutantes mediante la aportación de la CP *in trans* (resultados no mostrados).

3.3.2.4. Efecto de modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del ORF de GFP de PepGFPΔCP1 sobre el número de focos de infección visibles tras agroinfiltración

En este apartado estudiamos si modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del gen CP podrían afectar a la eficiencia de un vector viral derivado de PepMV tras agroinfiltración.

Para llevar a cabo el experimento se diseñaron específicamente tres construcciones basadas en pBPepGFPΔCP1, las cuales incluían diferentes tipos de mutaciones (Figura 3.14). Establecimos como parámetro de medida de eficiencia el número de células que expresan GFP tras agroinfiltración de los clones, asumiendo que éste es equivalente al número de focos de infección que se pueden iniciar tras agroinoculación.

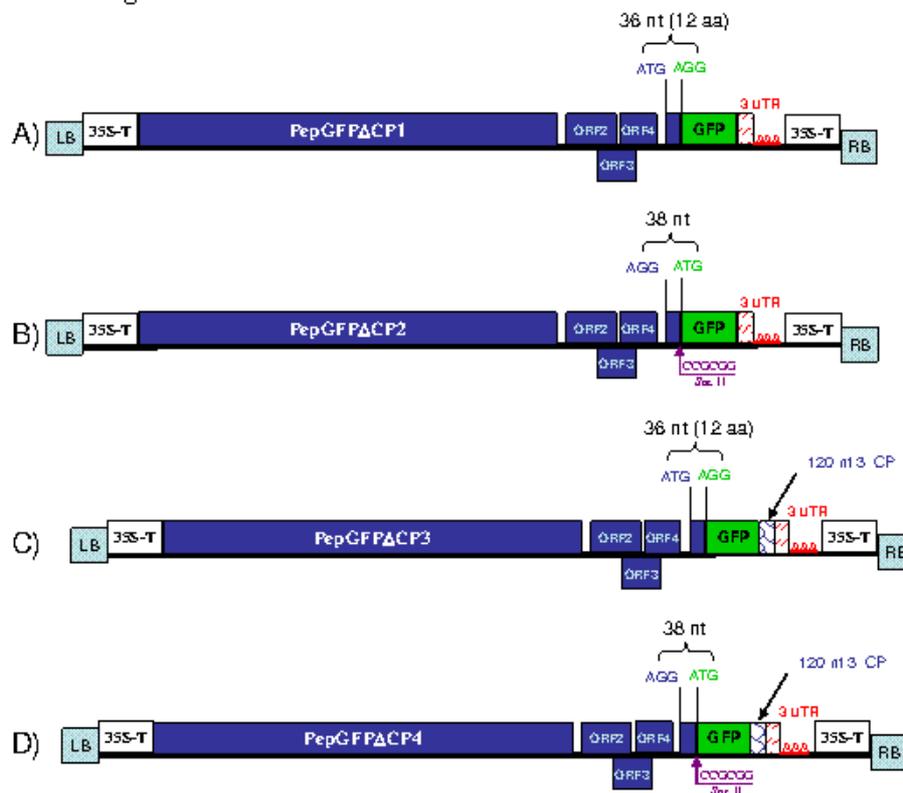


Figura. 3.14 Construcciones virales utilizadas en los ensayos de agroinfiltración en *N. benthamiana*. A) Clon pBPepGFPΔCP1, B) Clon pBPepGFPΔCP2 C) Clon pBPepGFPΔCP3 y D) pBPepGFPΔCP4. La expresión de los insertos clonados entre el extremo izquierdo (LB) y derecho (RB) del plásmido Ti de *A. tumefaciens* está controlada por el promotor y el terminador 35S. Todas las construcciones se transformaron en *A. tumefaciens* (cepa C58C1 y plásmido de virulencia pCH32).

Las construcciones fueron clonadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando los clones: pBPepGFPΔCP1, pBPepGFPΔCP2,

pBPepGFP Δ CP3 y pBPepGFP Δ CP4 (Figura 3.14). En pBPepGFP Δ CP1, se introdujo el ORF de la GFP (con el codón de inicio modificado de ATG a AGG) en fase con el ORF de la CP, a 36 nt de codón de inicio de la CP, de modo que la región aguas arriba de la GFP quedase sin modificar y la GFP se expresase como una proteína de fusión que contendría los 12 aminoácidos amino-terminales de la CP. En pBPepGFP Δ CP2, se modificó el codón de inicio de la CP de ATG a AGG y se introdujo el ORF de la GFP (con su propio ATG) a 38 nt del codón de inicio de la CP (además contiene justo aguas arriba del codón de inicio de la GFP una diana *Sac* II: CCGCGG). pBPepGFP Δ CP3 y pBPepGFP Δ CP4 son idénticas a pBPepGFP Δ CP1 y pBPepGFP Δ CP2, respectivamente, pero incluyen 120 nt del extremo 3' del ORF de la CP a continuación del ORF de la GFP. Estos 120 nt no se deberían expresar puesto que el codón de terminación de la GFP se mantuvo. El resultado de la secuenciación de las regiones modificadas confirmó la existencia de las mutaciones deseadas.

Se realizaron agroinfiltraciones en hojas de *N. benthamiana* con cada una de las construcciones en presencia y ausencia de la CP. Para poder comparar el efecto de las mutaciones dentro de un mismo contexto y evitar la posible influencia de factores externos, las diferentes combinaciones de clones fueron comparadas dentro de una misma hoja (Figura 3.15). Todos los tratamientos fueron co-infiltrados en presencia de p19.

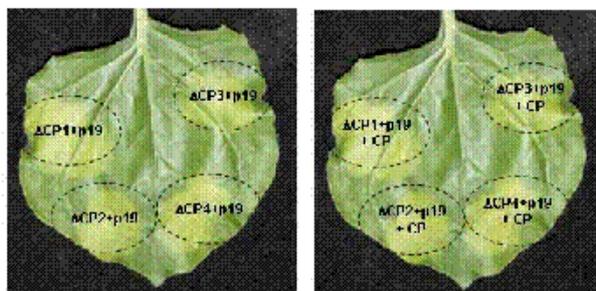


Figura 3.15. Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las diferentes combinaciones de plásmidos utilizadas. Las regiones agroinfiltradas se encuentran marcadas con línea discontinua. Dentro de cada región agroinfiltrada se indica la combinación utilizada. Δ CP1: pBPepGFP Δ CP1, Δ CP2: pBPepGFP Δ CP2, Δ CP3: pBPepGFP Δ CP3, Δ CP4: pBPepGFP Δ CP4, p19: pB19 y CP: pBINCPep. En la imagen de la izquierda se muestran las agroinfiltraciones en ausencia de CP y en la imagen de la derecha agroinfiltraciones en presencia de CP.

Para estimar el número de focos de infección iniciados con cada mutante de PepMV se tomaron discos de hojas de 0,5 cm² de las regiones agroinfiltradas a

6 y a 10 dpi. La observación de los discos al microscopio confocal permitió contar el número de células aisladas que expresaban GFP dentro de cada disco.

Los valores obtenidos relativos al número de focos de infección iniciados con cada uno de los mutantes se encuentran representados gráficamente en la figura 3.16. Como puede observarse en la figura, se encontraron diferencias significativas entre ellos, prevaleciendo PepGFP Δ CP1 por iniciar un mayor número de focos de infección. Cabe resaltar diferencias significativas como las encontradas entre PepGFP Δ CP1 y PepGFP Δ CP2, pues difieren en muy pocos nucleótidos (ver figura 3.14). Además, también destaca, a 6 dpi, el retraso en la iniciación de focos de infección observado con PepGFP Δ CP3 y PepGFP Δ CP4 en comparación con los otros dos mutantes. Estos resultados indican que las modificaciones introducidas en PepGFP Δ CP1 pueden dar lugar a diferencias significativas en el número de focos de infección iniciados y el tiempo requerido para establecerlos tras agroinfiltración.

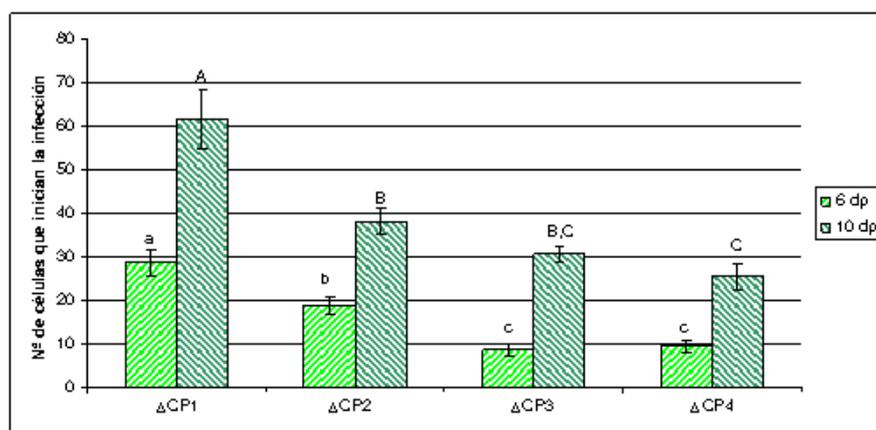


Figura 3.16. Número de focos de infección iniciados tras agroinfiltración por mutantes de PepMV que no expresan la CP. Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3) y pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4). Las infiltraciones se realizaron en presencia de p19 (clon pB19). Se contaron células aisladas que expresaban GFP en discos de hojas de 0,5 cm² a 6 y a 10 dpi. El experimento se repitió tres veces y cada medida resulta de la media de los valores obtenidos en 9 discos de hoja/construcción. A, B, B, C, C, a, b y c representan grupos homogéneos de acuerdo al valor medio de número de células que expresan GFP/construcción; construcciones con la misma letra no muestran diferencias significativas al mismo nivel de probabilidad del 95%, de acuerdo con un test de Tukey.

A continuación se realizó un experimento de agroinfiltración con las diferentes construcciones generadas a las que se les añadió la construcción pBINCPep (expresa la CP de PepMV). Los resultados obtenidos de la

complementación en *trans* del movimiento célula a célula de los mutantes que no expresan la CP se muestran en la figura 3.17.

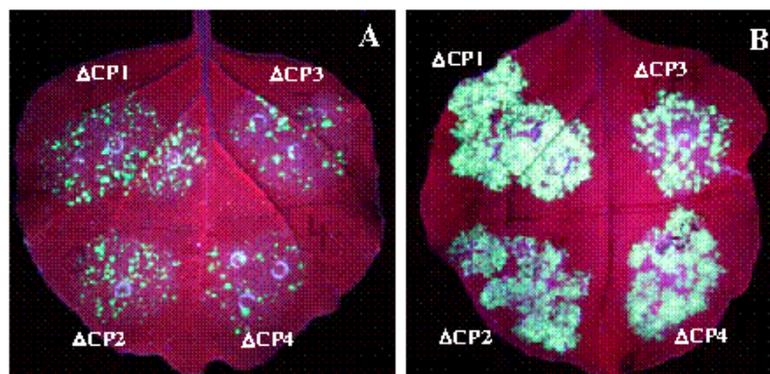


Figura 3.17. Restauración del movimiento de mutantes de PepMV que no expresan la CP mediante la aportación de la CP en *trans* por agroinfiltración. Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3) y pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4). La agroinfiltración de las construcciones se realizó en presencia de CP (clon pBINCPep) y p19 (clon pB19). Imágenes tomadas a 6 (Panel A) y 10 dpi (Panel B) bajo la iluminación de luz UV.

Todos los mutantes generaron focos de infección visibles bajo luz UV a 6 dpi (Figura 3.17, panel A), siendo el tamaño de los focos similar en todos los casos. A 6 dpi, también puede apreciarse como PepGFP Δ CP1 y PepGFP Δ CP2 iniciaron más focos de infección que PepGFP Δ CP3 y PepGFP Δ CP4, como ocurrió en el ensayo anterior. Destaca la región agroinfiltrada con PepGFP Δ CP1 (Figura 3.17, panel B) por presentar mayor número de focos de infección tanto a 6 como a 10 dpi (donde casi la totalidad del tejido agroinfiltrado emite fluorescencia verde) en comparación con el resto de construcciones. Los resultados obtenidos con este ensayo de complementación son consistentes con los obtenidos en el ensayo anterior e indican que la alteración de las regiones 5' y 3' terminales del ORF de la GFP de PepGFP Δ CP1 afecta el número de focos de infección visibles tras agroinfiltración. Por tanto, la modificación de estas regiones podría afectar a la eficiencia de un vector viral basado en PepMV.

3.3.3. Diseño de un vector viral derivado de PepMV

Para poder realizar un seguimiento de la infección viral de una forma sencilla y rápida y poder obtener información sobre la biología de PepMV, se decidió intentar construir un vector viral autónomo que expresara la GFP.

Con la información obtenida en apartados anteriores y siguiendo como modelo la construcción viral de PVX:GFP 208 (Baulcombe y col., 1995) se manipuló el clon agroinfectivo de PepMV para insertarle el gen *GFP*. Como estrategia para expresar el nuevo ORF se decidió duplicar el supuesto promotor del sgRNA del gen *CP* de PepMV (Figura 3.18).

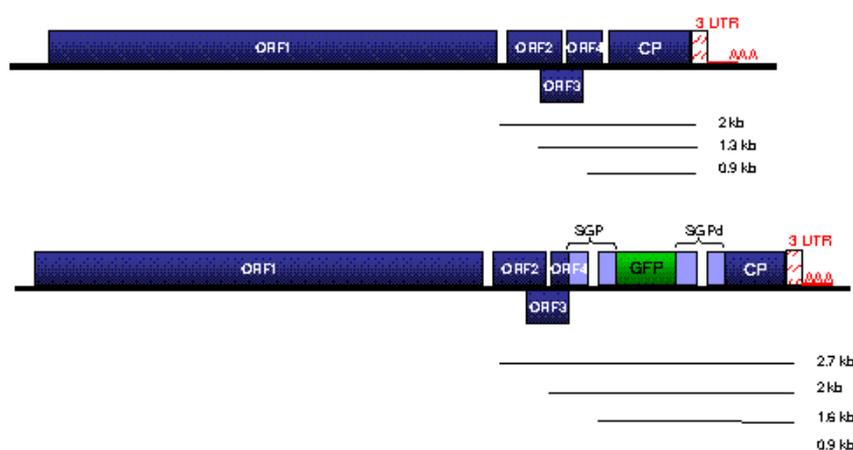


Figura. 3.18. Inserción del ORF de la GFP en el genoma de PepMV y representación de los RNAs subgenómicos que supuestamente deberían generarse. El ORF de la GFP debería expresarse desde una duplicación del promotor del RNA subgenómico de la CP. En azul oscuro aparecen los ORFs originales, en azul claro la región propuesta como promotora del RNA subgenómico (SGP y SGPd) de la CP, y en verde el ORF de la GFP. El tamaño aproximado de los RNAs subgenómicos se indica a la derecha.

3.3.3.1. Predicción del promotor subgenómico del gen *CP* de PepMV

Se ha demostrado para algunos potexvirus que los SGP de los genes *CP* se encuentran localizados alrededor de 100 nt nucleótidos aguas arriba del codón de inicio del ORF (Chapman y col., 1992a; Koenig y col., 2006; Lee y col., 2000). Estos SGP contienen una secuencia de 8 nt altamente conservada (5'-GTTAAGTTT-3') (Skryabin y col., 1988), la cual se ha demostrado que es indispensable para su actividad (Kim y Hemenway, 1997; Koev y Miller, 2000). Además, en la mayoría de los casos, nucleótidos situados aguas abajo del codón de inicio de la traducción (dentro de la región codificante del ORF de la CP) también forman parte del SGP, y su función generalmente es la de potenciar la síntesis de los sgRNAs (Lee y col., 2000). En el caso de PepMV, las regiones que actúan como promotoras de los sgRNAs se desconocen. Sin embargo, los resultados obtenidos en el apartado 3.3.2 muestran la posibilidad de expresar el

ORF de la GFP situándolo a 36 nt aguas abajo del codón de inicio del ORF de la CP. Así, el extremo 3' del supuesto SGP lo delimitamos a la distancia de 36 nt, quedando por delimitar el extremo 5'.

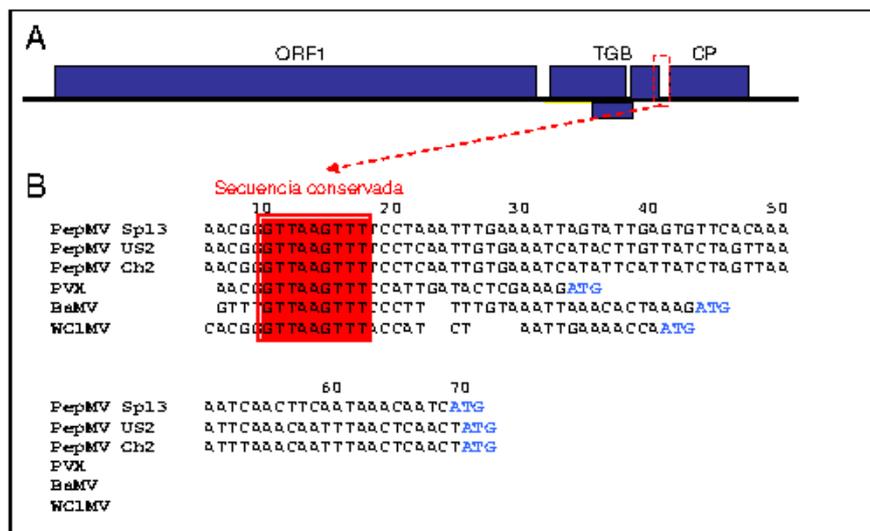


Figura 3.19. Predicción del supuesto SGP del gen CP respecto a su codón de inicio. A) Representación esquemática del genoma de virus del género potexvirus. B) Alineamiento múltiple de parte de la región propuesta como SGP de distintos aislados de PepMV y varios potexvirus. El cuadro rojo marca la secuencia altamente conservada entre potexvirus y en azul aparece el codón de inicio del ORF de la CP para cada virus.

El alineamiento de los SGPs de diferentes potexvirus junto con la secuencia aguas arriba del codón de inicio de la CP de PepMV (Figura 3.19) mostró que para este último también se encuentra conservado el motivo de 8 nt mencionado más arriba. La distancia de este motivo respecto del codón de inicio de la CP varía entre potexvirus (Koenig y col., 2006) encontrándose en el caso de PepMV-Sp13 situada dentro del ORF 4 y a 58 nt aguas arriba del codón de inicio del ORF de la CP (Figura 3.19).

Además se ha observado que en los virus que poseen más de un sgRNA se encuentran homologías de secuencia en las regiones cercanas a los sitios de inicio de la transcripción (Maia y col., 1996). El estudio de las secuencias de las regiones cercanas al codón de inicio del ORF2 y de la CP de PepMV-Sp13 mostró la existencia de una secuencia homóloga de 14 nt, la cual incluía el motivo conservado de 8 nt (5'-GGGTTAAGTTTTCC-3') (Figura 3.20).

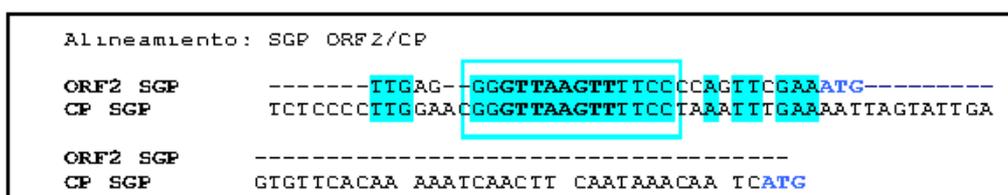


Figura 3. 20. Alineamiento de las regiones próximas al codón de inicio del ORF2 (TGB1) y ORF5 (CP) de PepMV Sp13. En azul se marcan las regiones repetidas en el genoma y en negra el motivo de 8 nt conservado entre potexvirus.

Por otro lado, a menudo dentro de los SGPs se encuentran estructuras tipo tallo-bucle (*Stem Loop*; SL) que facilitan la interacción con la transcriptasa (Li y Wong, 2006). Generalmente la combinación de la secuencia primaria y la estructura secundaria es requerida para la transcripción *in vivo* (Grzelishvili y col., 2000; Koev y Miller, 2000; Wang y col., 1999). Así pues, se realizó una predicción de la estructura secundaria de una secuencia que abarcaba un total de 150 nt, 114 nt aguas arriba del primer ATG del ORF de la CP y 36 nt aguas abajo (Figura 3.21). Un análisis de esta posible estructura secundaria mostró la posible existencia de tres SLs dentro de la región analizada. El SL1, se encuentra aguas arriba de la secuencia conservada (entre flechas moradas) y los SL2 y 3 aguas abajo, situándose este último 8 nt aguas arriba del ATG de la de la CP (Figura 3.21).

En base a los análisis anteriores, finalmente fue seleccionada como región candidata a contener un SGP eficaz, una región de 112 nt: 38 nt del extremo 3' del ORF4 más 38 nt de la región UTR más 36 nt del inicio de la CP. La región seleccionada (Figura 3.21. entre flechas rojas) contiene el motivo de 8 nt conservado y los SL 2 y 3 presentes hasta el codón de inicio de la CP más 36 nt de dicha proteína.

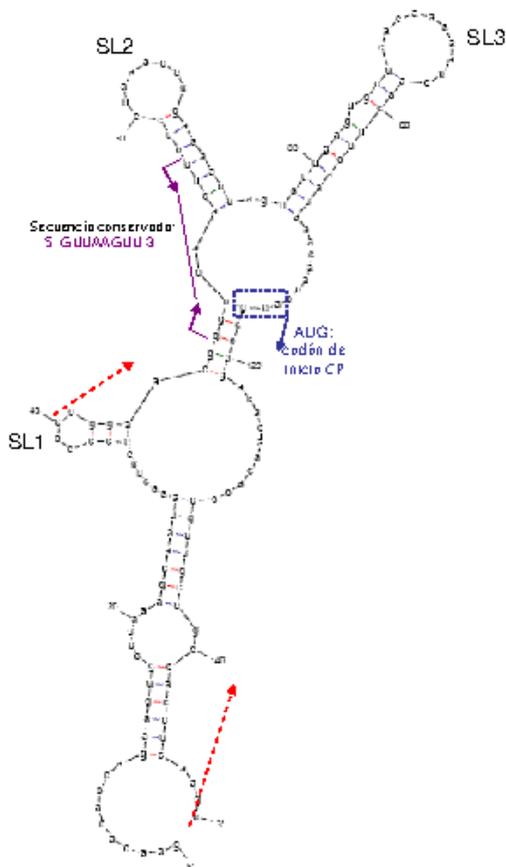


Figura 3.21. Predicción de la estructura secundaria del supuesto SGP de la CP de PepMV-Sp13 usando el programa *mfold* 3.2 (Zuker, 1989). La región seleccionada en la predicción abarca 150 nt (114 nt aguas arriba y 36 nt aguas abajo respecto del codón de inicio de la CP). Las flechas moradas marcan la secuencia de 8 nt conservada entre potexvirus, las flechas rojas delimitan la región propuesta como SGP, el cuadro azul el codón de inicio de la CP.

3.3.3.2. Generación de clones PepMV:GFP: expresión de la GFP a través de la duplicación del promotor del sgRNA de la CP

Como se ha comentado al inicio del apartado 3.3.3 la estrategia seleccionada para la expresión del ORF de la GFP fue a través de la duplicación del supuesto SGP de la CP. Se diseñaron dos versiones diferentes de un posible vector viral (Figura 3.22).

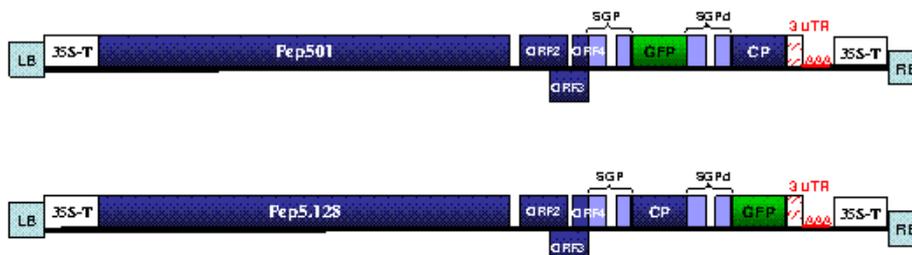


Figura 3.22. Esquema de las construcciones de PepMV marcadas con GFP generadas. Arriba pBPep501 y abajo pBPep5.128.

La estrategia utilizada para el desarrollo de las construcciones fue a través de PCRs solapantes (ver apartado 3.2.4.5 de materiales y métodos). Como moldes de la reacción se utilizaron DNAs procedentes del clon agroinfectivo (pBPepXL6) y de la construcción pBPepGFP Δ CP1 (seleccionada en el apartado 3.3.2). De este modo se obtuvieron dos nuevas construcciones (Figura 3.22): (1) pBPep501 (Pep501), en la que el ORF de la GFP se encuentra aguas arriba del ORF de la CP y (2) pBPep5.128 (Pep5.128) en la que el ORF de la GFP se encuentra aguas abajo del ORF de la CP (en el extremo 3' del genoma). En ambos casos los ORFs de la GFP y la CP van fusionados al supuesto SGP de la CP. Dichas construcciones fueron clonadas bajo el control del promotor 35S en pBIN61. El resultado de la secuenciación de las regiones solapantes confirmó la ausencia de mutaciones no deseadas dentro de éstas. El estudio de las secuencias también mostró una homología del 100% respecto a la del clon agroinfectivo.

Las construcciones fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* en presencia de p19. A partir de 3 dpi y hasta 15 dpi las plantas agroinfiltradas fueron expuestas a luz UV para realizar el seguimiento de la infección. En la figura 3.23 se muestra el seguimiento de la infección establecida por Pep501.

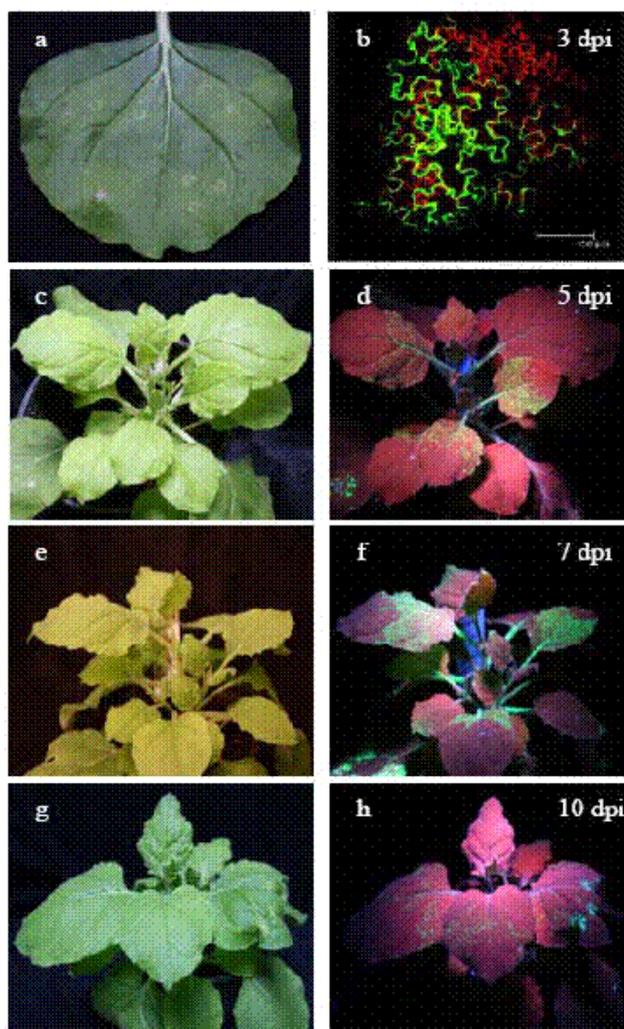


Figura 3.23. Expresión de GFP en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con Pep501. Las agroinfiltraciones se realizaron en presencia de p19. Se tomaron fotografías bajo luz UV a 3 dpi (panel b, imagen microscopía confocal), 5 dpi (d), 7 dpi (f) y 10 dpi (h) y bajo luz blanca a 3 dpi (a), 5 dpi (c), 7 dpi (e) y 10 dpi (g).

A 3 dpi la observación de algunas de las hojas agroinfiltradas mediante microscopía confocal desveló la existencia de focos de infección (Figura 3.23, panel b) formados en la mayoría de los casos por grupos de alrededor de 4-9 células, no visibles bajo lámpara de luz UV. Ninguna de las plantas mostró síntomas de infección típicos de PepMV transcurridos 10 dpi (Figura 3.23, paneles c, e y g) mientras que plantas agroinoculadas con el clon agroinfectivo mostraron síntomas transcurridos 5 dpi. No obstante, la iluminación con luz UV de las plantas completas mostró expresión de GFP tanto en hojas agroinfiltradas como en hojas no agroinfiltradas (Figura 3.23, panel d). Pudo realizarse el seguimiento de la infección viral hasta 10 dpi (Figura 3.23, paneles d, f y h). A partir de 10 dpi, como puede observarse en la figura 3.23 (panel h), la expresión

de GFP comenzó a decaer hasta desaparecer de la hojas no inoculadas. Las plantas fueron mantenidas en las mismas condiciones y alrededor de los 14-15 dpi comenzaron a mostrar síntomas de infección típicamente causados por PepMV (Figura 3.24). No se observaron diferencias entre las plantas inoculadas con pBPep501 y pBPep5.128.

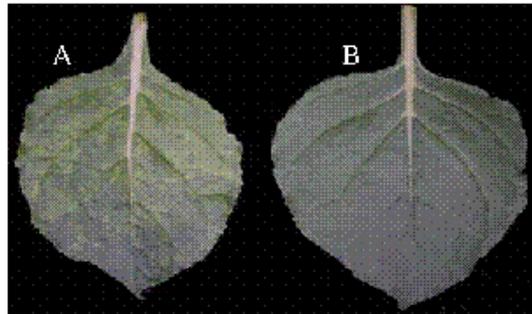


Figura 3.24. Síntomas en hojas de plantas agroinoculadas con pBPep501. A) Hoja apical de planta agroinfiltrada con la construcción pBPep501 a 15 dpi. B) Hoja de *N. benthamiana* sana.

Estos resultados sugirieron que durante el proceso de infección la GFP es escindida del genoma de Pep501 y Pep5.128, presumiblemente como consecuencia de eventos de recombinación homóloga debido a la duplicación de secuencias (Dawson y col., 1989). Para demostrar esta hipótesis se repitió el ensayo con el fin de analizar extractos de RNA de plantas agroinfiltradas con Pep501 y Pep5.128 a diferentes tiempos post-infiltración.

Se realizaron extracciones de RNA total de hoja agroinfiltrada y sin agroinfiltrar (a dos alturas por encima de la hoja agroinfiltrada: hoja no inoculada 1 y hoja no inoculada 2) a 7 dpi y a 10 dpi. Los extractos obtenidos fueron analizados por hibridación molecular (*dot-blot*) con sondas de RNA complementarias a la CP de PepMV y a la GFP. Como controles positivos de la hibridación se incluyeron extractos de RNA total de hoja de *N. benthamiana* infectada con PepXL6 para la sonda de la CP y extractos de RNA total de una región agroinfiltrada con el clon pBGFP para la sonda de la GFP. Como control negativo se incluyó un extracto de RNA total de una región agroinfiltrada con pBIN61.

El resultado de la hibridación se muestra en la siguiente figura (Figura 3.25).

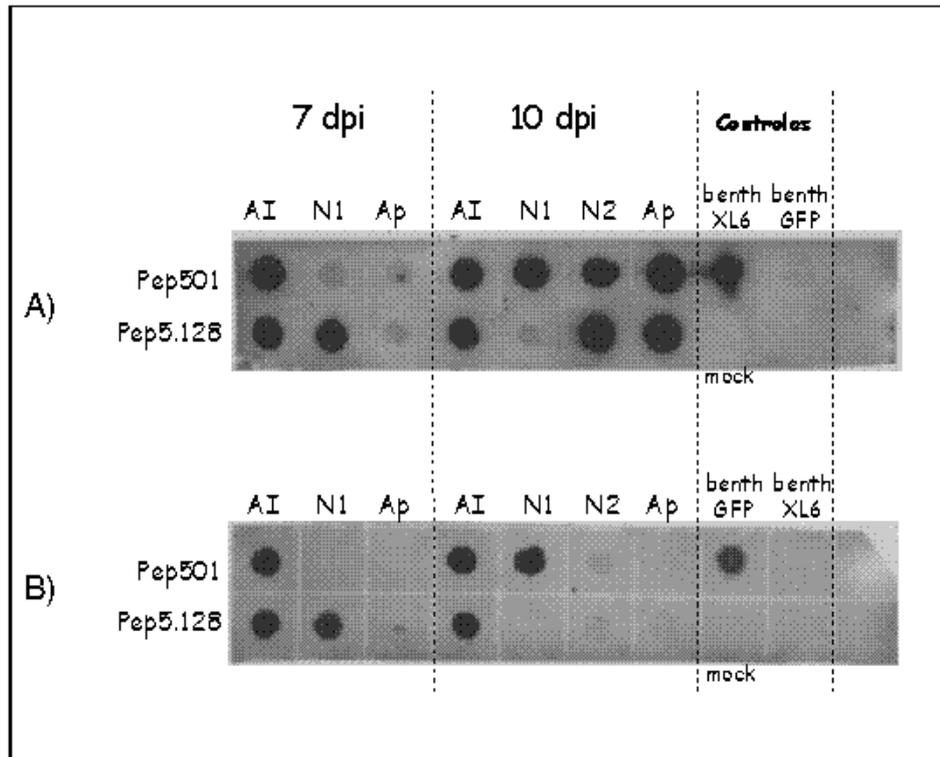


Figura 3.25. Resultado de una hibridación (*dot-blot*) en membrana mostrando la presencia de PepMV y GFP en plantas agroinfiltradas con los clones pBPep501 (fila 1) y pBPep5.128 (fila 2) a 7 y 10 dpi. A) Resultado de la hibridación con una sonda complementaria a la CP de PepMV. B) Resultado de la hibridación con una sonda complementaria a la GFP. En la parte superior de las membranas se indica la procedencia de los extractos de RNA incluidos: AI: hoja agroinfiltrada, N1: hoja no inoculada 1 (un piso por encima de la hoja agroinfiltrada), N2: hoja no inoculada 2 (dos pisos por encima de la hoja agroinfiltrada), Ap: hoja apical, benth XL6: hoja infectada con pBPepXL6, benth GFP: hoja agroinfiltrada con pBGFP y mock: hoja agroinfiltrada con pBIN61 (parte inferior de la membrana).

Los extractos de RNA procedentes de hoja directamente agroinfiltrada hibridaron con las dos sondas utilizadas (Figura 3.25, AI en los paneles A y B). Todos los extractos RNA analizados hibridaron con la sonda de PepMV a 7 y a 10 dpi (Panel A). Sin embargo, la detección de GFP no fue posible en todos los casos. Concretamente, a 10 dpi, destaca la intensidad de la señal obtenida en hojas apicales con la sonda de PepMV (Figura 3.25, N2 y Ap, panel A) en comparación con la leve intensidad o ausencia de señal obtenida al hibridar las mismas muestras con la sonda complementaria a la GFP (Figura 3.25, Panel B, filas 1 y 2). Estos resultados demuestran que el decaimiento en la emisión de fluorescencia observado a partir de 10 dpi en las hojas superiores, no inoculadas y apicales, está asociado con la reducida o nula acumulación del RNA de GFP en estas hojas. Por tanto, estos resultados sugieren que el ORF de la GFP ha sido eliminado del

genoma del vector viral durante el proceso de infección. Además, ocurre de modo similar en las dos versiones de vector viral generadas, Pep501 y Pep5.128.

Por otro lado, cabe destacar la baja intensidad de señal obtenida con la sonda de PepMV a 7 dpi en las hojas no inoculadas. Análisis previos en plantas agroinfiltradas con pBPepXL6 muestran que a 5 dpi la hibridación de extractos procedentes de hojas no inoculadas da lugar a una señal de intensidad equivalente a la obtenida en extractos de hoja agroinfiltrada. Estos resultados sugieren que Pep501 y Pep5.128 no son tan eficientes colonizando la planta como PepXL6 y probablemente la expresión del ORF de la GFP comprometa la eficiencia de los mismos.

3.3.3.3. Selección y ensayo de un promotor subgenómico heterólogo

La estrategia utilizada para el desarrollo de un vector viral derivado de PepMV basada en la duplicación del SGP de la CP resultó en la inestabilidad del gen foráneo. Para evitar eventos de recombinación homóloga planteamos la sustitución de uno de los SGP duplicados por el SGP de otro virus. Estudios previos demuestran la capacidad de algunos virus para expresar ORFs foráneos a través de promotores subgenómicos heterólogos, generalmente procedentes de virus relacionados (Koenig y col., 2006; Lee y col., 2000; Shivprasad y col., 1999). En nuestro caso decidimos explorar el uso de un SGP procedente de otro aislado de PepMV, PepMV-Ch2 (ID: DQ000985;(Ling, 2007)). PepMV-Ch2 reúne características que lo hacen un buen candidato a contener un SGP válido, entre ellas: (1) Presenta una homología de secuencia del 78% respecto de Sp13 y (2) al ser un aislado de PepMV, presumiblemente contenga elementos que actúan *en cis* conservados, necesarios para la expresión de sgRNA de la CP. Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo disponemos de clones de PepMV-Ch2, lo que nos permitió manipular su secuencia.

Se estudió la secuencia completa de PepMV-Ch2 con el fin de localizar la región correspondiente al SGP de la CP. Los análisis realizados desvelaron la existencia de una región conservada de 20 nt en el extremo 3' del ORF 4 (TGB3) entre los dos aislados (Figura 3.26). Esta región coincide con el inicio de la región seleccionada como SGP de la CP de Sp13 y además contiene el motivo de 8 nt conservado entre potexvirus.

A continuación, se delimitaron los extremos 5' y 3' del nuevo SGP (dándole el mismo tamaño que al SGP de PepMV-Sp13) y se realizó un alineamiento de las secuencias. El resultado del alineamiento entre ambas regiones mostró una homología de secuencia del 48% entre PepMV-Sp13 y -Ch2. Por tanto, el resultado de estos análisis preliminares sugiere que esta secuencia, procedente de PepMV-Ch2, sea una buena candidata para sustituir a uno de los SGPs duplicados en un vector viral derivado de Sp13.

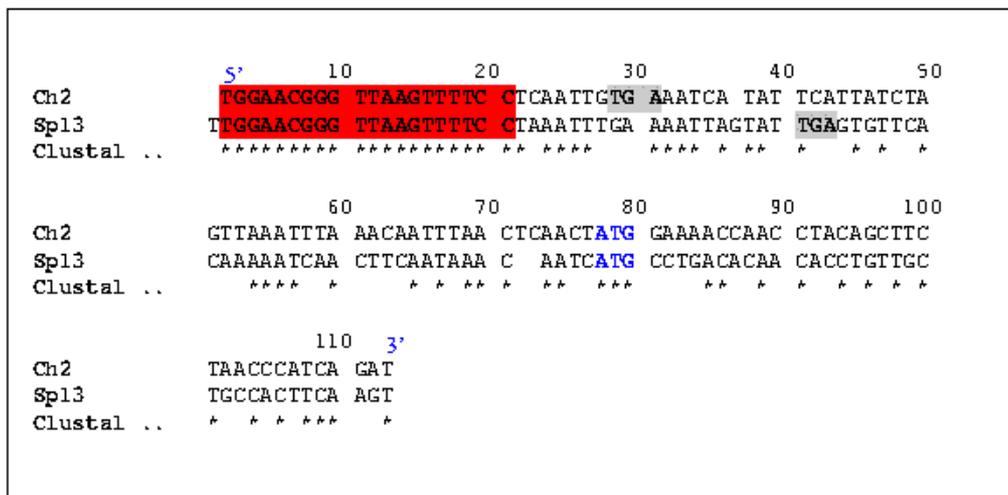


Figura 3.26. Localización del supuesto SGP de la CP en PepMV-Ch2. En rojo se encuentra la región conservada entre los dos aislados, en gris el codón stop del ORF 4 y en azul el codón de inicio de la traducción de la CP. 5' y 3', indican los bordes de los supuestos SGPs.

Por tanto, comprobamos la posibilidad de usar el SGP procedente del aislado PepMV-Ch2 y su eficiencia para expresar el gen de la GFP desde el genoma de PepMV-Sp13. Para ello se diseñó una construcción de PepMV quimérica (PepGFPΔCPCh2), basada esencialmente en el diseño de PepGFPΔCP1, en la cual el ORF de la GFP se encuentra bajo el control del SGP de Ch2 (Figura 3.27).

La estrategia utilizada para el desarrollo de la construcción se encuentra descrita en el apartado 3.2.4.6 de materiales y métodos. Como moldes de la reacción se utilizaron DNAs procedentes de los clones pBPepGFPΔCP1 y PeMU08/44 (procede de un aislado de campo tipo Ch2 que contiene las regiones correspondientes al TGB y CP; Gómez y col., 2009b). Dicha construcción fue clonada bajo el control del promotor 35S en pBIN61 resultando el clon pBPepGFPΔCPCh2.

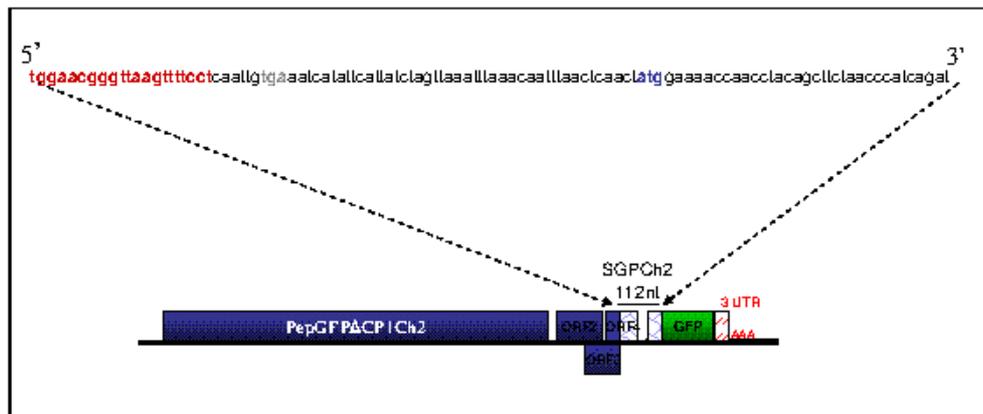


Figura 3.27. Esquema del mutante de PepMV quimérico, PepGFP Δ CPCh2. En la parte superior de la imagen aparece la secuencia procedente de PepMV-Ch2 seleccionada como posible SGP, que contiene 112 nt. En la parte de abajo, se encuentra el esquema de PepGFP Δ CPCh2. Las flechas indican la posición de inserción la secuencia.

Se realizaron ensayos de agroinfiltración con pBPepGFP Δ CPCh2 en plantas de *N. benthamiana*. Las agroinfiltraciones se realizaron en presencia de p19. Las regiones agroinfiltradas fueron observadas mediante microscopía confocal a 6 y a 10 dpi.

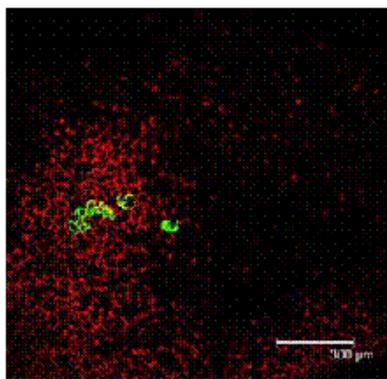


Figura 3.28. Focos de infección iniciados por PepGFP Δ CPCh2 en células de la epidermis y el mesófilo de hoja *N. benthamiana* directamente agroinfiltrada.

La emisión de fluorescencia verde por parte de células de la epidermis a 4 dpi en los tejidos agroinfiltrados demostró la capacidad de PepGFP Δ CPCh2 de replicarse e iniciar focos de infección (Figura 3.28). Estos resultados indican que es posible la expresión de un gen foráneo desde el genoma de PepMV-Sp13 a partir del SGP de Ch2.

Una vez establecida la infectividad de PepGFP Δ CPCh2 se decidió estimar el número de focos de infección iniciados y realizar una comparación con los

datos obtenidos en el apartado 3.3.2.4. Para ello se tomaron discos de hojas de 0,5 cm² de las regiones agroinfiltradas a 6 dpi y a 10 dpi y se contó el número de células aisladas que expresaban GFP dentro de cada disco.

La comparación de los resultados obtenidos con PepGFP Δ CPCh2 y los obtenidos en ensayos anteriores con PepGFP Δ CP1, 2, 3 y 4 se muestran en la siguiente figura.

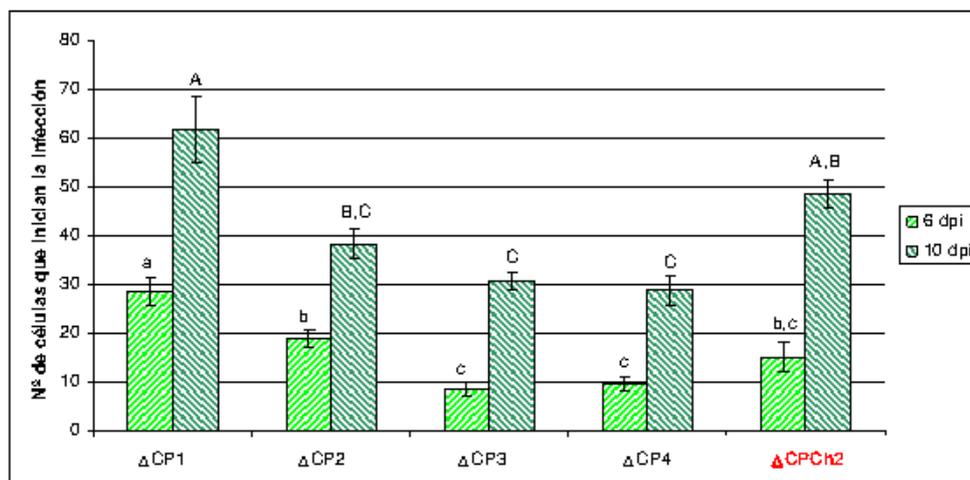


Figura 3.29. Comparación entre el n° de focos de infección iniciados por PepGFP Δ CPCh2 y otros mutantes de PepMV que no expresan la CP tras agroinfiltración. Clones utilizados: pBPepGFP Δ CP1 (Δ CP1), pBPepGFP Δ CP2 (Δ CP2), pBPepGFP Δ CP3 (Δ CP3), pBPepGFP Δ CP4 (Δ CP4) y pBPepGFP Δ CPCh2 (Δ CPCh2). Las infiltraciones se realizaron en presencia de p19 (clon pB19). Se contaron células aisladas que expresaban GFP en discos de hojas de 0,5 cm² a 6 y a 10 dpi. El experimento se repitió tres veces y cada medida resulta de la media de los valores obtenidos en 9 discos de hoja/construcción. A, A,B, B,C, C, a, b, b,c y c representan grupos homogéneos de acuerdo al valor medio de número de células que expresan GFP/construcción; construcciones con la misma letra no muestran diferencias significativas al mismo nivel de probabilidad del 95%, de acuerdo al Test de Tukey.

El resultado del análisis estadístico mostró que a 6 dpi el número de focos de infección iniciados por PepGFP Δ CPCh2 fue significativamente menor que el número de focos iniciados por PepGFP Δ CP1. Sin embargo, a 10 dpi se observa como la diferencia entre PepGFP Δ CPCh2 y PepGFP Δ CP1 se reduce, situándose PepGFP Δ CPCh2 como el segundo mutante que mayor número de focos de infección inicia.

También se estudió el comportamiento de PepGFP Δ CPCh2 aportando la CP en *trans* mediante agroinfiltración comparando con la construcción PepGFP Δ CP1. Bajo luz UV, los resultados obtenidos con PepGFP Δ CPCh2 fueron similares a los obtenidos con PepGFP Δ CP1. En la siguiente imagen (Figura 3.30)

se muestra la comparación de los resultados obtenidos con las dos construcciones a 10 dpi.

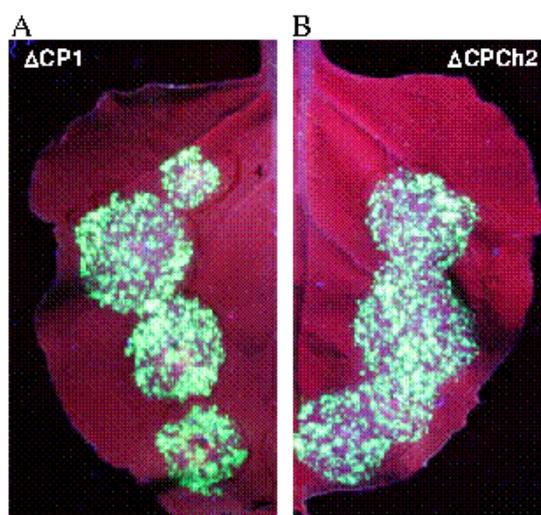


Figura 3.30. Restauración del movimiento del mutante quimérico *PepGFPΔCPCh2* (B) y comparación con el mutante *PepGFPΔCP1* (A). La agroinfiltración de las construcciones se realizó en presencia de CP (clon pBINCPep) y p19 (clon pB19). Imágenes tomadas a 6 y 10 dpi bajo la iluminación de luz UV.

En la imagen se puede apreciar como tanto el tamaño como la densidad de los focos de infección generados a los 10 dpi fue muy similar con las dos construcciones. Los resultados obtenidos indican que es posible restaurar el movimiento del mutante quimérico *PepGFPΔCPCh2* de un modo eficiente. Estos resultados también indican que la sustitución del SGP de *PepMV-Sp13* por el de *PepMV-Ch2* en *PepGFPΔCP1* no provoca diferencias significativas en el número de focos de infección iniciados ni en la eficiencia de la restauración del movimiento.

Por último, los resultados obtenidos en este apartado sugieren que un SGP heterólogo podría ser utilizado para mejorar la estabilidad un vector viral derivado de *PepMV*.

3.4. Discusión

En el presente trabajo, un cDNA al RNA genómico de un aislado de PepMV (PepMV-Sp13) ha sido clonado y situado bajo el control del promotor de transcripción 35S dentro del vector binario pBIN61 (Bendhamane y col., 2000). Este vector binario permite la síntesis del RNA viral “*in vivo*”. Se obtuvieron tres clones independientes denominados pBPepXL6, pBPepXL7 y pBPepXL9 los cuales fueron ensayados mediante agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. Todas las plantas agroinfiltradas reprodujeron la misma sintomatología observada en infecciones iniciadas con PepMV-Sp13 en *N. benthamiana* (i.e. mosaicos verdes suaves). La secuenciación parcial de pBPepXL6 reveló la existencia de mutaciones en los genes *TGB* y *CP* que provocaban cambios de aminoácidos y mutaciones silenciosas con respecto a la secuencia publicada de PepMV-Sp13 (Aguilar y col., 2003). El análisis y comparación de la secuencia de pBPepXL6 con otros aislados de PepMV mostró que los cambios de nucleótidos encontrados estaban presentes en las mismas posiciones dentro de la secuencia de PepMV-LE 2000, -LE 2002 o -FR (Cotillon y col., 2002; López y col., 2005), lo cual sugiere que estas variaciones de secuencia estuvieran presentes en la población de variantes que puedan formar parte del aislado PepMV-Sp13, o bien que se trate de errores en la secuencia publicada de PepMV-Sp13 y por eso no afecten a la infectividad del clon.

Implicación de la CP en la multiplicación de PepMV

Al iniciar este trabajo no se disponía de datos experimentales sobre la funcionalidad de las diferentes proteínas codificadas ni la localización/función de los posibles elementos situados en *cis* presentes en el genoma de PepMV. El papel desempeñado por éstos en el ciclo del virus únicamente se podía deducir de estudios previos realizados con otros potexvirus (Verchot-Lubicz y col 2007). Por tanto, y puesto que la construcción de un vector viral basado en PepMV podía afectar a la expresión del gen *CP*, se decidió realizar un estudio sobre la implicación de la CP en su multiplicación. Para ello, se procedió a la obtención de mutantes de PepMV en los que se bloqueó la expresión de la CP mediante la introducción de modificaciones: 1) PepXL6agg, posee el codón de inicio de la

traducción de la CP mutado y 2) PepGFP Δ CP1, posee el ORF de la GFP sustituyendo al de la CP. El análisis por Northern blot de protoplastos de *N. benthamiana* inoculados con las distintas construcciones de PepMV generadas (mutantes que no expresan la CP y clon infectivo) mostró la capacidad de los mutantes para multiplicarse en células aisladas; aunque observamos diferencias entre las construcciones que no expresan la CP.

Estudios previos con otros potexvirus demuestran que la introducción de mutaciones en la CP resulta en una marcada reducción de los niveles de acumulación de RNA viral en protoplastos (Chapman y col., 1992a; Forster y col., 1992; Lough y col., 2000). Estos autores sugieren que la CP de potexvirus estimula la acumulación del RNA viral. En los ensayos llevados a cabo con PepMV en protoplastos observamos comportamientos distintos en los mutantes. La introducción de la mutación puntual en el codón de inicio de la CP provocó una reducción notable en los niveles de RNA viral obtenidos. Entre otras razones, esta reducción podría deberse a la inestabilidad del RNA viral provocada por la no traducibilidad del ORF de la CP. Existen varios estudios que indican que la degradación de mRNAs en plantas está asociada a su traducibilidad (van Hoof y Green, 1996). La introducción de mutaciones en mRNAs puede producir cambios en el marco de lectura que den lugar a la aparición de codones de terminación prematura provocando la inestabilidad de los mRNAs. Estos mRNAs "aberrantes" presentes en el citoplasma son procesados por la maquinaria de regulación post-transcripcional la cual controla la traducción o degradación de mRNAs (Shyu y col., 2008). En línea con estas ideas, la sustitución del ORF de la CP por el de la GFP no dio lugar a diferencias respecto del clon infectivo, en contraste con lo observado en otros estudios (Lough y col. 2000). Sin embargo, como los análisis realizados en este caso no fueron cuantitativos, no podemos descartar tajantemente que en PepMV la CP esté implicada en la acumulación de RNA viral en células únicas. Sería necesario realizar estudios adicionales para esclarecer este aspecto.

El estudio del comportamiento de PepGFP Δ CP1 en tejido agroinfiltrado permitió confirmar que la CP de PepMV no es necesaria para su multiplicación a nivel unicelular, pero sí para el movimiento célula a célula del virus, en concordancia con resultados que otros autores han obtenido para otros virus del

mismo género (Chapman y col. 1992a; Lough y col. 2000). Los focos de infección iniciados pudieron ser visualizados mediante la detección de la fluorescencia generada por la GFP. Por tanto, los resultados obtenidos también indican que es posible expresar un gen foráneo (*GFP*) a partir del genoma de PepMV, condición fundamental para continuar con el desarrollo de un vector viral. Sin embargo, se observó un número muy reducido de focos de infección, los cuales sólo pudieron ser visualizados mediante microscopía confocal. Esta situación genera que la acumulación de RNAs virales en las regiones agroinfiltradas sea tan reducida que no se puedan detectar mediante Northern blot (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que aunque PepGFP Δ CP1 sea capaz de iniciar focos de infección existen factores derivados de la técnica utilizada para inocular que pueden enmascarar la eficiencia de los mutantes en tejido agroinfiltrado. Este fenómeno se encuentra descrito por Marillonnet y col. (2005) en trabajos llevados a cabo con mutantes de TMV:GFP que no expresan las proteínas del movimiento. Estos autores mostraron cómo tras la agroinfiltración de los mutantes sólo en un pequeño número de células se inicia la replicación: La preparación de protoplastos procedentes de las regiones agroinfiltradas con estos mutantes mostró que sólo en el 0,6-1,6% de las células se iniciaba la replicación (Marillonnet y col., 2005). Existen varias razones por las que un RNA viral pueda encontrar dificultades para comenzar la replicación tras la infiltración de un clon agroinfectivo. Una de ellas es que los virus de RNA se replican en el citoplasma y no se transcriben en el núcleo, por tanto no están expuestos a la maquinaria de procesamiento nuclear de pre-mRNAs (degradación de RNA, terminación prematura de la transcripción, etc). Como resultado, los transcritos generados en el núcleo correspondientes a un RNA viral puede que no sean reconocidos y procesados correctamente. Además, los vectores virales codifican transcritos muy largos (unas 6-7 kb, PepMV ó TMV), en general de un tamaño mayor que el de los transcritos de la planta (1-2 kb). Estos aspectos quedan ilustrados con los resultados obtenidos en este capítulo en relación con la expresión de GFP: en las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de las regiones agroinfiltradas con el clon pBGFP (utilizado como control en los ensayos de agroinfiltración), que contiene el ORF de la GFP (0,7 kb) situado bajo el promotor 35S, se puede observar como casi la totalidad del tejido agroinfiltrado expresa GFP (apartado 3.3.2.2).

A continuación, la realización de ensayos de complementación en los que se aportó la CP en *trans* demostró que era posible restaurar el movimiento célula a célula de mutantes que no expresan la CP. El seguimiento se llevó a cabo hasta 10 dpi, tiempo durante el cual pudieron distinguirse focos de infección de diferente tamaño. Además se observó que el inicio del movimiento célula a célula desde los focos iniciales hacia las células adyacentes no se produjo de modo sincronizado. Por ejemplo, a 6 dpi, se observaron focos en los que la infección permanecía restringida a la célula inicial (o en grupos de tres), focos formados por grupos de alrededor 4-9 células (resultado del movimiento a las células adyacentes) y focos formados por unas 20 células (resultado del movimiento a través de células adyacentes). Este fenómeno también se ha observado en estudios similares llevados a cabo con mutantes de PVX (Lough y col., 2000); probablemente esté relacionado con los niveles de expresión que alcance cada una de las construcciones co-agroinfiltradas dentro de una misma célula en un tiempo determinado.

Por último, y previamente al desarrollo del vector viral, se decidió realizar un estudio con el cual poder determinar el efecto de la introducción de modificaciones en las regiones 5' y 3' terminales del gen CP sobre la eficiencia de multiplicación de un vector viral derivado de PepMV tras agroinfiltración. Mediante ensayos de agroinfiltración con mutantes basados en PepGFP Δ CP1 a los que se les introdujo diferentes tipos de mutaciones en las regiones terminales 5' y 3' del ORF de la GFP se observó que la modificación de dichas regiones afectaba a la capacidad de iniciar focos de infección y al tiempo requerido para iniciarlos. De todos los mutantes ensayados el que generó mayor número de focos de infección en menos tiempo fue el que mantenía intactas estas regiones (PepGFP Δ CP1). Estos resultados se repitieron de forma consistente en experimentos en los que las construcciones fueron ensayadas en ausencia o en presencia de CP. Por tanto, estos resultados sugieren que la modificación de estas regiones podría afectar a la eficiencia de un vector viral derivado de PepMV. Muy probablemente estas regiones contengan elementos con actividad en *cis* implicados en una correcta replicación/traducción del virus (Hu y col., 2007; Zayakina y col., 2008). Estudios previos llevados a cabo con transcritos de PVX derivados de clones infectivos que contenían el SGP de la CP modificado

mostraban como los mutantes generados encontraban dificultad para replicarse en las plantas infectadas (Hu y col., 2007; Kim y Hemenway, 1997). En la mayoría de los casos, la mutación o delección de alguno de los nucleótidos situados en las regiones más conservadas del SGP (ej. motivo de 8 nt) puede reducir significativamente o incluso anular la síntesis de sgRNA (Kim y Hemenway, 1997; Koev y Miller, 2000). También se ha demostrado en virus de otros géneros, como TMV o el Virus de las manchas anulares cloróticas del hibisco (*Hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV; *Tombusvirus*), que la alteración de los SGP provoca reducciones notables en la acumulación de sgRNA (Grdzlishvili y col., 2000; Li y Wong, 2006). Por otro lado, otra razón podría ser que la modificación de estas regiones altere de algún modo la interacción de un elemento viral con factores del huésped (Ahluquist y col., 2003; Sriskanda y col., 1996). Se ha demostrado que un numeroso grupo de proteínas del huésped se unen a regiones del RNA viral regulando la síntesis de varios virus de RNA. Estas regiones incluyen extremos 5' y 3', y promotores internos de varios genomas y antígenomas (Lai, 1998). Estas proteínas en cuestión podrían estar bien involucradas en la regulación de la estabilidad del mRNA, formar parte del sistema de defensa del huésped encargado de inhibir la infección degradando el RNA viral o tener otras funciones. Un primer paso para analizar este aspecto consistiría en analizar si estos cambios alteran la complementariedad con otro elemento en *cis* y/o producen cambios en la estructura secundaria del RNA.

Diseño de un vector viral derivado de PepMV

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la posibilidad de generar un vector viral basado en el genoma de PepMV. Se generaron dos construcciones derivadas de PepMV (pBPep501 y pBPep5.128) en las que el ORF de la GFP fue situado bajo el control del SGP de la CP. Los ensayos de agroinfiltración llevados a cabo con ambas construcciones mostraron la capacidad de los vectores virales para expresar GFP e infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana*. La iluminación con luz UV de las plantas completas a 5 dpi mostró expresión de GFP tanto en hojas agroinfiltradas como en hojas no agroinfiltradas. Sin embargo, a 10 dpi la expresión de GFP comenzó a decaer drásticamente, seguramente como consecuencia de la inestabilidad *in planta* de las

construcciones. El análisis por Northern blot de las regiones agroinfiltradas a 6 dpi mostró la presencia de una banda adicional de tamaño equivalente al gRNA de PepMV sin modificar (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que la recombinación provoca la aparición de variantes del tipo silvestre a pocos dpi. Mientras que la duplicación de secuencias no provoca tanta inestabilidad en el vector viral basado en PVX (Baulcombe y col., 1995), en vectores basados en otros virus los fenómenos de recombinación homóloga provocan que las secuencias insertadas en su genoma sean eliminadas espontáneamente con mayor o menor rapidez (Dawson y col., 1989; Dolja y col., 1993; Donson y col., 1991; Haviv y col., 2006; Rabindran y Dawson, 2001; Zhao y col., 2000). La rapidez con la que Pep501 o Pep5.128 pierden el inserto ha resultado mayor que la descrita para otros vectores virales, para los cuales se describe que ocurre trascurridos como mínimo 18-30 días (Dawson y col., 1989; Zhao y col., 2000) o tras sucesivos pases (Rabindran y Dawson, 2001). Probablemente en nuestro caso el tamaño del SGP (112 nt vs 50 nt en el vector viral derivado de PVX) haya sido una de las razones que ha potenciado los fenómenos de recombinación e inestabilidad. Por otro lado, la ausencia de síntomas en las plantas inoculadas con Pep501 y Pep5.128 junto con los reducidos niveles de acumulación de RNA de GFP obtenidos en las hojas sistémicas sugieren que la presencia de la GFP en el genoma de PepMV ejerza un efecto negativo sobre la eficiencia del virus para colonizar la planta. Rabindran y Dawson (2001) en su estudio sobre el comportamiento de recombinantes derivados del vector viral basado en TMV demostraron que la inserción de secuencias foráneas provocaba que la capacidad de replicación del virus resultante fuera substancialmente menor que la del silvestre (Rabindran y Dawson, 2001). De igual modo, Guo y col. (1998) observaron que la incorporación del gen GUS en el genoma del Virus de la sharka (*Plum pox potyvirus*; PPV) afectaba a la capacidad del virus para infectar plantas de *Nicotiana clevelandii* (Guo y col., 1998). Por tanto, de todos estos resultados surgió la necesidad de rediseñar las construcciones.

Puesto que la estrategia planteada esta basada en el desarrollo de un vector viral autónomo, es importante mantener intactos aquellos elementos virales implicados en una correcta traducción/síntesis, movimiento, etc (*i.e.* elementos que actúan en *cis*) (Hu y col., 2007; Kim y Hemenway, 1997; Olsthoorn y col.,

2004; Ranjith-Kumar y col., 2003; Sun y Simon, 2006). Por tanto, el conocimiento de las regiones que contienen dichos elementos será imprescindible para la mejora y optimización de un vector viral. Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido delimitar una región que actúa como promotora del sgRNA del ORF de la CP en PepMV. Los resultados obtenidos tras el ensayo de los mutantes permitieron: 1) delimitar el extremo 3' de esta región (a 36 nt aguas abajo del codón de inicio del ORF de la CP) y 2) mostrar su implicación en la capacidad de los mutantes para iniciar focos de infección. Para el desarrollo del vector viral delimitamos también el extremo 5', el cual fue situado a 76 nt aguas arriba del codón de inicio del ORF de la CP. De la viabilidad de los vectores virales diseñados de PepMV se pudo deducir que la región seleccionada contenía todos los elementos funcionales necesarios para su actividad. Se ha descrito que mientras que en los nucleótidos presentes aguas arriba del codón de inicio de la traducción se encuentran los elementos críticos para su actividad, los que se encuentran localizados dentro del ORF suelen tener como función potenciar la síntesis del sgRNA (Grzelishvili y col., 2000; Lee y col., 2000). Por lo que deberían realizarse estudios adicionales para acotar esta región a la mínima necesaria sin que pierda actividad.

Existen varias líneas de actuación que se pueden seguir para mejorar la eficiencia y estabilidad de un vector viral (Marillonet y col., 2004; Shivprasad y col. 1999; Toth y col., 2002). Una de ellas, y la más accesible en nuestro caso, fue la sustitución de una de las secuencias duplicadas por otra secuencia heteróloga que contenga los mismos elementos funcionales. La introducción de secuencias heterólogas procedentes de otros *tobamovirus* en el caso de TMV resultó en el aumento de la estabilidad de los vectores generados (Shivprasad y col. 1999). Partiendo de estos antecedentes decidimos estudiar la posibilidad de utilizar el SGP procedente del aislado PepMV-Ch2 (Ling., 2007). La introducción del supuesto SGP de PepMV-Ch2 en el mutante pBPepGFP Δ CP1 dio lugar a una nueva construcción denominada pBPepGFP Δ CPCh2. Los ensayos de agroinfiltración realizados con pBPepGFP Δ CPCh2 indican que es posible la expresión de un gen foráneo desde el genoma de PepMV-Sp13 a partir del SGP de PepMV-Ch2. Por tanto estos resultados sugieren que la utilización de un SGP

heterólogo podría ser utilizado para mejorar la estabilidad de un vector viral derivado de PepMV.

Expectativas y usos potenciales

En general los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores en varios sentidos. En primer lugar, con los datos obtenidos se ha demostrado que PepMV posee un genoma con capacidad de soportar la síntesis de un gen foráneo y además expresarlo usando secuencias de control heterólogas. Estos resultados sugieren que un vector viral autónomo y estable derivado de PepMV podrá ser desarrollado con relativa facilidad. En segundo lugar, este trabajo ha aportado nuevas herramientas, como clones infectivos del tipo silvestre y clones marcados con GFP, que abren la posibilidad de iniciar nuevas líneas de investigación con PepMV, como localización subcelular, interacción virus-huesped, ensayos de competición, etc.

Entre las líneas más interesantes que se podrían desarrollar se encuentra la búsqueda de fuentes de resistencia a este virus en colecciones de mutantes de tomate. La utilización de esta herramienta permitiría realizar la detección viral en un tiempo precoz y de una forma sencilla (Whitham y col., 1999). Las plantas de tomate y especies afines no presentan síntomas evidentes de infección tras 10 días post-inoculación, la detección de la infección viral requiere pues de una técnica complementaria para la evaluación de la susceptibilidad. El desarrollo de estas construcciones portadoras de un gen delator evitaría el uso de estas técnicas complementarias ya que la detección se realizaría por medio de lámparas de luz ultravioleta por ejemplo, expresando fluorescencia sólo las plantas susceptibles, que permiten la replicación del virus.

Por último, los vectores virales se han convertido en una de las estrategias más interesantes para expresión de proteínas recombinantes (de interés farmacéutico o industrial) en plantas (Lico y col., 2008). En nuestro caso, PepMV reúne varias características que lo hacen un buen candidato para ser utilizado como vector de expresión de proteínas de interés: 1.) Algunas de las proteínas que expresa su genoma, como la CP, se acumulan a muy altos niveles en las plantas inoculadas; 2.) Los síntomas que induce en las plantas inoculadas son suaves y no

conducen a la muerte de éstas; 3.) Está presente en los agroecosistemas de nuestro país; 4.) Se acumula en grandes cantidades en *N. benthamiana* (posible planta candidata para la expresión de proteínas); 5.) Existen antecedentes de virus del mismo género, como PVX, utilizados con éxito para generar vectores virales. A partir de las herramientas obtenidas en este trabajo se podrán desarrollar dos sistemas de expresión de proteínas independientes. Uno de ellos basado en un vector viral autónomo y otro basado en un vector viral "deconstruido" (Fujiki y col., 2008; Gleba y col., 2007; Sainsbury y col., 2008), donde aportaríamos la CP *en trans*.

CAPÍTULO 4

Conclusiones

CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

Búsqueda de fuentes de resistencia natural a PepMV

1. Las fuentes de resistencia natural a PepMV en el género *Solanum* son muy escasas.
2. Las discrepancias observadas entre resultados obtenidos por diferentes autores crean la necesidad de realizar estudios adicionales para confirmar los fenotipos de resistencia y su comportamiento frente a diferentes aislados.
3. Se ha identificado una entrada perteneciente a la especie *S. corneliomuelleri* (COM-2) que muestra resistencia parcial a PepMV-Sp13. El resultado del análisis de la descendencia de esta entrada sugiere que se trate de una resistencia poligénica o cuantitativa.

Desarrollo de un vector viral derivado de PepMV

4. Se ha generado un clon agroinfectivo de un aislado de PepMV (PeMV-Sp13), pBPepXL6, a partir del cual se pueden sintetizar *in vivo* RNAs virales. Este clon ha constituido una herramienta útil para el estudio funcional del genoma de PepMV y el posterior desarrollo de un vector viral.
5. El análisis de mutantes de PepMV que no expresan la CP o que sustituyen la CP por GFP ha permitido establecer que: (1) PepMV no requiere la CP para su multiplicación en células inoculadas pero sí para el movimiento célula a célula, (2) PepMV posee un genoma con capacidad para portar un gen foráneo y facilitar su expresión y (3) el número de focos iniciales de infección a que da lugar la agroinfiltración de clones derivados de PepMV es muy reducido.

6. Una estrategia utilizada para el diseño de un vector viral derivado de PepMV, basada en la duplicación del promotor subgenómico de la CP, está asociada con la inestabilidad del gen foráneo. No obstante, se ha demostrado que también es posible expresar un gen foráneo desde el genoma del virus a través de una secuencia de control heteróloga. El uso de secuencias control heterólogas podría mejorar la estabilidad de las construcciones. Por tanto, un vector viral autónomo y estable derivado de PepMV podrá ser desarrollado con relativa facilidad.
7. Se ha delimitado una región del genoma de PepMV que contiene todos los elementos funcionales necesarios para actuar como promotora del sgRNA de la CP. La alteración de esta secuencia podría afectar negativamente a la eficiencia de un vector viral derivado de PepMV.

CAPÍTULO 5

Bibliografía

CAPÍTULO 5.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., y Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol* **149**, 1045-1060.
- Abad, J., Anastasio, G., Fraile, A. y García-Arenal, F. (2000). A search for resistance to *Cucumber mosaic virus* in the genus *Lycopersicon*. *J Plant Pathol* **82**, 39-48.
- Abler, M. L. y Green, P. J. (1996). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol Biol* **32**, 63-78.
- Aguilar, J. M., Hernández-Gallarod, M. D., Cénis, J. L., Lacasa, A. y Aranda, M. A. (2002). Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Arch Virol* **147**, 2009-2015.
- Ahlquist, P., French, R., Janda, M. y Loesch-Fries, L. S. (1984). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 7066-7070.
- Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W.-M., Kushner, D. B. y Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**, 8181-8186.
- Ajjikuttira, P., Loh, C. S. y Wong, S. M. (2005). Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of *Cymbidium mosaic virus* RNA by *Odontoglossum ringspot virus* coat protein. *J Gen Virol* **86**, 1543-1553.
- Alconero, R., Provvidenti, R. y Gonsalves, D. (1986). Three *Pea seed-borne mosaic virus* pathotype from pea and lentil germoplasma. *Plant Dis* **70**, 783-786.
- Alfaro-Fernández, A., Córdoba Sellés, M. C., Cebrián Micó, M. C., Font, I., Juárez, M., Medina, V., Lacasa, A., Sánchez Navarro, J. A., Pallás, V. y Jordá Gutiérrez, C. (2006). Necrosis del tomate: "torrao" o "cribado". *Bol. San. Veg. Plagas* **32**, 545-562.
- Alonso, E., García Luque, I., Ávila-Rincón, M. J., Wicke, B., Serra, M. T. y Díaz-Ruiz, J. R. (1989). A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. *J Phytopathol* **125**, 67-66.
- Amari, K., Sánchez-Pina, M. A. y Pallás, V. (2003). Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus* by gametes in apricot. In *19th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops*, pp. 109-113. Edited by G. Llacer. Anaheim, CA: International Society Horticultural Science.
- Amari, K., González-Ibeas, D., Gómez, P., Sempere, R. N., Sánchez-Pina, M. A., Aranda, M. A., Díaz-Pendón, J. A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Blanca, J., Hernández-Gallardo, M. D. y Anastasio, G. (2008). *Tomato torrado virus* is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. *Plant Dis* **92**, 1139-1139.

- Aramburu, J. (2001).** First Report of *Parietaria mottle virus* on Tomato in Spain. *Plant Dis* **85**, 1210-1210.
- 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 $y^{\prime}(pr2^{\prime})$ resistance gene. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**, 314-318.
- Atabekov, J., Dobrov, E., Karpova, O. y Rodionova, N. (2007).** *Potato virus X*: structure, disassembly and reconstitution. *Mol Plant Pathol* **8**, 667-675.
- Bai, Y. L. y Lindhout, P. (2007).** Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Ann Bot* **100**, 1085-1094.
- Bailiss, K. W. y Offei, S. K. (1990).** *Alfalfa mosaic-virus* in lucerne seed during seed maturation and storage, and in seedlings. *Plant Pathol* **39**, 539-547.
- Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V. y Rodionova, N. P. (2004).** N-terminal segment of *Potato virus X* coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur J Biochem* **271**, 3136-3145.
- Barker, H., Waterhouse, P. M., Smith, H. G. y Barkers, H. (1999).** The development of resistance to luteovirus mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. In *The luteoviridae*, pp. 169-210. Wallingford, UK: CAB international.
- Barnett, O. W., Main, C. E., Granoff, A. y Webster, R. G. (1999).** Plant virus disease-economic aspects. In *Encyclopedia of Virology*, pp. 1318-1326. San Diego: Academic Press.
- Batten, J. S., Yoshinari, S. y Hemenway, C. (2003).** *Potato virus X*: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Mol Plant Pathol* **4**, 125-131.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S. y Cruz, S. (1995).** Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* **7**, 1045-1053.
- Baulcombe, D. (2002).** RNA silencing. *Curr Biol* **12**, R82-R84.
- Baulcombe, D. (2004).** RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y. y Baulcombe, D. C. (2005).** Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J* **44**, 471-482.
- Beck, D. L., Vandolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., Obrien, I. E. W. y Forster, R. L. S. (1994).** Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10310-10314.
- Bendahmane, A., Kohm, B. A., Dedi, C. y Baulcombe, D. C. (1995).** The coat protein of *Potato virus X* is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J* **8**, 933-941.

- Bendahmane, A., Kanyuka, K. y Baulcombe, D. C. (1999).** The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-791.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. y Baulcombe, D. C. (2000).** *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J* **21**, 73-81.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P. y Baulcombe, D. C. (2002).** Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J* **32**, 195-204.
- Blanch, E. W., Robinson, D. J., Hecht, L., Syme, C. D., Nielsen, K. y Barron, L. D. (2002).** Solution structures of *Potato virus X* and narcissus mosaic virus from Raman optical activity. *J Gen Virol* **83**, 241-246.
- Boyer, J. C. y Haenni, A. L. (1994).** Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415-426.
- Canizares, M. C., Nicholson, L. y Lomonossoff, G. P. (2005).** Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol* **83**, 263-270.
- 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., Kasschau, K. D. y Johansen, L. K. (2001).** Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**, 1-5.
- Chapman, S., Hills, G., Watts, J. y Baulcombe, D. (1992a).** Mutational analysis of the coat protein gene of *Potato virus X*: Effects on virion morphology and viral pathogenicity. *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.
- Chung, B. N., Cantó, T. y Palukaitis, P. (2007).** Stability of recombinant plant viruses containing genes of unrelated plant viruses. *J Gen Virol* **88**, 1347-1355.
- Cillo, F., Pasciuto, M. M., De Giovanni, C., Finetti-Sialer, M. M., Ricciardi, L. y Gallitelli, D. (2007).** Response of tomato and its wild relatives in the genus *Solanum* to *Cucumber mosaic virus* and satellite RNA combinations. *J Gen Virol* **88**, 3166-3176.
- Commandeur, U., Jarasch, W., Li, Y., Koenig, R. y Burgermeister, W. (1991).** cDNAs of *Beet necrotic yellow vein virus* RNAs 3 and 4 are rendered biologically active in a plasmid containing the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter. *Virology* **185**, 493-495.
- Córdoba-Sellés, M. D. C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A. y Jordá-Gutiérrez, C. (2007).** Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Dis* **91**, 1250-1254.
- Cotillon, A. C., Girard, M. y Ducouret, S. (2002).** Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Arch Virol* **147**, 2231-2238.

- Cruz, S. S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. y Oparka, K. J. (1996).** Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6286-6290.
- Cruz, S. 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.
- Cruz, S. S. (1999).** Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in must come out. *Trends in Microbiology* **7**, 237-241.
- Cuadrado, I., Guerra-Sanz, J., García, C., Aguilar, M. y Moreno, P. (1995).** First report of *Tomato bushy stunt virus* in Almeria (Spain) *Plant Dis* **79**.
- Dangl, J. L. y Jones, J. D. G. (2001).** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Davenport, G. F. y Baulcombe, D. C. (1997).** Mutation of the GKS motif of the RNA-dependent RNA polymerase from *Potato virus X* disables or eliminates virus replication. *J Gen Virol* **78**, 1247-1251.
- Dawson, W. O., Lewandowski, D. J., Hill, M. E., Bubrick, P., Raffo, A. J., Shaw, J. J., Grantham, G. L. y Desjardins, P. R. (1989).** A *Tobacco mosaic virus*-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* **172**, 285-292.
- de Andrés, M. F., García-Arenal, F., López, M. M. y Melgarejo, P. (1998).** *Patógenos de plantas descritos en España*. ISBN: 84-491-0403-3.
- Desbiez, C. y Lecoq, H. (1997).** *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathol* **46**, 809-829.
- Díaz, J. A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. y Aranda, M. A. (2004).** Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**, 668-675.
- Díaz-Pendón, J. A., Truniger, V., Nieto, C., García-Más, J., Bendahmane, A. y Aranda, M. A. (2004).** Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol Plant Pathol* **5**, 223-233.
- Ding, X. S., Shintaku, M. H., Arnol, 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.
- Dogimont, C., Chovelon, V., Tual, S., Boissot, N., Rittener-Rüff, V., Giovinazzo, N. y Bendahmane, A. (2008).** Molecular diversity at the *Vat/Pm-W* resistance locus in melon. In *Cucurbitaceae, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*, pp. 219-228. Edited by M. Pitrat. Avignon (France).
- Dolja, V. V., Herndon, K. L., Pirone, T. P. y Carrington, J. C. (1993).** Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J Virol* **67**, 5968-5975.

- Donson, J., Kearney, C. M., Hilf, M. E. y Dawson, W. O. (1991). Systemic expression of a bacterial gene by a *Tobacco mosaic virus*-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7204-7208.
- EPPO EU survey on *Pepino mosaic potexvirus*.
http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/viruses/PEPMV0.htm.
- Font, M. I., Martínez-Culebras, P., Jordá, M. C., Louro, D., Vaira, A. M. y Accotto, G. P. (2002). First Report of *Tomato infectious chlorosis virus* in Spain. *Plant Dis* **86**, 696-696.
- 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.
- Fraser, R. S. S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **28**, 179-200.
- Fujiki, M., Kaczmarezyk, J. F., Yusibov, V. y Rabindran, S. (2008). Development of a new *Cucumber mosaic virus*-based plant expression vector with truncated 3a movement protein. *Virology* **381**, 136-142.
- Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D. J. y Gaba, V. (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *J Virol Methods* **64**, 103-110.
- Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C. L., Ellis, T. H. N. y Maule, A. J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor *eIF4E* in cell-to-cell trafficking. *Plant J* **40**, 376-385.
- Gibbs, K. S., Hellmann, G. M. y Pirone, T. P. (1989). Nature of resistance of a tobacco cultivar to *Tobacco vein mottling virus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **2**, 332-339.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. y Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin. Biotechnol* **18**, 134-141.
- Goldbach, R., Bucher, E. y Prins, M. (2003). Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res.* **92**, 207-212.
- Gómez, P., Rodríguez-Hernández, A. M., Moury, B. Aranda, M.A. (2009a) Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *Eur. J. Plant Pathol.* En prensa.
- Gómez, P., Sempere, R. N, Aranda, M.A. y Elena, S. F. (2009b). Evolutionary dynamics of *Pepino mosaic virus* during epidemics in Southeastern Spain. Enviado J. Virol
- Goodrick, B. J., Kuhn, C. W. y Hussey, R. S. (1991). Restricted systemic movement of *Cowpea chlorotic mottle virus* in soybean with non necrotic resistance. *Phytopathol.* **81**, 1426-1431.
- Grzelishvili, V. Z., Chapman, S. N., Dawson, W. O. y Lewandowski, D. J. (2000). Mapping of the *Tobacco mosaic virus* movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. *Virology* **275**, 177-192.

- Green, S. K., Hwang, L. L. y Kuo, Y. K. (1987). Epidemiology of *Tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strains. *J. Plant Dis. Protect.* **94**, 386-387.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. y Walden, R. (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3282-3286.
- Guo, H. S., López-Moya, J. J. y García, J. A. (1998). Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric *Plum pox potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *Virus Res* **57**, 183-195.
- Hadidi, A., Khetarpal, R.K. y Koganezawa, H. (1998). Plant virus disease control. *APS Press, StPaul, MN*.
- Hämäläinen, J. H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K. N. y Valkonen, J. P. (2000). Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of *Potato virus A* in diploid potatoes. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 402-412.
- Hamilton, A. J. y Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. y Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* **21**, 4671-4679.
- Hanssen, I., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., Vanachter, A. y Thomma, B. (2008). Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *Eur J Plant Pathol* **121**, 131-146.
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., Vanachter, A. C. R. C. y Thomma, B. P. H. J. (2009). *Pepino mosaic virus* isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathol* **58**, 450-460.
- Harrison, B. D. y Robinson, D. J. (2005). Another quarter century of great progress in understanding the biological properties of plant viruses. *Ann Appl Biol* **146**, 15-37.
- Haviv, S., Galiakparov, N., Goszczynski, D. E., Batuman, O., Czosnek, H. y Mawassi, M. (2006). Engineering the genome of *Grapevine virus A* into a vector for expression of proteins in herbaceous plants. *J Virol Methods* **132**, 227-231.
- Hilje, L., Costa, H. S. y Stansly, P. A. (2001). Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. *Crop Protection* **20**, 801-812.
- Hu, B., Pillai-Nair, N. y Hemenway, C. (2007). Long-distance RNA-RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the *Potato virus X* genome mediate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* **13**, 267-280.
- Huang, C. Y., Huang, Y. L., Meng, M. S., Hsu, Y. H. y Tsai, C. H. (2001). Sequences at the 3'untranslated region of *Bamboo mosaic potexvirus* RNA interact with the viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **75**, 2818-2824.

- Huisman, M. J., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F. y Cornelissen, B. J. C. (1988).** The complete nucleotide-sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino-acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J Gen Virol* **69**, 1789-1798.
- Hull, R. (1989).** The movement of viruses in plants. *Annu Rev Phytopathol* **7**, 213-240.
- Hull, R. (2002).** *Mathew's Plant Virology*. San Diego, CA: Academic Press.
- Jia, H., Pang, Y. Q. y Fang, R. X. (2003).** Agroinoculation as a simple way to deliver a *Tobacco mosaic virus*-based expression vector. *Acta Botánica Sinica* **45**, 770-773.
- Johansen, E., Edwards, M. C. y Hampton, R. O. (1994).** Seed transmission of viruses - current perspectives. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 363-386.
- Johansen, I. E., Lund, O. S., Hjulsager, C. K. y Laursen, J. (2001).** Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J Virol* **75**, 6609-6614.
- Jones, A. T. (1998).** Control of virus infection in crops through breeding plants for vector resistance. St. Paul, Minnesota: *The American Phytopathological Society*.
- Jones, R. A. C., Koenig, R. y Leseman, D.-E. (1980).** *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Ann Appl Biol* **94**, 61-68.
- Jordá, C. (1996).** Informe tomate: incidencia de los virus. In *Hortoinformación*, pp. 41-42.
- Jordá, C., Lázaro, A., Font, I., Lacasa, A., Guerrero, M. M. y Cano, A. (2000).** Nueva enfermedad en el tomate. *Phytoma-España* n° **119** Pág. 23-28.
- Ju, H. J., Brown, J. E., Ye, C. M. y Verchot-Lubicz, J. (2007).** Mutations in the central domain of *Potato virus X* TGBp2 eliminate granular vesicles and virus cell-to-cell trafficking. *J. Virol* **81**, 1899-1911.
- Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y. S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S. y Verchot-Lubicz, J. (2005).** The Potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiol* **138**, 1877-1895.
- Kang, B. C., Yeam, I. y Jahn, M. M. (2005).** Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 581-621.
- Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zayakina, O. V., Nikitin, N. A., Kiselyova, O. I., Kozlovsky, S. V., Rodionova, N. P. y Atabekov, J. G. (2006).** Translational regulation of *Potato virus X* "RNA-coat protein" complexes: The key role of coat protein N-terminal peptide. *Mol Biol* **40**, 703-710.
- Kendall, A., Bian, W., Junn, J., McCullough, I., Gore, D. y Stubbs, G. (2007).** Radial density distribution and symmetry of a *Potexvirus*, *Narcissus mosaic virus*. *Virology* **357**, 158-164.

- Khetarpal, R. K., Maisonneuve, B., Maury, Y., Chalhoub, B., Dinant, S., Lecoq, H., Varma, A., Hadidi, A., Khetarpal, R. K., and Koganezawa, H. (1998).** Breeding for resistance to plant viruses. In "Plant virus disease control" (A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, Eds.), Vol. Second Edition, pp. 14-32. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Kim, K. H. y Hemenway, C. (1996).** The 5' nontranslated region of *Potato virus X* RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *J. Virol* **70**, 5533-5540.
- Kim, K. H. y Hemenway, C. (1997).** Mutations that alter a conserved element upstream of the *Potato virus X* triple block and coat protein genes affect subgenomic RNA accumulation. *Virology* **232**, 187-197.
- Kim, K. H. y Hemenway, C. L. (1999).** Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect *Potato virus X* plus-strand RNA accumulation. *RNA-Publ RNA Soc* **5**, 636-645.
- Kim, K. H., Kwon, S. J. y Hemenway, C. (2002).** Cellular protein binds to sequences near the 5' terminus of *Potato virus X* RNA that are important for virus replication. *Virology* **301**, 305-312.
- Király, L. y Király, Z. (2006).** To die or not to die- Is cell death dispensable for resistance during the plant hypersensitive response? *Acta Phytopathologica et Hungarica* **41**, 11-21
- Koenig, R., Lesemann, D. E., Loss, S., Engelmann, J., Commandeur, U., Deml, G., Schiemann, J., Aust, H. y Burgermeister, W. (2006).** *Zygocactus virus X*-based expression vectors and formation of rod-shaped virus-like particles in plants by the expressed coat proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* and *Soil-borne cereal mosaic virus*. *J Gen Virol* **87**, 439-443.
- Koev, G. y Miller, W. A. (2000).** A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol* **74**, 5988-5996.
- Kogan, M. y Ortman, E. E. (1978).** Antixenosis - A new term proposed to replace Painter's 'nonpreference' modality of resistance. *Bull The Entomological Society of America* **24**, 175-176.
- Kozak, M. (1986).** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M. E. y Verchot-Lubicz, J. (2002).** Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. *Virology* **300**, 269-281.
- Kwon, S. J., Park, M. R., Kim, K. W., Plante, C. A., Hemenway, C. L. y Kim, K. H. (2005).** *cis*-Acting sequences required for coat protein binding and in vitro assembly of *Potato virus X*. *Virology* **334**, 83-97.
- Kwon, S. J. y Kim, K. H. (2006).** The SL1 stem-loop structure at the 5'-end of *Potato virus X* RNA is required for efficient binding to host proteins and for viral infectivity. *Mol Cells* **21**, 63-75.

- Lacasa, A., Guerreo, M. M., Hita, I., Martínez, M. A., Jordá, C., Bielza, P., Contreras, J., Alcázar, A. y Cano, A. (2003). Implicaciones de los abejorros (*Bombus* spp.) en la dispersión del Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) en cultivos de tomate. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **29**, 393-403.
- Lai, M. M. C. (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: A Parallel to DNA-Dependent RNA Transcription. *Virology* **244**, 1-12.
- Lai, M. M. C. (2000). The making of infectious viral RNA: No size limit in sight. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5025-5027.
- Larry, R. y Joanne, L. (2007). *Genetic resources of tomato*. In: *Genetic improvement of solanaceous crops, vol 2: Tomato*. Razdan Mk, Mattoo A. K. eds. Science Publishers, Inc. p. 25-75.
- Lazarowitz, S. G. y Beachy, R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**, 535-548.
- Lazarowitz, S.G. (2002) Plant Viruses In: *Fundamental Virology* (4th Ed). Knipe, D.M. y Howley, P.M. (Eds). And Wilkins. Philadelphia, USA., 1-107
- Lecoq, H., Moury, B., Desbiez, C., Palloix, A., Pitrat, M. y Xq (2004). Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res* **100**, 31-39.
- Lecours, K., Tremblay, M. H., Gagne, M. E. L., Gagne, S. M. y Leclerc, D. (2006). Purification and biochemical characterization of a monomeric form of *Papaya mosaic potexvirus* coat protein. *Protein Expr Purif* **47**, 273-280.
- Lee, Y. S., Lin, B. Y., Hsu, Y. H., Chang, B. Y. y Lin, N. S. (1998). Subgenomic RNAs of *Bamboo mosaic potexvirus-V* isolate are packaged into virions. *J Gen Virol* **79**, 1825-1832.
- Lee, Y. S., Hsu, Y. H. y Lin, N. S. (2000). Generation of subgenomic RNA directed by a satellite RNA associated with *Bamboo mosaic potexvirus*: Analyses of *potexvirus* subgenomic RNA promoter. *J Virol* **74**, 10341-10348.
- Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. y Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with *Beet western yellows luteovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9136-9140.
- Leppik, E. E. (1970). Gene centers of plants as sources of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **8**, 323-344.
- Leroux, J. P., Quiot, J. B., Lecoq, H. y Pitrat, M. (1979). Mise en évidence et répartition dans le sud-est de la France d'un pathotype particulier du Virus de la mosaïque du cocombre. *Ann Phytopathol* **11**, 431-438.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E. y Howe, G. A. (2004). The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of

- Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *Plant Cell* **16**, 126-143.
- Li, W. M. y Wong, S. M. (2006).** Analyses of subgenomic promoters of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* and demonstration of 5' untranslated region and 3'-terminal sequences functioning as subgenomic promoters. *J Virol* **80**, 3395-3405.
- Lico, C., Chen, Q. y Santi, L. (2008).** Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell Physiol* **216**, 366-377.
- Lin, M. K., Hu, C. C., Lin, N. S., Chang, B. Y. y Hsu, Y. H. (2006).** Movement of *Potexviruses* requires species-specific interactions among the cognate triple gene block proteins, as revealed by a *trans*-complementation assay based on the *Bamboo mosaic virus* satellite RNA-mediated expression system. *J Gen Virol* **87**, 1357-1367.
- Ling, K. S. (2007).** Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* **34**, 1-8.
- Ling, K. S. y Scott, J. W. (2007).** Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* in tomato accessions. *Plant Dis* **91**, 749-753.
- Ling, K. S. (2008).** *Pepino mosaic virus* on Tomato Seed: Virus Location and Mechanical Transmission. *Plant Dis* **92**, 1701-1705.
- Ling, K. S., Wintermantel, W. M. y Bledsoe, M. (2008).** Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Dis* **92**, 1683-1688.
- Longstaff, M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. y Baulcombe, D. (1993).** Extreme resistance to *Potato virus X* infection in plants expressing modified components of the putative viral replicase. *Embo J* **12**, 2230-2230.
- López, C., Soler, S. y Nuez, F. (2005).** Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: Size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Arch Virol* **150**, 619-627.
- López-Pérez, J.-A., Le Strange, M., Kaloshian, I. y Ploeg, A. T. (2006).** Differential response of *Mi* gene-resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Crop Protection* **25**, 382-388.
- Lough, T. J. y Lucas, W. J. (2006).** Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 203-232.
- Lough, T. J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K. R., Beck, D. L., Balmori, E., Forster, R. L. S. y Lucas, W. J. (1998).** Molecular dissection of the mechanism by which *Potexvirus* triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 801-814.
- Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S. J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D. L., Lucas, W. J. y Forster, R. L. S. (2000).** Cell-to-cell movement of *Potexviruses*: Evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat

- protein and first triple gene block protein. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 962-974.
- Lough, T. J., Emerson, S. J., Lucas, W. J. y Forster, R. L. S. (2001).** Trans-complementation of long-distance movement of *White clover mosaic virus* triple gene block (TGB) mutants: Phloem-associated movement of TGBp1. *Virology* **288**, 18-28.
- Lough, T. J. y Lucas, W. J. (2006).** Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 203-232.
- Lucas, W. J. (2006).** Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**, 169-184.
- Maia, I. G., Seron, K., Haenni, A. L. y Bernardi, F. (1996).** Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol* **32**, 367-391.
- Maisonneuve, B., Chovelon, V. y Lot, H. (1991).** Inherence of resistance to *Beet western yellows virus* in *Lactuca virosa* L. *Hortscience* **26**, 1543-1545.
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V. y Gleba, Y. (2004).** In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6852-6857.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klymyuk, V. y Gleba, Y. (2005).** Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology* **23**, 718-723.
- Maroon-Lango, C. J., Guaragna, M. A., Jordan, R. L., Hammond, J., Bandla, M. y Marquardt, S. K. (2005).** Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Arch Virol* **150**, 1187-1201.
- Maule, A. J. y Wang, D. (1996).** Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends Microbiol* **4**, 153-158.
- Maule, A. J., Caranta, C. y Boulton, M. I. (2007).** Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* **8**, 223-231.
- Maury, Y., Duby, C. y Khetarpal, R.K. (1998).** *Seed certification for viruses. Breeding for resistance to plant virus*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Michelmore, R. W. (2003).** The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol* **6**, 397-404.
- Miller, E. D., Kim, K. H. y Hemenway, C. (1999).** Restoration of a stem-loop structure required for *Potato virus X* RNA accumulation indicates selection for a mismatch and a GNRA tetraloop. *Virology* **260**, 342-353.
- 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.

- Mitra, R., Krishnamurthy, K., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R. S. y Verchot-Lubicz, J. (2003). The *Potato virus X* TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology* **312**, 35-48.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J. y Baulcombe, D. C. (2002). Interaction between domains of a plant *NBS-LRR* protein in disease resistance-related cell death. *Embo J* **21**, 4511-4519.
- Monci, F., Navas-Castillo, J., Cénis, J. L., Lacasa, A., Benazoun, A. y Moriones, E. (2000). Spread of *Tomato yellow leaf curl virus* Sar from the Mediterranean Basin: Presence in the Canary Islands and Morocco. *Plant Dis* **84**, 490-490.
- Moriones, E. y Luis-Arteaga, M. (1996). *Métodos de control de las virosis*: Sociedad española de fitopatología (Phytoma-España). Agropubli, S.L.
- Murphy, A. M. y Carr, J. P. (2002). Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol* **128**, 552-563.
- Musychuk, K., Stephenson, N., Bi, H., Farrance, C. E., Orozovic, G., Brodelius, M., Brodelius, P., Horsey, A., Ugulava, N., Shamloul, A. M., Mett, V., Rabindran, S., Streatfield, S. J. y Yusibov, V. (2007). A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza and Other Respiratory Viruses* **1**, 19-25.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. y Moriones, E. (2000). Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis* **84**, 835-837.
- Ndjiondjop, M. N., Brugidou, C., Zang, S., Fargette, D., Ghesquiere, A. y Fauquet, C. (2001). High resistance to *Rice yellow mottle virus* in two cultivated rice cultivars is correlated with failure of cell to cell movement. *Physiol. Mol. Plant P.* **59**, 309-316.
- 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.
- Ng, J. C. y Falk, B. W. (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 183-212.
- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P. y Hellmann, G. M. (1997). Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* **237**, 452-459.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomenech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., García-Más, J., Aranda, M. A. y Bendahmane, A. (2006). An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J* **48**, 452 - 462.
- Olsthoorn, R. C. L., Haasnoot, P. C. J. y Bol, J. F. (2004). Similarities and differences between the subgenomic and minus-strand promoters of an RNA plant virus. *J Virol* **78**, 4048-4053.

- Padgett, H. S. y Beachy, R. N. (1993). Analysis of a *Tobacco mosaic virus* strain capable of overcoming *N* gene-mediated resistance. *Plant Cell* **5**, 577-586.
- Pagán, I., Córdoba-Sellés, M. D., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C. y García-Arenal, F. (2006). Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathol.* **96**, 274-279.
- Palloix, A., Sage, A. M., Caranta, C., Ayme, V., Janzac, B., Lecoq, H., Moury, B. y Fabre, F. (2006). Breeding for virus resistance: while high level and large spectrum of protection are accessible, durability is in the process. In "Advances in sources, mechanisms and durability of resistance against plant viruses and vectors", ResistVir. Alicante (Spain).
- Palloix, A., Ayme, V. y Moury, B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol* en prensa.
- Palukaitis, P. y Carr, J. P. (2008). Plant resistance responses to viruses. *J Plant Pathol* **90**, 153-171.
- Parker, L., Kendall, A. y Stubbs, G. (2002). Surface features of *Potato virus X* from fiber diffraction. *Virology* **300**, 291-295.
- Parlevliet, J. E. (1977). Plant pathosystems – Attempt to elucidate horizontal resistance. *Euphytica* **26**, 553-556.
- Pelham, J. (1972). Strain-genotype interaction of *Tobacco mosaic virus* in tomato. *Ann Appl Biol* **71**, 219-228.
- Peralta, I. E., Knapp, S. K. y Spooner, D. M. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst Bot* **30**, 424-434.
- Perring, T. M., Gruenhagen, N. M. y Farrar, C. A. (1999). Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annual Review of Entomology* **44**, 457-481.
- Picó, B., Ferriol, M., Díez, M. y Nuez, F. (1999). Developing tomato breeding lines resistant to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Breed* **118**, 537-542.
- Picó, B., Herraiz, J., Ruíz, J. J. y Nuez, F. (2002). Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Sci Hortic* **94**, 73-89.
- Pillai-Nair, N., Kim, K. H. y Hemenway, C. (2003). *Cis*-acting regulatory elements in the *Potato virus X* 3' non-translated region differentially affect minus-strand and plus-strand RNA accumulation. *J Mol Biol* **326**, 701-720.
- Pink, D. A. C., Lot, H., y Johnson, R. (1992). Novel pathotypes of *Lettuce mosaic virus* - Breakdown of a durable resistance. *Euphytica* **63**, 169-174.
- Pitrat, M. y Lecoq, H. (1980). Inheritance of resistance to *Cucumber mosaic virus* transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*. *Phytopathology* **70**, 958-961.
- Plante, C. A., Kim, K. H., Pillai-Nair, N., Osman, T. A. M., Buck, K. W. y Hemenway, C. L. (2000). Soluble, template-dependent extracts from

- Nicotiana benthamiana* plants infected with *Potato virus X* transcribe both plus- and minus-strand RNA templates. *Virology* **275**, 444-451.
- Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Garger, S. J. y Fitzmaurice, W. P. (2002).** Making an ally from an enemy: Plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 45-74.
- Porta, C. y Lomonosoff, G. P. (2002).** Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol and Genet Eng* **19**, 245-291.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M. y Tepfer, M. (2008).** Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* **9**, 73-83.
- Prufer, D., Wipfscheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H. y Jonard, G. (1995).** Synthesis of full-length infectious cDNA clone of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* and its use in gene exchange experiments with extructural proteins from other *Luteoviruses*. *Virology* **214**, 150-158.
- Rabindran, S. y Dawson, W. O. (2001).** Assessment of Recombinants That Arise from the Use of a TMV-Based Transient Expression Vector. *Virology* **284**, 182-189.
- Ranjith-Kumar, C. T., Zhang, X. y Kao, C. C. (2003).** Enhancer-Like Activity of a *Brome Mosaic Virus* RNA Promoter. *J Virol* **77**, 1830-1839.
- Rathjen, J. P. y Moffett, P. (2003).** Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol* **6**, 300-306.
- Rick, C. y Chetelat, R. (1995).** Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae* **412**, 21-38.
- Risser, G., Pitrat, M. y Rode, J. C. (1977).** Etude de la résistance du melon au virus de la mosaïque du concombre. *Ann Amelior Plant* **27**, 509-522.
- Roselló, S., Díez, M. J. y Nuez, F. (1996).** Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop .1. The *Tomato spotted wilt virus* - A review. *Sci Hortic* **67**, 117-150.
- Roselló, S., Soler, S., Díez, M. J., Rambla, J. L., Richarte, C. y Nuez, F. (1999).** New sources for high resistance of tomato to the *Tomato spotted wilt virus* from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Breed* **118**, 425-429.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. y Williamson, V. W. (1998).** The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9750-9754.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V. y Gorbalenya, A. E. (1992).** Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **73**, 2129-2134.
- Russell, G. E. (1960).** Breeding for resistance to *Sugar beet yellows virus*. *BrSugar Beet Review* **28**, 163-170.
- Ryu, K. H., Kim, C.-H. y Palukaitis, P. (1998).** The Coat Protein of *Cucumber Mosaic Virus* Is a Host Range Determinant for Infection of Maize. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 351-357.

- Sainsbury, F., Lavoie, P. O., D'Aoust, M. A., Vézina, L. P. y Lomonosoff, G. P. (2008). Expression of multiple proteins using full-length and deleted versions of *Cowpea mosaic virus* RNA-2. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 82-92.
- Salomone, A. y Roggero, P. (2002). Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *J Plant Pathol* **84**, 65-68.
- Samuels, T. D., Ju, H. J., Ye, C. M., Motes, C. M., Blancaflor, E. B. y Verchot-Lubicz, J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the *Potato virus X* TGB proteins. *Virology* **367**, 375-389.
- Sánchez-Fernández, A., Vila-Cambra, G., Gilardi-Navarro, P., Pagán, I., García Luque, I., Díaz-Ruiz, J. R. y Serra-Yoldi, M. T. (2006). Caracterización biológica y molecular de un aislado de tomate del Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) que infecta plantas de *Nicotiana tabacum*. In *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Murcia.
- Satoh, S., Yoshikawa, N. y Tacahashi, Y. (1999). Construction and biolistic inoculation of an infectious cDNA clone of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus*. *Annual Phytopathology Society of Japan* **65**, 301-304.
- Schaad, M. C. y Carrington, J. C. (1996). Suppression of long-distance movement of *Tobacco etch virus* in a non susceptible host. *J Virol* **70**, 2556-2561.
- Scholthof, H. B., Scholthof, K. B. y Jackson, A. O. (1996). Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 299-323.
- Scholthof, K. B., Mirkov, T. E. y Scholthof, H. B. (2002). Plant virus gene vectors: Biotechnology applications in agriculture and medicine. *Genetic engineering* **24**, 67-85.
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L. y Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* **138**, 1842-1852.
- Shivprasad, S., Pogue, G. P., Lewandowski, D. J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K. y Dawson, W. O. (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in *Tobacco mosaic virus*-based vectors. *Virology* **255**, 312-323.
- Shyu, A. B., Wilkinson, M. F. y van Hoof, A. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *Embo J* **27**, 471-481.
- Sit, T. L., Leclerc, D. y Abouhaidar, M. G. (1994). The minimal 5' sequence for in vitro initiation of *Papaya mosaic potexvirus* assembly. *Virology* **199**, 238-242.
- Sit, T. L., Vaewhongs, A. A. y Lommel, S. A. (1998). RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**, 829-832.
- Skryabin, K. G., Morozov, S., Kraev, A. S., Rozanov, M. N., Chernov, B., K., L., L. I. y Atabekov, J. G. (1988). Conserved and variable elements in

- RNA genomes of *Potexviruses*. *Federation of Biochemical Societies Lett.* **240**, 33-40.
- Smirnyagina, E. V., Morozov, S. Y., Rodionova, N. P., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Fedorkin, O. N. y Atabekov, J. G. (1991).** Translational efficiency and competitive ability of mRNAs with 5'-untranslated $\alpha\beta$ -leader of *Potato virus X* RNA. *Biochimie* **73**, 587-598.
- Smith, C. M., (ed) (1989).** *Plant Resistance to Insects: a Fundamental Approach*. New York.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., Prohens, J. y Nuez, F. (2000a).** El *Pepino mosaic virus* (PepMV), una nueva amenaza para el cultivo del tomate. II. *Vida Rural* **119**, 48-52.
- Soler, S., Picó, B., Sifres, A., Díez, M. J., De Frutos, R. y Nuez, F. (2000b).** Multiple virus resistance in a collection of *Lycopersicon* spp. In *Proceedings of the Fifth Congress of the European Foundation for Plant Pathology*, p. 17. Taormina, Italy: European Foundation for Plant Pathology
- Soler, S. y Nuez, F. (2000).** Identificación de fuentes de resistencia en tomate al Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV). In *X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, p. 199. Valencia.
- Soler, S., Prohens, J., Díez, M. J. y Nuez, F. (2002).** Natural Occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* Species in Central and Southern Peru. *J Phytopathol* **150**, 49-53.
- Soler-Aleixandre, S., López, C., Cebolla-Cornejo, J., Nuez, F. (2007).** Sources of resistance to *Pepino mosaic virus* (PepMV) in tomato. *Hortscience* **42**, 40-45.
- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R. y Jones, D. R. (2006).** Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathol* **55**, 595-606.
- Sriskanda, V. S., Pruss, G., Ge, X. y Vance, V. B. (1996).** An eight-nucleotide sequence in the *Potato virus X* 3' untranslated region is required for both host protein binding and viral multiplication. *J. Virol.* **70**, 5266-5271.
- Stacesmith, R. y Hamilton, R. I. (1988).** Inoculum thresholds of seedborne pathogens- viruses. *Phytopathology* **78**, 875-880.
- Stamova, B. S. y Chetelat, R. T. (2000).** Inheritance and genetic mapping of *Cucumber mosaic virus* resistance introgressed from *Lycopersicon chilense* into tomato. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 527-537.
- Sullivan, M. L. y Green, P. J. (1993).** Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants - The roles of messenger - RNA stability and translation. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1091-1104.
- Sun, X. y Simon, A. E. (2006).** A *cis*-replication element functions in both orientations to enhance replication of *Turnip crinkle virus*. *Virology* **352**, 39-51.

- Takken, F. L. W., Albrecht, M. y Tameling, W. I. L. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 383-390.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* **25**, 4876-4882.
- 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*. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 109-114.
- Tomashevskaya, O. L., Solovyev, A. G., Karpova, O. V., Fedorkin, O. N., Rodionova, N. P., Morozov, S. Y. y Atabekov, J. G. (1993). Effects of sequence elements in the *Potato virus X* RNA 5' non-translated $\alpha\beta$ -leader on its translation enhancing activity. *J. Gen. Virol.* **74**, 2717-2724.
- Torrance, L., Cowan, G. H., Gillespie, T., Ziegler, A. y Lacomme, C. (2006). *Barley stripe mosaic virus*-encoded proteins triple-gene block 2 and gamma b localize to chloroplasts in virus-infected monocot and dicot plants, revealing hitherto-unknown roles in virus replication. *J. Gen. Virol* **87**, 2403-2411.
- Toth, R. L., Pogue, G. P. y Chapman, S. (2002). Improvement of the movement and host range properties of a plant virus vector through DNA shuffling. *Plant J.* **30**, 593-600.
- Tozzini, A. C., Ek, B., Palva, E. T. y Hopp, H. E. (1994). *Potato virus X* coat protein - a glycoprotein. *Virology* **202**, 651-658.
- Traw, M. B., Kim, J., Enright, S., Cipollini, D. F. y Bergelson, J. (2003). Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology* **12**, 1125-1135.
- Tremblay, M. H., Majeau, N., Gagne, M. E. L., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J. B., Bolduc, M., Chouinard, N., Pare, C., Gagne, S. y Leclerc, D. (2006). Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of *Papaya mosaic potexvirus* coat protein. *Febs J* **273**, 14-25.
- Truniger, N., Nieto, C., González-Ibeas, D. y Aranda, A. (2008). Mechanism of plant *eIF4E*-mediated resistance against a *Carmovirus* (Tombusviridae) cap-independent translation of a viral RNA controlled *in cis* by an (a) virulence determinant. *Plant J.* **56**, 716-727.
- Van Der Kuyl, A. C., Langereis, K., Hoving, C. J., Jaspars, E. M. I. y Bol, J. F. (1990). *cis*-Acting elements involved in replication of *Alfalfa mosaic virus* RNAs in vitro. *Virology* **176**, 346-354.
- van der Vlugt, R. A. A., Stijger, C. C. M. M., Verhoeven, J. T. J. y Lesemann, D. E. (2000). First Report of *Pepino Mosaic Virus* on Tomato. *Plant Dis.* **84**, 103-103.
- Vance, V. y Vaucheret, H. (2001). RNA Silencing in Plants-Defense and Counterdefense. *Science* **292**, 2277-2280.

- Verchot, J., Angell, S. M. y Baulcombe, D. C. (1998). In Vivo translation of the triple gene block of *Potato Virus X* requires two subgenomic mRNAs. *J. Virol.* **72**, 8316-8320.
- Verchot-Lubicz, J. (2005). A new cell-to-cell transport model for *Potexviruses*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 283-290.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M. y Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of *Potexviruses*: recent advances. *J Gen Virol* **88**, 1643-1655.
- Vlugt, R. A. A. v. d., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I. C. M. M., Lesemann, D. E., Verhoeven, J. T. J. y Roenhorst, J. W. (2002). Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. OEPP/EPPO Bulletin, 32(3), 503-508
- Voinnet, O., Lederer, C. y Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. y Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14147-14152.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. y Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wang, D. y Maule, A. J. (1994). A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analyses of pea embryo Invasion by *Pea Seed-Borne Mosaic Virus*. *Plant Cell* **6**, 777-787.
- Wang, J., Carpenter, C. D. y Simon, A. E. (1999). Minimal sequence and structural requirements of a subgenomic RNA promoter for *Turnip Crinkle Virus*. *Virology* **253**, 327-336.
- Wang, M.-B. y Metzlaff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* **8**, 216-222.
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B. y Finnegan, E. J. (2001). Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci* **6**, 297-301.
- Waterworth, H. E., Hadidi, A., Khetarpal, R. K. y Koganezawa, H. (1998). Economic losses due to plant virus. In *Plant virus disease control*, pp. 1-13. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Watts, L. E. (1975). The reponse of various breeding lines of lettuce to *Beet western yellow virus*. *Ann Appl Biol* **81**, 393-397.
- Weiland, J. J. y Edwards, M. C. (1996). A single nucleotide substitution in the alpha a gene confers oat pathogenicity to *Barley stripe mosaic virus* strain ND18. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 62-67.
- Weston, J. H. y Turner, R. L. (1998). Analysis of Coat Protein Expression Cassettes in Protoplasts. In *Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance*, pp. 301-305. Edited by G. D. Foster y S. C. Taylor. Totowa, NJ: Humana Press.

- White, K. A., Bancroft, J. B. y Mackie, G. A. (1992). Mutagenesis of a hexanucleotide sequence conserved in *Potexvirus* RNAs. *Virology* **189**, 817-820.
- Whitham, S. A. y Wang, Y. (2004). Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr. Opin. Plant Biol* **7**, 365-371.
- Whitham, S. A., Yamamoto, M. L. y Carrington, J. C. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 772-777.
- Wong, S. M., Thio, S. S. C., Shintaku, M. H. y Palukaitis, P. (1999). The rate of cell-to-cell movement in squash of *Cucumber mosaic virus* is affected by sequences of the capsid protein. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 628-632.
- Yamshchikov, V., Mishin, V. y Cominelli, F. (2001). A new strategy in design of (+) RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology* **281**, 272-280.
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D. C. y Verchot, J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 599-605.
- Young, N. D., Zamir, D., Ganai, M. W. y Tanksley, S. D. (1988). Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2-alfa* gene in tomato. *Genetics* **120**, 579-585.
- Zacay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Kedar, N., Rabinowitch, H. D., Czosnek, H. y Zamir, D. (1991). Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Dis* **75**, 279-281.
- Zaitlin, M. y Palukaitis, P. (2000). Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 117-143.
- Zamir, D., Eksteinmichelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T., Vanoss, H., Kedar, N., Rabinowitch, H. D., Czosnek, H. y Nr (1994). Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theor Appl Genet* **88**, 141-146.
- Zayakina, O., Arkhipenko, M., Kozlovsky, S., Nikitin, N., Smirnov, A., Susi, P., Rodionova, N., Karpova, O. y Atabekov, J. (2008). Mutagenic analysis of *Potato virus X* movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol Plant Pathol* **9**, 37-44.
- Zhao, Y., Hammond, J., Tousignant, M. E. y Hammond, R. W. (2000). Development and evaluation of a complementation-dependent gene delivery system based on *Cucumber mosaic virus*. *Arch Virol* **145**, 2285-2295.
- Zheng, Y. y Edwards, M. C. (1990). Expression of resistance to *Barley stripe mosaic-virus* in barley and oat protoplasts. *J Gen Virol* **71**, 1865-1868.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**, 48-52.

ANEXOS

Anexo 1: Código de entrada, denominación taxonómica, banco de germoplasma y lugar de origen de las entradas analizadas en el escrutinio de germoplasma

Código	Especie	Banco de germoplasma	Origen
CHE-1	<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC	Crater, Santa Cruz, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-2	<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC	Essex, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-3	<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC	N. end of Baltra island, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-4	<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC	Fernandina, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-5	<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC	San Cristóbal, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-6	<i>S. cheesmaniae</i>	USDA	Fernandina, Islas Galápagos, Ecuador
CHE-7	<i>S. cheesmaniae</i>	EELM-CSIC	Isabela, Islas Galápagos, Ecuador
CHI-1	<i>S. chilense</i>	TGRC	Tacna, Perú
CHI-2	<i>S. chilense</i>	TGRC	Taltal, Chile
CHI-3	<i>S. chilense</i>	TGRC	Llauta, Ayacucho, Peru
CHI-4	<i>S. chilense</i>	TGRC	Minas de Acari, Arequipa, Perú.
CHI-5	<i>S. chilense</i>	TGRC	Rio Osmore, Moquegua, Peru
CHI-6	<i>S. chilense</i>	TGRC	Rio Caplina, Tacna, Peru
CHI-7	<i>S. chilense</i>	TGRC	Mina La Despreciada, Antofagasta, Chile
CHI-8	<i>S. chilense</i>	TGRC	2 km N.de Mamina, Tarapaca, Chile
CHI-9	<i>S. chilense</i>	TGRC	Quebr. Mamina-Parca, Tarapaca, Chile
CHI-10	<i>S. chilense</i>	TGRC	Quebrada Huatacondo, Antofagasta, Chile
CHI-11	<i>S. chilense</i>	TGRC	Huatacondo 2400 m, Tarapaca, Chile
CHI-12	<i>S. chilense</i>	TGRC	Estique Pampa, Tacna, Peru
CHI-13	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Quebrada Calapampa, Arequipa, Perú
CHI-14	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Quebrada Salsepuedes Rio Chaparra, Arequipa, Peru
CHI-15	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Pampa de la Clemesi, Arequipa, Peru
CHI-16	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Huaico Moquegua, Moquegua, Peru
CHI-17	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Cause seco, Tacna, Perú.
CHI-18	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Palquilla, Tacna, Perú.
CHI-19	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Rio Sama, Tacna, Perú
CHI-20	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Chitita, Tarapacá, Chile
CHI-21	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Alta Azapa, Tarapaca, Chile
CHI-22	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Soledad, Antofagasta, Chile
CHI-23	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Mina La Despreciada, Antofagasta, Chile
CHI-24	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Codpa, Tarapaca, Chile
CHI-25	<i>S. chilense</i>	EELM-CSIC	Quebrada Seca, sobre Lluta, Tarapaca, Chile
CHM-1	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Tambo, Ayacucho, Perú
CHM-2	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Hacienda Pajonal, Ayacucho, Peru
CHM-3	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Abancay, Apurimac Provincia, Peru
CHM-4	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Perú
CHM-5	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Soracata, Apurimac, Peru
CHM-6	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Huayapacha-2, Cusco, Peru

CHM-7	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Chihuanpampa, Cusco, Peru
CHM-8	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Cuzco, Perú
CHM-9	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Cuzco, Perú
CHM-10	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Cuzco, Perú
CHM-11	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-12	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-13	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-14	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-15	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-16	<i>S. chmielewskii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
CHM-17	<i>S. Chmielewskii</i>	EELM-CSIC	Casinchihua, Apurimac, Peru
CHM-18	<i>S. Chmielewskii</i>	EELM-CSIC	Perú
COM-1	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	Recolectada a 12km oeste de Canta, Peru
COM-2	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	Lima, Peru
COM-3	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	Lima, Peru
COM-4	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	Surco, Lima, Peru
COM-5	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	Valle Rimac, Km 93, Lima, Peru
COM-6	<i>S. corneliomuelleri</i>	TGRC	3 km sobre Yaso, Lima, Peru
COM-7	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	Matucana, Peru. Elevación: 2225 metros
COM-8	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	Desde Valle Rio Canta ebtre Yangos y Canta, Peru. Elevación: 2682 metros
COM-9	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	From east of Moquegua, Peru
COM-10	<i>S. corneliomuelleri</i>	EELM-CSIC	Río Canta, Perú
COM-11	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	Recolectada 9km west of Canta, Peru
COM-12	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	Lima, Peru
COM-13	<i>S. corneliomuelleri</i>	USDA	Recolectada desde Capillucas, 26 km. Noreste de Catalmasi, Lima Provincia. Elevación: 1700 metros
GA-1	<i>S. galapagense</i>	EELM-CSIC	Fernandina, Islas Galápagos, Ecuador
GA-2	<i>S. galapagense</i>	EELM-CSIC	Isabela, Islas Galápagos, Ecuador
GA-3	<i>S. galapagense</i>	TGRC	Santiago, Islas Galápagos, Ecuador
GA-4	<i>S. galapagense</i>	TGRC	Isabela, Islas Galápagos, Ecuador
GA-5	<i>S. galapagense</i>	TGRC	California, EEUU
GA-6	<i>S. galapagense</i>	USDA	Santiago, Islas Galápagos, Ecuador
GA-7	<i>S. galapagense</i>	EELM-CSIC	S. Bartolome, Islas Galápagos
HAB-1	<i>S. habrochaites</i>	USDA	Contumaza, Cajamarca, Peru
HAB-2	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	From Pariacoto, Ancash Provincia, Peru
HAB-3	<i>S. habrochaites</i>	USDA	Matucana, Lima, Peru
HAB-4	<i>S. habrochaites</i>	USDA	Huancabamba, Piura, Perú
HAB-5	<i>S. habrochaites</i>	USDA	Río San Juan, Huancavelica, Perú
HAB-6	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Casma, 97 km from Panam., Ancash, Peru
HAB-7	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Balsapata, Amazonas, Perú
HAB-8	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Llauta/R. Palpa, Ayacucho, Peru
HAB-9	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	San Francisco, Amazonas, Perú.
HAB-10	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Alta Fortaleza, Ancash, Perú
HAB-11	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Canta-Yangas, Lima, Perú
HAB-12	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Alta Fortaleza, Ancash, Peru

HAB-13	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Casma, 97 km desde Panam., Ancash, Peru
HAB-14	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Cajamarca, Cajamarca, Peru
HAB-15	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Cajamarca, Peru
HAB-16	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-17	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-18	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-19	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-20	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-21	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-22	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-23	<i>S. habrochaites</i>	USDA	From Rope, Cajamarca Provincia, Perú
HAB-24	<i>S. habrochaites</i>	USDA	El Salvador
HAB-25	<i>S. habrochaites</i>	USDA	Ayabaca Provincia, Piura Dept, Peru. Elevación: 800 metros
HAB-26	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Rio Canta, Peru. Elevación: 2072 metros
HAB-27	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Cajamarca. Peru. Elevación: 380 metros
HAB-28	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	Cajamarca, Peru.
HAB-29	<i>S. habrochaites</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
HAB-30	<i>S. habrochaites</i>	TGRC	Recolectada en El Mirador, Guayaquil, Ecuador.
HABG-1	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	TGRC	De Rio Chimbo, Chimborazo Provincia, Ecuador.
HABG-2	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Alausi, Chimborazo, Ecuador
HABG-3	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	TGRC	S. Jipijapa, Manabi, Ecuador
HABG-4	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	TGRC	Yagana#1, Loja, Ecuador
HABG-5	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	TGRC	Yagana#1, Loja, Ecuador
HABG-6	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	TGRC	Chanchan, , Chimborazo, Ecuador
HABG-7	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Banos, Ecuador
HABG-8	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Hacienda Tambo Grande, Km. 38, Ferrocarril a la Costa, Guayaquil, Ecuador
HABG-9	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	EELM-CSIC	De la Hacienda Tambo Grande, Km. 38, Ferrocarril a la Costa, Guayaquil, Peru.
HABG-10	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	EELM-CSIC	De la Hacienda Tambo Grande, Km. 38, Ferrocarril a la Costa, Guayaquil. From: Ecuador
HABG-11	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Rio Chillon, below Canta, Perú
HABG-12	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Loja, 2 to 3 km south near Botanical Garden of the University. From Ecuador. Elevación: 2200 metros
HABG-13	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Rio Chimbo, Chimborazo Provincia, Ecuador.
HABG-14	<i>S. habrochaites f. glabratum</i>	USDA	Guayaquil, Ecuador. Latitude: 01 deg. 30 min. South (-1.500), Longitude:

080 deg. 31 min.			
GER-1	<i>S. lycopersicon var. cerasiforme</i>	TGRC	Villa Hermosa, Cauca, Colombia
GER-2	<i>S. lycopersicon var. cerasiforme</i>	EELM-CSIC	Tawan, Sabah, Borneo
NEO-1	<i>S. neorickii</i>		Limatambo, Cuzco, Perú
NEO-2	<i>S. neorickii</i>	TGRC	La Toma, Loja, Ecuador
NEO-3	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Amazonas, Peru
NEO-4	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Chachapoyas Oeste, Amazonas, Perú
NEO-5	<i>S. neorickii</i>		Chirico, Amazonas, Perú
NEO-6	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Ona, Azuay, Ecuador
NEO-7	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Oeste de Pedro Ruiz, Amazonas, Peru
NEO-8	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Saraguro-Cuenca, Azuay, Ecuador
NEO-9	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Wandobama (entre Ambo & San Rafael), Peru
NEO-10	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Apurimac, Peru
NEO-11	<i>S. neorickii</i>	TGRC	Gonozabal, Loja, Ecuador
NEO-12	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Curahuasi, , Apurimac, Perú
NEO-13	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Rio Pachachaca, Apurimac, Perú
NEO-14	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Huanuco, Huanuco, Peru
NEO-15	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Ona, Azuay, Ecuador
NEO-16	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Choipiaco, Amazonas, Perú
NEO-17	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	Chavinillo, Huanuco, Peru
NEO-18	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
NEO-19	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
NEO-20	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
NEO-21	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
NEO-22	<i>S. neorickii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PEN-1	<i>S. pennellii</i>	TGRC	Perú
PEN-2	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Pisaquera, Lima, Peru
PEN-3	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Moro, Lima, Peru
PEN-4	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	El Horador, Piura, Peru
PEN-5	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Agua Perdida (Rio Ingenia), Ica, Peru
PEN-6	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Rio Atico, Arequipa, Peru
PEN-7	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Bayovar, Piura, Peru
PEN-8	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PEN-9	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PEN-10	<i>S. pennellii</i>	EELM-CSIC	Perú
PER-1	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-2	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-3	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-4	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-5	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-6	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-7	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-8	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Chilca, Lima, Perú
PER-9	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Supe, Lima, Perú
PER-10	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Pampano, Huancavelica, Peru

PER-11	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Atiquipa, Arequipa, Peru
PER-12	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Perú
PER-13	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Perú
PER-14	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Tinguiyog (Rio Santa Cruz), Ica, Peru
PER-15	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Rio Atico, a 61 km de Panam, Arequipa, Peru
PER-16	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Quinistaquillas, Moquegua, Peru
PER-17	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Coayllo, Canete, Lima Peru
PER-18	<i>S. peruvianum</i>	TGRC	Mexico City, Mexico
PER-19	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-20	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-21	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-22	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-23	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-24	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-25	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-26	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-27	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-28	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-29	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-30	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-31	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-32	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Chancay
PER-33	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Sacabandia. Elevación: 2438 metros, Peru
PER-34	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Lima, Peru
PER-35	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Azapa Valley, Chile
PER-36	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Tambo, Peru.
PER-37	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Culebras, Peru
PER-38	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Chala, Peru
PER-39	<i>S. peruvianum</i>	USDA	South America
PER-40	<i>S. peruvianum</i>	USDA	La Libertad, Peru
PER-41	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Junin, Peru
PER-42	<i>S. peruvianum</i>	USDA	Peru
PER-43	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	Valle Rio Canta entre Yangos y Canta, Peru. Elevación: 2682 metros
PER-44	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	Manabi, Ecuador
PER-45	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	Rio Supe, Peru
PER-46	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	Arequipa, Peru
PER-47	<i>S. peruvianum</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PER-48	<i>S. peruvianun</i>	TGRC	Hacienda San Isidro, Lima , Perú
PER-49	<i>S. peruvianun</i>	TGRC	Atiquipa, Arequipa, Peru
PER-50	<i>S. peruvianun</i>	TGRC	Sisacaya, Lima, Peru
PER-51	<i>S. peruvianun</i>	TGRC	Otuzco, La Libertad, Perú
PER-52	<i>S. peruvianun</i>	TGRC	Cajamarca, Perú
PIM-1	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-2	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-3	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-4	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC

PIM-5	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-6	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Culebras, Ancash, Peru
PIM-7	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	El Empalme, Guayas, Ecuador
PIM-8	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	Las Delicias, Pichincha, Ecuador
PIM-9	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	Sta. Tome, Piura, Peru
PIM-10	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Mancha Alta, Lima, Peru
PIM-11	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	Lambayeque, Perú
PIM-12	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	Lima, Perú
PIM-13	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Pariacoto, Ancash, Perú
PIM-14	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Balsa-huaico, Cajamarca, Peru
PIM-15	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Moxeque (Casma) Ancash, Peru
PIM-16	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Lomas de Latillo, Lima, Peru
PIM-17	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	Villamil, Galapagos, Ecuador
PIM-18	<i>S. pimpinellifolium</i>	TGRC	Los Mochis, Sinaloa, Mexico
PIM-19	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-20	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-21	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-22	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-23	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-24	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-25	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-26	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-27	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-28	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-29	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-30	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-31	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-32	<i>S. pimpinellifolium</i>	EELM-CSIC	EELM-CSIC
PIM-33	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Purillo, Columbia
PIM-34	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Venezuela
PIM-35	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	San Cristobal, Chiapas, Mexico
PIM-36	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Jalapa, Guatemala
PIM-37	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	India
PIM-38	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Honduras
PIM-39	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Argentina
PIM-40	<i>S. pimpinellifolium</i>	USDA	Los Diamantes, Costa Rica

Construcción de DNA	Nombre del virus o mutante	Esquema
pT7PepXL6	PepXL6	
pBPepXL6		
pT7PepXL6agg	PepXL6agg	
pBPepXL6agg		
pT7PepGFPΔCP1	PepGFPΔCP1	
pBPepGFPΔCP1		
pBPepGFPΔCP2	PepGFPΔCP2	
pBPepGFPΔCP3	PepGFPΔCP3	
pBPepGFPΔCP4	PepGFPΔCP4	

Construcción de DNA	Nombre del virus o mutante	Esquema
pBPepGFPΔCPCh2	PepGFPΔCPCh2	
pBPep501	Pep501	
pBPep5.128	Pep5.128	