



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Virus del moteado de la parietaria (PMoV):
mecanismos de interacción del virus con la planta y
caracterización de aislados virales**

Memoria presentada por

Carolina Martínez Moncayo

para optar al grado de doctor en Biología Vegetal y Biotecnología.

Directores:

Dr. Luis Galipienso Torregrosa

Dr. Frederic Aparicio Herrero.

Tutora:

Dr. Charlotte Poschenrieder Wiens

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

**Dpto. Biología Animal Biología Vegetal y Biotecnología
Programa de Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal
Noviembre 2015**

Los Directores de la tesis

Dr. Luis Galipienso Torregrosa, Doctor en Ciencias Biológicas e investigador del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Moncada (Valencia)

Y

Dr. Frederic Aparicio Herrero, Doctor en Ciencias Biológicas e investigador del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Virus del moteado de la parietaria (PMoV): mecanismos de interacción del virus con la planta y caracterización de aislados virales”, ha sido realizada por Carolina Martínez Moncayo bajo nuestra dirección y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Biología Vegetal y Biotecnología.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Valencia, 24 de noviembre del 2015

Dr. Luis Galipienso Torregrosa

Dr. Frederic Aparicio Herrero

Esta Tesis se realizó con la financiación de la Agència de Gestió d' Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), mediante una beca para formación de personal investigador novel otorgada a Carolina Martínez Moncayo en el Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Cabrils (Barcelona). Parte de esta tesis se ha desarrollado en los laboratorios de Virología del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia y del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Moncada (Valencia).

A Gabriela y Carlos Andrés

*A mis padres Luz Marina y Paco
A mi hermano Carlos Enrique*

Indice

LISTA DE ABREVIATURAS DE VIRUS.....	15
OTRAS ABREVIATURAS	21
RESUMEN.....	25
RESUM	31
ABSTRACT.....	37
INTRODUCCIÓN	43
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	45
2. FAMILIA <i>BROMOVIRIDAE</i>	46
2.1. Género <i>Ilarvirus</i>	48
2.2. Proteínas de replicación	51
2.3. Proteínas de Movimiento	51
2.4. Proteína de cubierta	53
2.5. Proceso de activación genómica.....	54
3. REPLICACIÓN VIRAL.....	55
4. MOVIMIENTO DE VIRUS.....	56
4.1. Movimiento viral célula a célula.....	57
4.2. Movimiento viral sistémico	58
5. INTERACCIÓN DEL VIRUS CON EL HOSPEDADOR E INDUCCIÓN DE PROCESOS PATOLÓGICOS.....	59
5.1. Silenciamiento génico	59
5.2. Resistencia sistémica adquirida	61
5.3. Determinantes de patogenicidad en virus	62
6. EVOLUCIÓN VIRAL.....	64
7. MÉTODOS DE CONTROL	65
8. VIRUS OBJETO DE ESTE ESTUDIO: VIRUS DEL MOTEADO DE LA PARIETARIA (PMoV).....	67
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	71
CAPÍTULO 1	75
<i>Variabilidad genética y evolución del virus del moteado de la parietaria: selección natural e intercambio genético entre aislados.....</i>	<i>77</i>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	79
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	80
1.2.1. Aislados virales	80
1.2.2. Extracción de RNAs virales, amplificación por RT-PCR y obtención de secuencias nucleotídicas	81
1.2.3. Análisis de secuencias genéticas	83
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO 2	91
<i>Caracterización biológica y molecular del aislado italiano T-32 del virus del moteado de la parietaria obtenido a partir de plantas de tomate</i>	<i>93</i>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	95
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	96
2.2.1. Ensayos de infectividad en diferentes plantas hospedadoras.....	96
2.2.2. Obtención de la secuencia nucleotídica del genoma completo del aislado T32 de PMoV	98
2.2.3. Análisis de secuencias	100
2.3. RESULTADOS.....	101
2.3.1. Ensayos de infectividad y rango de plantas hospedadoras	101
2.3.2. Obtención de la secuencia nucleotídica completa del genoma del aislado T32 de PMoV	104
2.4. DISCUSIÓN.....	115
CAPÍTULO 3	123
<i>Identificación de dos regiones hidrofílicas en la proteína 3a del virus del moteado de la parietaria con capacidad de Unión al RNA y que intervienen en el transporte del virus entre células a corta distancia (movimiento célula a célula.....</i>	<i>125</i>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	127
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	128

3.2.1. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína de movimiento de PMoV	128
3.2.2. Elaboración de las construcciones derivadas del plásmido quimérico de AMV.....	128
3.2.3. Obtención de transcritos de las construcciones quiméricas de AMV e inoculación de plantas de <i>N. tabacum</i> P12	131
3.2.4. Expresión y purificación de la proteína de movimiento del PMoV y sus mutantes correspondientes en <i>E. Coli</i>	132
3.2.5. Ensayos de movilidad electroforética de complejos ribonucleoprotéicos.....	133
3.2.6. Clonación de la MP del PMoV en el vector binario pMOG y expresión transitoria mediante agroinfiltración.....	134
3.2.7. Inoculación de protoplastos de P12 y análisis tipo <i>Northern blot</i>	135
3.3. RESULTADOS.....	136
3.3.1. Estudio de la actividad de unión a RNA de la proteína de movimiento de PMoV	136
3.3.2. Estudio del papel jugado por la proteína de movimiento del PMoV en el movimiento del virus empleando una construcción quimérica de AMV	140
3.3.3. Localización subcelular de la proteína de movimiento de PMoV.....	143
3.4. DISCUSIÓN.....	146
CAPÍTULO 4	151
<i>Implicación de la proteína de movimiento (MP), cubierta (CP) y 2b del virus del moteado de la parietaria en la inducción de síntomas y en la supresión del silenciamiento génico</i>	<i>153</i>
4.1. INTRODUCCIÓN.....	155
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	157
4.2.1. Amplificación y clonaje de los genes de la CP, MP y 2b en el vector pGR107	157
4.2.2. Clonaje de los genes de la CP, MP Y 2b de PMoV en el vector binario pMOG.....	159
4.2.3. Agroinfiltración de las construcciones en plantas de <i>N. benthamiana</i>	160
4.2.4. Inoculación de plantas con transcritos de RNA	160
4.2.5. Extracción y análisis de RNA.....	161
4.2.6. Análisis ELISA	162
4.2.7. Condiciones de crecimiento de las plantas	163
4.3. RESULTADOS.....	163
4.3.1. Implicación de la CP, 2b y la MP del PMoV en la inducción de síntomas en plantas de <i>N. benthamiana</i>	163
4.3.2. Estudio de supresión de silenciamiento génico de las proteínas CP, 2b y MP de PMoV	167
4.4. DISCUSIÓN.....	172
DISCUSIÓN GENERAL.....	175
CONCLUSIONES.....	187
BIBLIOGRAFÍA	193
AGRADECIMIENTOS	215

Lista de abreviaturas de virus

ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano)
AMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (virus del mosaico de la alfalfa,)
APLPV	<i>American plum line pattern virus</i> (Virus de los arabescos del ciruelo)
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i> (virus del mosaico de la manzana)
AV2	<i>Asparagus virus 2</i> (virus 2 del esparrago)
BCRV	<i>Blackberry chlorotic ringspot virus</i> (Virus de la mancha clorótica anular de la zarzamora)
BIShV	<i>Blueberry shock virus</i> (Virus del shock del arándano)
BMV	<i>Brome mosaic virus</i> (virus del mosaico de Bromo)
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i> (virus occidental amarillo de la remolacha)
BYV	<i>Beet yellows virus</i> (virus del amarillamiento de la remolacha)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (virus del mosaico de la coliflor)
CCMV	<i>Cowpea cholotic mosaic virus</i> (virus del mosaico clorótico de la habichuela)
CLRv	<i>Citrus leaf rugose virus</i> (virus del arrugamiento de la hoja de los cítricos)
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> (virus del mosaico del pepino)
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i> (virus de la tristeza de los cítricos)
CVV	<i>Citrus variegation virus</i> (virus del variegado de los cítricos) del geranio)
EMoV	<i>Elm mottle virus</i> (virus del moteado del olmo)
FCILV	<i>Fragaria chiloensis latent virus</i> (virus latente de la <i>Fragaria chiloensis</i>)
HJLV	<i>Humulus japonicus latent virus</i> (virus latente de <i>Humulus japonicus</i>)
LLCV	<i>Lilac leaf chlorosis virus</i> (virus de las hojas cloróticas de la lila)

LRMV	<i>Lilac ring mottle virus</i> (virus de la mancha anular de la lila)
PDV	<i>Prune dwarf virus</i> (virus del enanismo del ciruelo)
PepMV	<i>Pepino mosaic virus</i> (virus del mosaico del pepino dulce)
PMoV	<i>Parietaria mottle virus</i> (virus del moteado de la parietaria)
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (virus de los anillos necróticos de los prunus)
PoLV	<i>Pothos latent virus</i> (virus latente del potos)
PVX	<i>Potato virus X</i> , (virus X de la patata)
RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (virus del mosaico necrótico del trébol rojo)
SNSV	<i>Strawberry necrotic shock virus</i> (Virus shock necrótico de la fresa)
SpLV	<i>Spinach latent virus</i> (virus latente de la espinaca)
SPZSV	<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (virus de las manchas por zonas)
TAMV	<i>Tulare apple mosaic virus</i> (virus del mosaico de la manzana tulare)
TAV	<i>Tomato aspermy virus</i> (virus aspermia del tomate)
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (virus del enanismo arbustivo del tomate)
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i> (virus del arrugado del nabo)
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> (virus del grabado del tabaco)
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i> (virus del mosaico dorado del tomate)
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> (virus del mosaico del tabaco)
ToLCNDV	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi)
TSV	<i>Tobacco streak virus</i> (virus del estriado del tabaco)
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (virus del bronceado del tomate)

TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> (virus del mosaico del nabo)
TYLCV	<i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i> (Virus del rizado amarillo del tomate)
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (virus del mosaico amarillo del nabo)
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (virus del mosaico amarillo del Calabacín)

Otras Abreviaturas

AS	Ácido salicílico
Aza	<i>Azelaic acid</i> (Ácido azelaico)
CLMS	<i>Confocal laser fluorescence microscopy</i> (fluorescencia mediante microscopía láser confocal)
CP	<i>Capsid Protein</i> (Proteína de cubierta)
DIG	Digoxigenina
dsRNA	<i>Double Stranded RNAs</i> (RNA de doble cadena)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas)
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (Ensayo de cambio en la movilidad electroforética)
G3P	<i>Glycerol-phosphate</i> (Glicerol-fosfato)
GDD	Dominio conservado de Glicina - Ácido Aspártico - Ácido Aspártico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína fluorescente verde)
HR	<i>Hydrophobic Region</i> (Región hidrofóbica)
IGR	<i>Inter-Genic Region</i> (Región inter-génica)
MP	<i>Movement Protein</i> (Proteína de movimiento)
NTRs	<i>Non-translated Regions</i> , (Regiones no traducidas)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
Pds	<i>Plasmodesmata</i> (Plasmodesmos)
RBD	<i>RNA Binding Domain</i> (Dominio de unión al RNA)
RpRd	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerasas dependientes de RNA)
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i> (resistencia sistémica adquirida)
sgRNA	<i>Subgenomic RNA</i> (RNA subgenómico)
siRNAs	<i>Small interfering RNAs</i> (Pequeños RNAs interferentes)
ssRNA	<i>Single Stranded RNA</i> (RNA de cadena sencilla)
tRNA	<i>Transfer RNA</i> (RNA transferente)
VSRs	<i>Viral suppressors of RNA silencing</i> (Supresor de silenciamiento génico mediado por RNA)

Resumen

Los virus de plantas son patógenos que provocan grandes pérdidas económicas en diferentes cultivos de interés agronómico en todo el mundo. Para poder implementar estrategias de control que mitiguen los daños causados, es muy importante estudiar y conocer la variación genética y los mecanismos evolutivos de los virus así como las interacciones que se establecen entre éstos y las plantas hospedadoras que dan lugar a la manifestación de los síntomas de la enfermedad. En este trabajo se ha estudiado el virus del moteado de la parietaria (PMoV), del género *Iilarvirus* (familia *Bromoviridae*) que tiene un genoma dividido en tres segmentos de RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+). PMoV causa daños en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annuum*) y ha sido detectado en algunos países de la Cuenca Mediterránea como España, Italia, Francia y Grecia.

En este trabajo de Tesis se ha realizado un estudio de la variabilidad genética y evolución del PMoV mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las proteínas 2b y de cubierta (CP) a partir de aislados recogidos en diferentes países. El análisis filogenético mostró que los aislados de PMoV se agrupaban en diferentes clados, uno de los cuales contenía a todos los aislados italianos (clado I) y los otros tres contenían los aislados españoles (clados II, III y IV). El aislado griego GrT-1 usado en este estudio formaba parte del clado IV en el árbol filogenético de la CP mientras que en el árbol filogenético de la 2b aparecía como un aislado independiente. La diversidad nucleotídica de los genes que codifican para las proteínas 2b y CP fue baja (0.062 ± 0.006 y $0.063 \pm 0,006$ para 2b y CP, respectivamente), aunque más alta que la observada en otros ilarvirus. La distribución de las sustituciones sinónimas (S) y no sinónimas (N) reveló que las proteínas 2b y CP se encontraban bajo presión de selección purificadora, con unas pocas posiciones bajo selección diversificadora, como consecuencia de las importantes funciones que desempeñan el ciclo vital del virus. También se detectaron fenómenos de intercambio genético entre algunos aislados españoles, probablemente como resultado de reordenamientos entre los segmentos genómicos de éstos.

Se ha caracterizado biológica y molecularmente el aislado del PMoV T32 obtenido de plantas de tomate que mostraban síntomas de necrosis apical en Torino, Italia. Este aislado fue recogido en 1979, por lo que podría tratarse del primer asilado de PMoV referenciado. Para ello, se analizó su infectividad en diferentes especies hortícolas y se obtuvo la secuencia completa de su genoma. Los resultados obtenidos

mostraron que T32 era un patotipo y genotipo diferente respecto al aislado español CR8 obtenido de tomate y al aislado italiano Pe1 obtenido a partir de plantas de parietaria (*Parietaria officinalis*). El análisis de la secuencia de los RNAs genómicos del aislado T32 y de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas mostró diferentes dominios conservados como los metiltransferasa y NTPasa/helicasa de P1, el dominio RNA polimerasa de P2, los dominios de unión al RNA de la proteína de movimiento 3a (MP) y un dominio rico en aminoácidos básicos lisinas (K) y/o argininas (R) situado en la parte N-terminal de la CP, probablemente implicado en la replicación viral (proceso de activación genómica). También se detectaron estructuras en tallo-bucle en las regiones terminales no traducidas de cada segmento de RNA genómico con potencial de interacción con proteínas. Finalmente, la CP del aislado T32 tenía 16 aminoácidos menos que la CPs de los otros dos aislados italianos (Pe1 y ST-1) como consecuencia de la delección de un nucleótido (citosina). Esta delección también estaba presente en todos los aislados españoles estudiados y en el aislado griego (GrT-1). Finalmente, el análisis de las sustituciones N y S indicó que todas las regiones genómicas del aislado T32 estaban sometidas a una presión de selección negativa o purificadora.

Por otra parte, se han estudiado dos aspectos importantes relacionados con la patogenicidad: el movimiento intercelular del virus, que le permite alcanzar las partes más distales de la planta desde el lugar de inoculación (infección sistémica) y el papel jugado por los diferentes productos virales en la inducción de los síntomas de infección en la planta. En primer lugar se estudió la implicación de la proteína 3a (MP) de PMoV en el movimiento célula-a-célula del virus. Un estudio *in silico* reveló la presencia de dos regiones hidrofílicas no contiguas (R1 y R2) con un alto contenido de aminoácidos básicos lisinas (K) y argininas (R) y una estructura secundaria en α -hélice. Además, se utilizaron diferentes aproximaciones para determinar la implicación de las regiones R1 y R2 en la unión al RNA, localización en plasmodesmos (PDs) y movimiento célula-a-célula. Mediante ensayos de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSA) se demostró que ambas regiones tenían capacidad de unión al RNA de manera independiente, mientras que mediante un análisis mutacional se observó que la pérdida de los aminoácidos básicos de estas regiones interfería con el movimiento intercelular del virus. Los estudios de localización subcelular mostraron que la MP nativa de PMoV se localizaba en los PDs mientras que las MPs a las que se les había quitado los aminoácidos básicos perdían parcial o totalmente la capacidad de localizarse en los PDs. Los ensayos llevados a cabo con una construcción recombinante que contenía el RNA 3

del virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) y a la que se le había reemplazado la MP por la del PMoV mostraron que la acumulación de la MP en los PDs es esencial para el movimiento intercelular del virus.

Finalmente, se estudió la implicación de las proteínas 2b, MP y CP del PMoV en la patogenicidad del virus y el posible mecanismo de inducción de síntomas (factores de patogenicidad o avirulencia). Con este fin utilizamos un vector que contenía la secuencia genética del virus X de la patata (PVX) modificado (pGR107). La construcción de pGR107 que contenía la CP de PMoV indujo fuertes síntomas de enanismo, mosaico y enrollado foliar en plantas de *Nicotiana benthamiana*, diferentes a los inducidos por la construcción pGR107 que contenía solo la secuencia de PVX y que consistían en un suave mosaico foliar. Sin embargo, la construcciones que contenían la MP y la 2b de PMoV indujeron únicamente síntomas de enrollado foliar y mosaico, aunque este último era más intenso que el inducido por la construcción de pGR107 que solo contenía la secuencia de PVX. Como muchos de los factores de patogenicidad son supresores de silenciamiento génico (*Viral suppressors of RNA silencing*, VSRs), se analizó la capacidad VSR de la CP, MP y 2b de PMoV empleando una construcción genética basada en la secuencia genética del virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV) en el que la CP se había reemplazado por la proteína de fluorescencia verde (*green fluorescent protein*, GFP) y que era incapaz de moverse. Sin embargo, si se le suministraba en *trans* una proteína con función VSR, la construcción era capaz de restablecer el movimiento. Los ensayos llevados a cabo mostraron que ni la CP, MP ni la 2b de PMoV eran capaces de restablecer el movimiento de la construcción de TCV, sugiriendo que ninguna de ellas tenía actividad VSR. Estos resultados indicaban que la inducción de síntomas de las proteínas de PMoV en plantas de *N. benthamiana* no estaba relacionado con la supresión del mecanismo de silenciamiento génico.

Resum

Els virus de les plantes són patògens que provoquen grans pèrdues econòmiques en diversos cultius d'interès agronòmic a to el món. Per poder implementar estratègies de control que redueixin els danys causats, és molt important estudiar i conèixer la variació genètica i els mecanismes evolutius dels virus, així com les interaccions que s'estableixen entre ells i les plantes hoste que donen lloc a la manifestació dels símptomes de la malaltia. En aquest treball s'ha estudiat el virus del motejat de la parietària (PMoV), del gènere *Ilarvirus* (família *Bromoviridae*) que té un genoma dividit en tres segments de RNA de cadena senzilla i polaritat positiva (ssRNA+). PMoV causa danys en cultius de tomàquet (*Solanum lycopersicum*) y pebrot (*Capsicum annuum*) y ha sigut detectat en alguns països de la Conca del Mediterrani com ara Espanya, França i Grècia.

En aquesta Tesi s'ha realitzat un estudi de la variabilitat genètica i evolució del PMoV mitjançant l'anàlisi de seqüències nucleotídiques dels gens que codifiquen les proteïnes 2b i de coberta (CP) a partir d'aïllats recollits en diversos països. L'anàlisi filogenètic va mostrar que els aïllats de PMoV s'agrupaven en diversos grups, un dels quals agrupava tots els aïllats italians (grup I) i els altres tres agrupaven els aïllats espanyols (grups II, III i IV). L'aïllat grec Grt-1 utilitzat en aquest estudi es va ubicar al grup IV en l'arbre filogenètic de la CP, mentre que en l'arbre filogenètic 2b va aparèixer com un aïllat independent. La diversitat nucleotídica dels gens que codifiquen per les proteïnes 2b i CP va ser baixa (0.062 ± 0.006 i 0.063 ± 0.006 per 2b i CP, respectivament), tot i que més elevada que la observada en altres *ilarvirus*. La distribució de les substitucions sinònimes (S) i no sinònimes (N) va revelar que les proteïnes 2b i CP es trobaven sota la pressió de selecció purificadora, amb unes poques posicions sota la selecció diversificadora, com a conseqüència de les importants funcions que realitzen en el cicle vital del virus. També es van detectar fenòmens d'intercanvi genètic entre alguns aïllats espanyols, probablement com a resultat de la reorganització dels seus segments genòmics.

S'ha caracteritzat biològicament i molecularment l'aïllat del PMoV T32 obtingut de plantes de tomàquet que mostraven símptomes de necrosi apical a Torino, Itàlia. Aquest aïllat va ser recollit l'any 1979, per tant podria tractar-se del primer aïllat de PMoV referenciat. Es va analitzar la seva infectivitat a diverses espècies hortícoles i es va obtenir la seqüència completa del seu genoma. Els resultats obtinguts van mostrar que T32 era un prototip i genotip diferent respecte l'aïllat espanyol CR8 obtingut de

tomàquet i l'aïllat italià Pe1 obtingut a partir de plantes de parietària (*Parietaria officinalis*). L'anàlisi de la seqüència dels RNA genòmics de l'aïllat T32 i de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes codificades van mostrar diversos dominis conservats com els metiltransferasa i NTPasa/helicasa de P1, el domini RNA polimerasa de P2, els dominis d'unió al RNA de la proteïna de moviment 3a (MP) i un domini alt en aminoàcids bàsic lisines i/o arginines situat en la paret N-terminal de la CP, probablement implicat en la replicació viral (procés d'activació genòmica). També es van detectar estructures en tall-bucle a les regions terminals no traduïdes de cada segment de RNA genòmic amb potencial d'interacció amb proteïnes. Finalment, la CP de l'aïllat T32 tenia 16 aminoàcids menys que la CPs dels altres dos aïllats italians (Pe1 i ST-1) com a conseqüència de la delecció d'un nucleòtid (citosina). Aquesta delecció també estava present en tots els aïllats espanyols estudiats i en l'aïllat grec (GrT-1). Finalment, l'anàlisi de les substitucions N i S va indicar que totes les regions genòmiques de l'aïllat T32 estaven sotmeses a una pressió de selecció negativa o purificadora.

Per altra banda, s'han estudiat dos aspectes importants relacionats amb la patogenicitat: el moviment intercel·lular del virus, que li permet arribar a les parts més distals de la planta des del punt d'inoculació (infecció sistèmica) i el paper que juga pels diversos productes virals en la inducció dels símptomes d'infecció en la planta. En primer lloc, es va estudiar la implicació de la proteïna 3a (MP) de PMoV en el moviment cèl·lula a cèl·lula del virus. Un estudi *in silico* va mostrar la presència de dos regions hidrofíliques no contigües (R1 i R2) amb un alt contingut d'aminoàcids bàsics lisines (K) i arginines (R) i una estructura secundària en α -hèlix. A més, es van utilitzar diverses aproximacions per determinar la implicació de les regions R1 i R2 en la unió al RNA, localització en plasmodesmes (PDs) i moviment cèl·lula a cèl·lula. Mitjançant assajos de retràs en el gel (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSA) es va demostrar que les dues regions tenien capacitat d'unió al RNA de manera independent, mentre que mitjançant un anàlisi mutacional es va observar que la pèrdua dels aminoàcids bàsics d'aquestes regions interferia amb el moviment intercel·lular del virus. Els estudis de localització subcel·lular van mostrar que la MP nativa de PMoV es localitzava en els PDs mentre que les MPs, a les quals se'ls hi havien tret els aminoàcids bàsics, van perdre parcial o totalment la capacitat de localitzar-se en els PDs. Els assajos realitzats amb una construcció recombinant que tenia el RNA 3 del virus del mosaic de l'alfals (Alfalfa mosaic virus, AMV) i que s'havia reemplaçat la MP per la del PMoV,

van mostrar que l'acumulació de la MP en els PDs és essencial pel moviment intercel·lular del virus.

Finalment, es va estudiar la implicació de les proteïnes 2b, MP i CP del PMoV en la patogenicitat del virus i el possible mecanisme d'inducció de símptomes (factors de patogenicitat i avirulència). Amb aquesta finalitat es va utilitzar un vector que contenia la seqüència genètica del virus X de la patata (PVX) modificat (pGR107). La construcció de pGR107 que contenia la CP de PMoV va induir forts símptomes de nanisme, mosaic i cargolament foliar en plantes de *Nicotiana benthamiana*, diferents als induïts per la construcció pGR107 que contenia només la seqüència de PVX i que consistia en un suau mosaic foliar. No obstant això, les construccions que contenien la MP i la 2b de PMoV van induir únicament símptomes de cargolament foliar i mosaic, tot i que aquest últim era més intens que l'induït per la construcció de pGR107 que només contenia la seqüència de PVZ: Com molts dels factors de patogenicitat amb supressors de silenciament gènic (Viral supressors of RNA silencing, VSRs), es va analitzar la capacitat VSR de la CP, MP i 2b de PMoV utilitzant una construcció genètica basada en la seqüència genètica del virus del arrugat del nap (Turnip crinkle virus, TCV) en el que la CP es va reemplaçar per la proteïna de fluorescència verda (green fluorescent protein, GFP) i que no es va poder moure. Tot i això, si se li subministrava en trans una proteïna amb funció VSR, la construcció era capaç de restablir el moviment. Els assajos duts a terme van mostrar que ni la CP, MP ni la 2b de PMoV eren capaços de restablir el moviment de la construcció de TCV, suggerint que cap d'aquestes tenia activitat VSR. Aquests resultats indicaven que la inducció de símptomes de les proteïnes de PMoV en plantes de *N. benthamiana* no estava relacionat amb la supressió del mecanisme de silenciament gènic.

Abstract

Plant viruses are pathogens causing important economic losses on crops of agronomic interest worldwide. The knowledge of the genetic diversity of plant viruses and the evolutionary mechanisms involved as well as the mechanism of interaction with their plant hosts involved on disease development is essential to develop and implement successful strategies for disease control. In the present work, we have studied the *Parietaria mottle virus* (PMoV), genus *Iilarvirus* of the family *Bromoviridae*, with a segmented genome composed three single-stranded positive-sense RNAs (ssRNA⁺). PMoV infects and causes important damages on tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annuum*) crops in the countries of Mediterranean Basin such as Spain, Italy, France and Greece.

In this doctoral thesis, we have studied the genetic variation and evolution of PMoV by analyzing nucleotide sequences of 2b and coat protein (CP) genes from isolates collected in different countries. Phylogenetic analysis showed that PMoV isolates clustered in different groups or clades, one of them containing the Italian isolates (clade I) and three containing the Spanish isolates (clades II, III and IV). The isolate GrT-1 from Greece used in this study clustered in the clade IV for the CP phylogenetic tree whereas it fell out as an individual isolate for the 2b phylogenetic tree. The nucleotide diversity was low (0.062 ± 0.006 and 0.063 ± 0.006 for 2b and CP, respectively) as for other plant viruses, but higher than that for other ilarviruses. The distribution of synonymous (S) and non synonymous (N) substitutions revealed that 2b and CP were under strong purifying selection with some positions under diversifying selection. These results suggest that both genes are under evolutionary constraints probably as a consequence of the essential roles played on the virus life cycle. In addition, we have detected some events of genetic exchange, probably by reassortment of different genomic segments between PMoV Spanish isolates.

A molecular and biological characterization of the PMoV isolate T32 was performed. This was the first isolate reported and was collected in Torino, Italy from tomato plants that showed apical necrosis symptoms. The host range and infectivity of isolate T32 were analyzed and the complete nucleotide sequence of its genome was determined. The results obtained suggested that this PMoV isolate is a different pathotype and genotype respect to the Spanish isolated CR8, collected from infected tomato plants and the Italian isolate Pe1, collected from infected parietaria plants (*Parietaria officinalis*). Nucleotide sequence analysis of the T32 genomic RNAs and the encoded putative proteins showed different conserved motifs such as the

methyltransferase and NTPase/helicase domains of P1, the RNA polymerase domain of P2, RNA binding domains of the 3a movement protein (MP) and a domain rich on basic amino acids in the N-terminal part of the CP, probably implied on virus replication (genic activation process). It was also predicted stem-loop structures in the non-translated terminal regions of each genomic segment, with potential ability to interact with proteins. Finally, the CP of isolate T32 showed a nucleotide (cytosine) deletion that resulted in a different start codon rendering a CP which was 16 amino acids shorter than those of the Italian isolates (Pe1 and ST-1). This cytosine deletion was reported for all Spanish isolates studied as well as the isolate GrT-1 from Greece. Finally, the analysis of N and S substitutions indicated a negative or purifying selection pressure for all genomic regions.

Also, two important aspects of virus pathogenicity have been addressed: the intercellular movement that allows the virus to reach the distal parts of the plant from the inoculation site (systemic infection) and the role played by viral products on induction of plant symptoms. First, the role of 3a (MP) protein in the virus cell-to-cell movement was studied. *In silico* analysis revealed the presence of two hydrophilic non-contiguous regions (R1 and R2) with many basic amino acids: lysines (K) and arginines (R), and a secondary structure in α -helix. Also, different approaches were used to determine the implication of R1 and R2 regions in the RNA binding ability of MP, plasmodesmata (PDs) location and virus cell-to-cell movement. Results of Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) showed that both R1 and R2 regions were able to bind RNA in an independent manner. Mutational analysis showed that K and R basic amino acids of these regions were essential for virus cell-to-cell movement. The assays carried out to determine the subcellular localization of PMoV MP revealed that the wild-type MP was located in the PDs whereas the MP mutants which the basic amino acids were removed, lost total or partially the ability to accumulate in the PDs. Assays with a recombinant construction containing the RNA 3 of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) whose MP was replaced with those of PMoV showed that MP localization in the PDs was essential for the intercellular virus movement.

Finally, the role played for the CP, MP and 2b proteins of PMoV in the development of infection symptoms (pathogenicity or avirulence factors) was studied by using a viral vector (pGR107) based on *Potato virus X* (PVX) genomic sequence. The pGR107 construction with the PMoV CP induced strong symptoms of stunting, mosaic and leaf deformation in *Nicotiana benthamiana* plants, which were different to

those induced by the pGR107 construction with PVX alone, consisting in a slight foliar mosaic. However, the pGR107 constructions containing PMoV MP and 2b proteins induced only leaf deformation and mosaic symptoms in the inoculated leaves, but were stronger than those induced by PVX alone. Since most pathogenicity factors are suppressors of RNA silencing pathway (VSRs), the VSR activity of PMoV CP, MP and 2b was studied by using a viral vector based on the *Turnip crinkle virus* (TCV) genomic sequence in which the CP was replaced by the green fluorescent protein (GFP) and was unable to move. However, the virus movement could be restored by complementation *in trans* with a VSR protein. Neither the CP, MP nor 2b were able to restore the TCV movement, suggesting that these PMoV proteins lacked VSR activity. These results showed that suppression of RNA silencing pathway could not be implied on symptoms induction in *N. benthamiana* plants by CP, MP or 2b proteins of PMoV.

Introducción

1. Introducción General

A finales del siglo XIX se descubrió que las enfermedades infecciosas estaban causadas por gérmenes microscópicos que podían ser cultivados en medios nutritivos especiales. En 1898, el holandés Martinus Beijerinck llegó a la conclusión de que el *contagium vivium fluidum*, responsable de la enfermedad del mosaico del tabaco, era un agente patógeno más pequeño que una bacteria al que denominó virus. Esta es la primera referencia que existe de un virus, que además correspondía con el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Se trataba de un patógeno parásito obligado, pues solo podía multiplicarse en tejido vivo. El TMV se cristalizó en 1935 y en 1958, Rosalind Franklin, co-descubridora de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) junto con James Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins, determinó su estructura molecular.

Los virus son organismos simples que están compuestos por material genético, (RNA o DNA) protegido por una cubierta proteica llamada cápsida. La cápsida se compone a su vez de subunidades proteicas llamadas capsómeros. Los virus más complejos, entre los que se encuentran solo unos pocos virus vegetales, tienen una envoltura lipídica que proviene de la membrana plasmática celular y que recubren al material genético viral y a la cápsida. Al conjunto se le denomina virión y su tamaño es tan reducido que solo son visibles al microscopio electrónico. Los únicos virus vegetales que presentan envoltura lipídica pertenecen al género *Tospovirus* (Familia *Bunyaviridae*) y a algunos géneros de la familia *Rhabdoviridae* (Prins y Goldbach, 1998; Rose y Whitt, 2001).

En la actualidad hay descritas más de 1.100 especies de virus de plantas pertenecientes a 20 familias y 91 géneros, lo cual refleja la notable variedad que existe entre ellos (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2013; <http://viralzone.expasy.org>). Los virus de plantas mayoritariamente presentan genomas de RNA de cadena simple y de polaridad positiva (ssRNA+), aunque también los hay de polaridad negativa (ssRNA-), ambisentido o doble cadena (dsRNA). Los virus que presentan genomas de ssRNA+ se han agrupado en cuatro superfamilias: virus tipo Alfa, Picorna, Camo y Sobemovirus (Fauquet y col., 2005). Los virus de plantas inician su ciclo vital al penetrar en la célula vegetal a través de heridas producidas por daños físicos debidos a causas ambientales o por la acción del hombre durante las tareas agrícolas. Además, la mayoría de los virus vegetales son transmitidos por vectores

biológicos. Los artrópodos herbívoros, nematodos, y hongos fitófagos son los principales tipos de vectores de virus vegetales (Walkey, 1991; Stange, 2006). Entre ellos, los áfidos y las moscas blancas son los insectos que transmiten el mayor número de especies de virus. Durante el proceso infectivo se producen una serie de alteraciones metabólicas en las células hospedadoras que pueden producir la muerte de la planta, aunque en la mayoría de los casos estas alteraciones no son tan drásticas, traduciéndose en una disminución de la producción de los cultivos infectados (Strange y Scott, 2005; Acosta-Leal y col., 2011; Pallás y García, 2011). Los virus de plantas de RNA son los patógenos que más rápido evolucionan ya que tienen una mayor tasa de mutación y diferente dinámica evolutiva que las bacterias, fitoplasmas, nematodos y hongos (Duffy y Holmes, 2008). La comprensión de los mecanismos de interacción que se establecen entre los patógenos virales y los diferentes hospedadores desde el inicio de la infección viral es fundamental para poder desarrollar estrategias eficaces de control de las enfermedades que producen en los cultivos agrícolas (Acosta-Leal y col., 2011). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de aislados del virus del moteado de la parietaria (*Parietaria mottle virus*, PMoV) que infectan cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annum*). Se trata de un virus perteneciente a la superfamilia Alfa, con un genoma ssRNA+ dividido en tres segmentos, perteneciente al género *Ilarvirus* de la familia *Bromoviridae*.

2. Familia *Bromoviridae*

Esta familia comprende seis géneros: *Alfamovirus* y *Anulavirus* con un único miembro cada uno, el virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) y el virus de las manchas por zonas del geranio (*Pelargonium zonate spot virus*, SPZSV), respectivamente, y los géneros *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Oleavirus* e *Ilarvirus*, con varios miembros cada uno de ellos. Los virus pertenecientes a esta familia presentan un genoma tripartito de ssRNA+ (Figura 1). El RNA 1 es monocistrionico y contiene un único marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica la proteína P1. El RNA 2 es monocistrónico en la mayoría de los miembros de la familia y contiene el ORF que codifica la proteína P2, que junto con la P1 forman parte del complejo de la replicasa viral. Sin embargo, se ha encontrado en el RNA 2 del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) y de ilarvirus pertenecientes a los subgrupos 1 y

2, la presencia de un segundo ORF adicional, que se solapa con en el extremo 3'-terminal del ORF que codifica la P2 (Figura 1). En el CMV se ha demostrado que este ORF codifica la proteína 2b, que interviene en el movimiento sistémico (a larga distancia) del virus y actúa como supresor del silenciamiento génico post-transcripcional (Ding y col., 1995; Brigneti y col., 1998; Mayers y col., 2000). El RNA 3 es bicistriónico y contiene dos ORFs, uno en la parte 5'-terminal y otro en la parte 3'-terminal que codifican la proteína 3a implicada en el movimiento viral (MP) y la proteína de cubierta (CP), respectivamente, separados por una región no codificante (*Inter-Genic Region*, IGR). La CP y la proteína 2b se expresan mediante dos RNAs subgenómicos (sgRNA), el sgRNA 4 y el sgRNA 4A, respectivamente. Tanto la parte 5' como la 3'-terminal de cada segmento genómico contiene secuencias que no se traducen a proteínas (*Non-translated Regions*, NTRs). Cada uno de estos RNAs es encapsidado separadamente en viriones de forma esférica en los géneros *Bromo* y *Cucumovirus*, baciliforme en el género *Alfamovirus*, y casi esférica o isométrica en los géneros *Oleavirus* e *Ilarvirus*, aunque también se han descrito viriones baciliformes en estos dos últimos géneros (Bol, 1999).

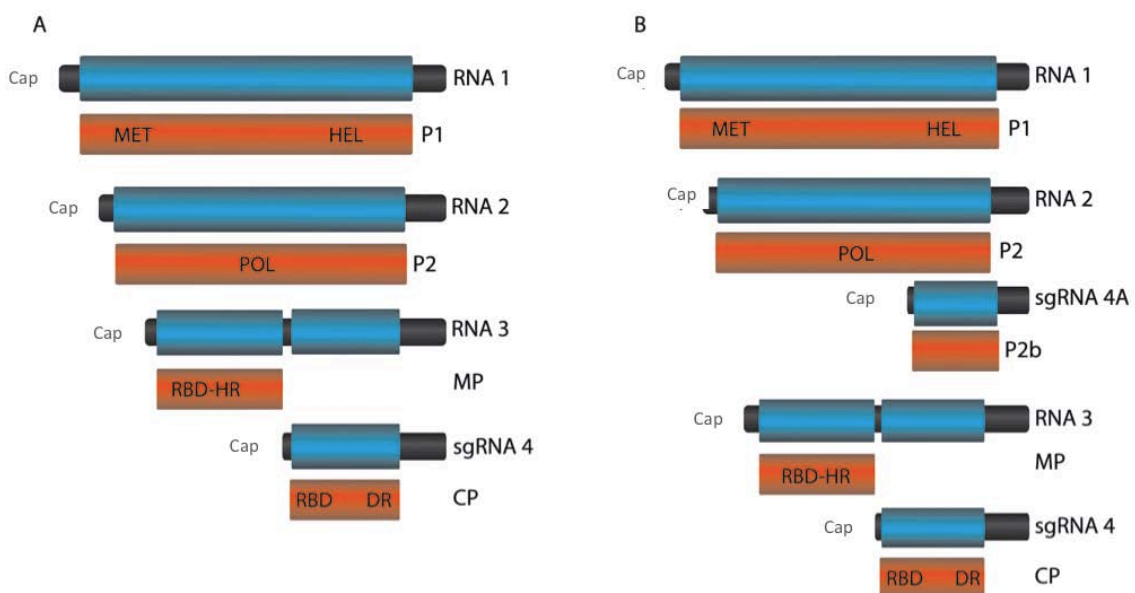


Figura 1. Organización genómica de los virus pertenecientes a la familia *Bromoviridae*. El panel A muestra a los miembros que no presentan en su genoma el ORF 2b mientras que el panel B muestra a los que sí contiene el ORF 2b en la parte 3'-terminal del RNA 2. Los diferentes ORFs se representan en color azul y las proteínas que codifican (P1, P2, 2b, MP y CP) en color rojo. Cada segmento de RNA contiene

una estructura tipo Cap en el extremo 5'-terminal. Las proteínas 2b y CP se expresan a través de dos RNAs subgenómicos, sgRNA 4A y sgRNA 4, respectivamente. En color gris se representan las regiones genómicas no traducidas. En las proteínas se señalan los diferentes dominios conservados: Metiltransferasa (MET), Helicasa (HEL), RNA polimerasa dependiente de RNA (POL), Dominio de Unión al RNA (RBD), Región Hidrofóbica (HR), y la Región de Dimerización (DR).

2.1. Género *Ilarvirus*

El género *Ilarvirus* está compuesto por 19 especies según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2013) (Tabla 1). La extrema labilidad de sus partículas virales y la naturaleza leñosa de las plantas hospedadoras de la mayoría de ellos ha dificultado su purificación, manipulación y transmisión mecánica a hospedadores herbáceos experimentales lo que ha obstaculizado enormemente los estudios dirigidos a conocer sus propiedades estructurales y funcionales (Pallás y col., 2013).

CLASIFICACION DE LOS ILARVIRUS

Subgrupo 1

Virus del moteado de la parietaria	<i>Parietaria mottle virus</i> , PMoV
Virus de la mancha clorótica anular de la zarzamora	<i>Blackberry chlorotic ringspot virus</i> , BCRV
Virus shock necrótico de la fresa	<i>Strawberry necrotic shock virus</i> , SNSV
Virus del estriado del tabaco	<i>Tobacco streak virus</i> , TSV

Subgrupo 2

Virus 2 del espárrago	<i>Asparagus virus 2</i> , AV2
Virus del arrugamiento de la hoja de los cítricos	<i>Citrus leaf rugose virus</i> , CLRV
Virus del variegado de los cítricos	<i>Citrus variegation virus</i> , CVV
Virus del moteado del olmo	<i>Elm mottle virus</i> , EMoV
Virus de la mancha anular de la lila	<i>Lilac ring mottle virus</i> , LRMV
Virus latente de la espinaca	<i>Spinach latent virus</i> , SpLV
Virus del mosaico de la manzana tulare	<i>Tulare apple mosaic virus</i> , TAMV

Subgrupo 3

Virus de las hojas cloróticas de la lila	<i>Lilac leaf chlorosis virus</i> , LLCV
Virus del mosaico de la manzana	<i>Apple mosaic virus</i> , ApMV
Virus del shock del arándano	<i>Blueberry shock virus</i> , BISHV
Virus de los anillos necróticos de <i>Prunus</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> , PNRSV

Subgrupo 4

Virus latente de <i>Fragaria chiloensis</i>	<i>Fragaria chiloensis latent virus</i> , FCILV
Virus del enanismo del ciruelo	<i>Prune dwarf virus</i> , PDV

Virus incluidos en el 2013

Virus latente de <i>Humulus japonicus</i> *	<i>Humulus japonicus latent virus</i> , HJLV
Virus de los arabescos del ciruelo*	<i>American plum line pattern virus</i> , APLPV

Tabla 1. Clasificación de los virus pertenecientes al género *Ilarvirus*, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2013). Las especies de virus incluidos dentro del género en el 2014 pero que no han sido asignados aún a ningún grupo se marcan con un asterisco (*).

Todos los integrantes del género contienen un genoma ssRNA+ dividido en tres segmentos, cada uno los cuales tiene una estructura tipo Cap (m7G5ppp) en el extremo 5'-terminal cuya función es predominantemente protectora. Se ha propuesto que la

región 3'-NTR de *Ilarvirus* y de *Alfamovirus* adopta una estructura secundaria característica en forma de tallos y bucles relacionadas con el proceso de replicación viral. El RNA 1 y el RNA 2 codifican las subunidades de la replicasa viral P1 y P2, respectivamente. Como hemos comentado en el apartado anterior, los virus pertenecientes a los subgrupos 1 y 2 tienen un RNA 2 con un segundo ORF que codificaría para la proteína 2b (Figura 1, panel B). De hecho, ha sido descrita la presencia de un sgRNA 4A derivado del RNA 2 en plantas infectadas con PMoV y con el virus latente de la espinaca (*Spinach latent virus*, SpLV) (Xin y col., 1998; door Peeters, 2009). Además, en el caso de SpLV, se ha podido sintetizar *in vitro* la proteína 2b aunque hasta la fecha ésta no ha podido ser detectada en plantas infectadas (Xin y col., 1998). Respecto a su posible función, por homología de secuencia con la proteína 2b de CMV se ha especulado que podría también estar implicada en el movimiento sistémico del virus (Xin y col., 1998; Guo y Ding, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína 2b del virus 2 del esparrago (*Asparagus virus 2*, AV2) puede actuar como supresor de silenciamiento génico a nivel sistémico (Shimura y col., 2013). El virus latente de *Fragaria chiloensis* (frutilla chilena) (*Fragaria chiloensis latent virus*, FCILV) y el virus del enanismo del ciruelo (*Prune dwarf virus*, PDV) pertenecientes al subgrupo 4, también presentan un segundo ORF en el RNA 2, pero a diferencia de lo que sucede con CMV y con los miembros del subgrupo 1, éste se encuentra en la parte 5'-terminal (Tzanetakis y Martin, 2005). Finalmente el RNA 3 contiene los ORFs que codifican la MP y la CP, situados en la parte 5'- y 3'-terminales, respectivamente. Ambos están separados por una región no codificante denominada IGR en la que se sitúa la región promotora para la síntesis del sgRNA 4 a partir del cual se expresa la CP (Jaspars, 1998; Galipienso y col., 2008). En estos promotores se han delimitado varias regiones: El núcleo del promotor, que es una secuencia nucleotídica corta que se encuentra frente al inicio del sgRNA y una o más secuencias moduladoras adyacentes, que en el caso del virus del mosaico del bromo (*Brome mosaic virus*, BMV), actúan favoreciendo el acceso y el correcto posicionamiento de la replicasa viral sobre el promotor (French y Alquist, 1988; Marsh y col., 1988; Adkins y col., 1997). El núcleo del promotor consiste en una secuencia de entre 20-40 nucleótidos que es suficiente para obtener un nivel basal de transcripción *in vitro*. En el BMV y en el virus del mosaico clorótico de la habichuela (*Cowpea chlorotic mosaic virus*, CCMV) se ha comprobado que los nucleótidos G (-17), A (-14), C (-13) y G (-11) (considerando como +1 la posición de inicio de la transcripción) son los responsables de la interacción

directa con la replicasa viral (Siegel y col., 1997; Adkins y Kao, 1998). La predicción por ordenador de la estructura secundaria del núcleo del promotor de la mayoría de los virus pertenecientes a la familia *Bromoviridae* indica que adquieren una estructura secundaria en forma de uno o dos tallos muy estables, los cuales contienen alguno de los cuatro nucleótidos esenciales descritos para BMV. Esto sugiere que el núcleo del promotor requiere una estructura en forma de tallo para la correcta síntesis del sgRNA 4 (Jaspars 1998, Aparicio y Pallás, 2002).

2.2. Proteínas de replicación

Las proteínas P1 y P2 forman parte del complejo de la replicasa viral en los miembros de la familia *Bromoviridae*. La proteína P1 contiene un dominio metiltransferasa (MET) en su mitad N-terminal, relacionada con el proceso de adición de la estructura Cap en los extremos 5'-terminales virales y también con la replicación de los RNAs de polaridad negativa (Vlot y col., 2002). En el extremo C-terminal de P1 se localiza un dominio helicasa/NTPasa que funcionaría desenrollando el RNA molde (Gorbalenya y Koonin, 1993). La proteína P2 contiene el dominio polimerasa (dominio GDD), que se considera parte del centro catalítico de la RNA polimerasa (Koonin, 1991). Se trata de un dominio rico en residuos de glicina (G) y ácido aspártico (D) y está muy conservado en todos los virus de RNA de polaridad positiva.

2.3. Proteínas de Movimiento

Las MPs de los virus de plantas desempeñan un papel central en el movimiento intracelular e intercelular. En base a las características estructurales, las MPs se pueden clasificar en cinco grupos; i) las proteínas del *Triple Gene Block* de potexvirus y virus relacionados; ii) las MPs de los miembros del género *Tymovirus*; iii) una serie de pequeños péptidos (menores de 10 kDa) codificados por miembros del género *Carmovirus* y familia *Geminiviridae*; iv) las proteínas tipo hsp70 de la familia *Closteriviridae* y v) la superfamilia 30K a la que pertenecen los miembros del género *Ilarvirus* que se caracterizan por presentar un dominio de unos 30 amino ácidos altamente conservados que contiene una región hidrofóbica (*Hydrophobic Region*, HR) precedida de una región rica de aminoácidos básicos que forman parte de un dominio de unión al RNA (*RNA Binding Domain*, RBD) (Figura 2). En la familia *Bromoviridae*, las

MPs de virus de los anillos necróticos de los prunus (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) y AMV presentan el RBD localizado en el extremo N-terminal de la proteína, mientras que en el BMV y CMV este dominio está localizado en el extremo C-terminal (Pallás y col., 2013). A pesar de que los RBDs en las MPs de estos cuatro virus no muestran una elevada homología a nivel de secuencia aminoacídica, sí tienen varias características comunes como son i) una elevada proporción de residuos básicos, ii) la adopción de una estructura secundaria en forma de dos α -hélices, las cuales en un ambiente básico se han descrito que participan en la unión al RNA (Pallás y col., 2013). Por otra parte, estudios recientes con las MPs del TMV y del PNRSV han mostrado que el dominio HR no funcionaría como un dominio transmembrana sino que permitiría la asociación de la MP con la superficie del sistema de endomembranas celulares (Brill y col., 2000; Peiró y col., 2014). Además se ha demostrado que mutaciones que alteran el perfil de hidrofobicidad del dominio HR causan el bloqueo del movimiento intercelular en ambos virus (Martínez-Gil y col., 2009; Peiró y col., 2014).

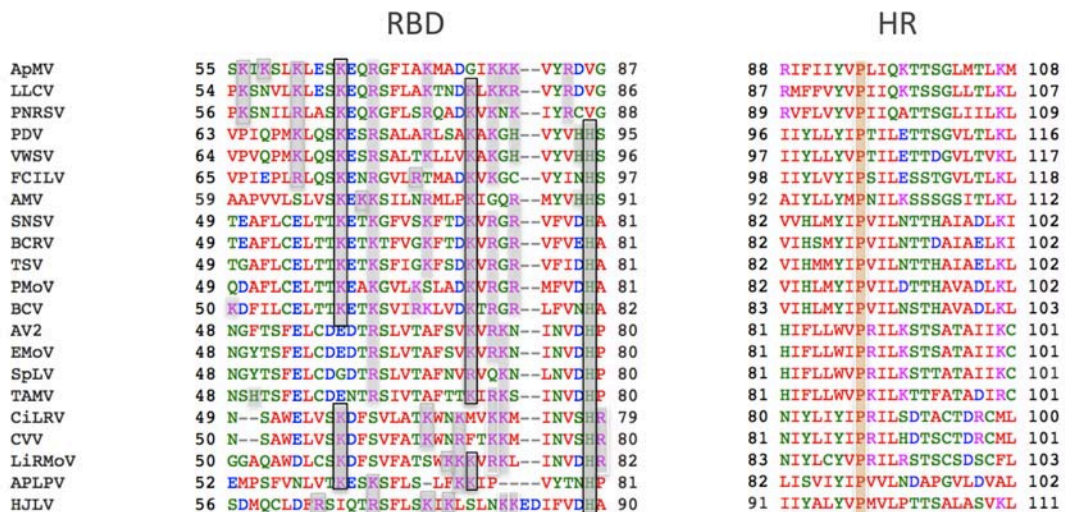


Figura 2. Alineamiento de las regiones de la proteína de movimiento que contienen el dominio de unión al RNA (RBD) (parte izquierda) y de la región hidrofóbica (HR) (parte derecha) del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y de miembros del género *Ilarvirus*: virus del mosaico de la manzana (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus de las hojas cloróticas de la lila (*Lilac leaf chlorosis virus*, LLCV), virus de los anillos necróticos de los prunus (PNRSV), virus del enanismo del ciruelo (PDV), virus latente de *Fragaria chiloensis* (FCILV), virus shock necrótico de la fresa (*Strawberry necrotic shock virus*, SNSV), virus de la mancha clorótica anular de la zarzamora (*Blackberry chlorotic ringspot virus*, BCRV), virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV), virus del moteado de la parietaria (PMoV), virus 2

del espárrago (AV2), virus del moteado del olmo (*Elm mottle virus*, EMOV), virus latente de la espinaca (SpLV), virus del mosaico de la manzana tulare (*Tulare apple mosaic virus*, TAMV), virus del arrugamiento de la hoja de los cítricos (*Citrus leaf rugose virus*, CLRV), virus del variegado de los cítricos (*Citrus variegation virus*, CVV), virus de la mancha anular de la lila (*Lilac ring mottle virus*, LRMV), virus de los arabescos del ciruelo (*American plum line pattern virus*, APLPV), virus latente de *Humulus japonicus* (*Humulus japonicus latent virus*, HJLV). Los aminoácidos básicos del RBD aparecen sombreados en color gris y aquellos aminoácidos básicos que tienen un porcentaje conservado superior al 80% tienen un rectángulo en negro. A la derecha, la alineación de las secuencias de HR mostrando el residuo central prolina (P) (sombreado en naranja) conservado en todos ellos. Los aminoácidos en rojo corresponden a residuos hidrofóbicos (Adaptado de Bujarski y col., 2012).

Comentario

2.4. Proteína de cubierta

La CP de los ilarvirus es sintetizada desde un sgRNA 4 que es transcrito a partir del RNA 3 de polaridad negativa. Mediante comparación de secuencias se identificó una estructura en forma de tallo-bucle situada entre 20 y 37 nucleótidos del sitio de inicio del sgRNA 4 necesaria para la transcripción de este y la síntesis de la CP en toda la familia *Bromoviridae*. En el BMV, esta estructura en tallo-bucle contiene cuatro nucleótidos que son esenciales para la síntesis del sgRNA 4 y que interactúan de manera directa con el complejo de la replicasa viral (Siegel y col., 1997; Adkins y Kao., 1998). En el caso del virus del mosaico de la manzana (*Apple mosaic virus*, ApMV) y el PNRSV ambos presentan dos estructuras tallo-bucle estables, conteniendo el más distal de ellos, los cuatro nucleótidos esenciales (Jaspars, 1998). En el PNRSV, algunos aislados presentan solo el tallo más distal lo que sugiere que éste sería esencial para la síntesis del RNA subgenómico 4 (Aparicio y Pallás, 2002).

La región N-terminal de la CP de los ilarvirus contiene una elevada acumulación de aminoácidos básicos arginina (R) o lisina (K) que conforman el dominio de unión al RNA de la CP (Pallás y col., 2013). De hecho, péptidos sintéticos correspondientes a esta región que contiene estos motivos básicos tienen la capacidad para unirse a la región 3'-NTR de su propio RNA viral (Baer y col., 1994; Aparicio y col., 2003). Mediante un análisis mutacional y de comparación de secuencias de la región N-terminal de la CP del AMV, Virus del estriado del tabaco (*Tobacco streak virus*, TSV) y Virus del variegado de los Cítricos (*Citrus variegation virus*, CVV), se propuso una secuencia consenso de unión al RNA (Q/K/R-P/N-T-X-R-S-R/Q-Q/N/S-W/F-A), donde

el aminoácido arginina (R) es el único residuo esencial y responsable de la unión específica (Ansel-McKinney y col., 1996; Swanson y col., 1998; Yusibov y Loesch-Fries, 1998). En el caso de PNRSV, este motivo que se encuentra entre las posiciones de aminoácidos 30 a 50 y no contiene un solo residuo arginina (R) crítico, sino que al menos dos de los residuos (localizados en las posiciones 30 ó 41) serían críticos en la capacidad de unión al RNA (Aparicio y col., 2003).

Asimismo la región N-terminal de la CP de algunos ilarvirus también presenta un motivo de dedo de zinc ya sea de tipo C_2C_2 o CCCH (Sánchez-Navarro y col., 1997; James y col., 2010). Estos motivos, que se han encontrado en varias proteínas con actividad de unión a ácidos nucleicos, podrían intervenir en la unión de iones de zinc a través de un complejo tetraédrico (Berg, 1986; Gramstat y col., 1990). Además, podrían participar en las propiedades de unión de estas CPs al RNA, al inducir un aumento de la afinidad de unión y/o de la estabilidad de la proteína (Ansel-McKinney y col., 1996; Aparicio y col., 2003).

2.5. Proceso de activación genómica

Los géneros *Ilarvirus* y *Alfamovirus* presentan el denominado proceso de activación genómica por el que la presencia de moléculas de la CP es necesaria para iniciar la multiplicación viral mediante la unión de ésta al extremo 3'-NTR de los RNAs virales. (Houwing y Jaspars, 1980; Smith y col., 1981). Se ha comprobado que la CP de varios ilarvirus son intercambiables en la activación genómica (Sánchez-Navarro y col., 1997; Ansel-McKinney y col., 1996; Ansel-McKinney y Gehrke, 1998; Aparicio y col., 2003). Además se ha demostrado que péptidos correspondientes a los primeros 25 ó 38 residuos del extremo N-terminal de la CP con capacidad de unión al RNA son capaces de reemplazar la proteína completa en el proceso de iniciación de la infección viral (Baer y col., 1994; Zuidema y col., 1983). Asimismo, se ha propuesto que la región 3'-NTR de los RNAs virales de AMV e ilarvirus adopta una estructura secundaria altamente conservada que consta de varios tallos-bucles flanqueados por secuencias AUGC no apareadas que representan sitios de unión específicos para la CP (Figura 3) (Zuidema y col., 1983; Reusken y col., 1994; Reusken y Bol, 1996; Ansel-McKinney y Gehrke, 1998; Aparicio y col., 2003). Además, ensayos de unión de la CP de AMV y PNRSV a la región 3'-NTR han mostrado que ésta última podría adoptar una segunda

conformación alternativa formando un pseudonudo parecido a un RNA transferente (tRNA) (Olsthoorn y col., 1999; Aparicio y col., 2003).

Actualmente, se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo de la activación genómica. El primero sugiere que tras la unión de la CP a la región 3'-NTR, ésta adquiriría una estructura tipo tRNA que permitiría la unión del complejo de la replicasa viral y el inicio de la síntesis de las cadenas negativas. Así, este cambio conformacional entre las dos estructuras mediada por la CP, estaría implicado en la regulación de replicación viral (Olsthoorn y col., 1999; Aparicio y col., 2003; Chen y Olsthoorn, 2010). El segundo modelo sugiere que la interacción entre la CP y el RNA formaría un complejo ribonucleoprotéico que sería el equivalente funcional de la estructura tipo RNAt, permitiendo la unión del complejo de la replicasa viral (Baer y col., 1994; Petrillo y col., 2005).

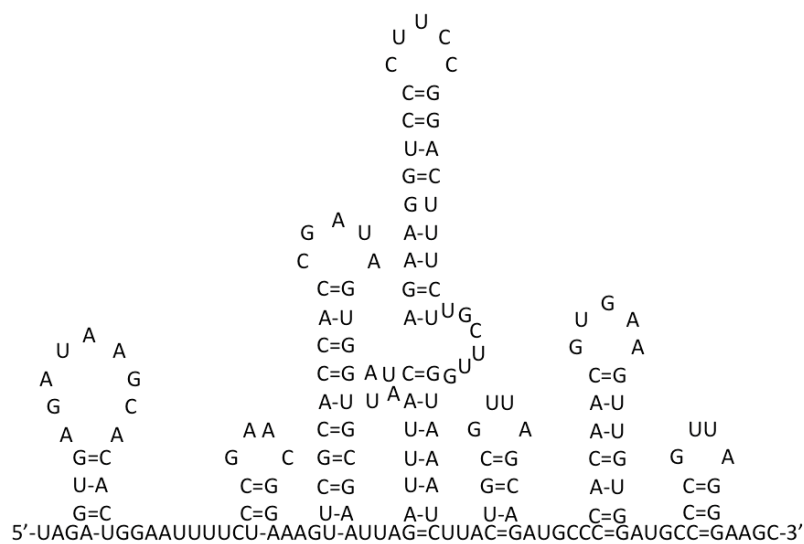


Figura 3. Representación de las estructuras en bucle de la región 3' no traducida (3'-NTR) del RNA 3 del virus de los anillos necróticos de *Prunus* (PNRSV) que intervienen en el proceso de activación génica (Adaptado de Pallás y col., 2012).

3. Replicación viral

La multiplicación viral es el primer paso del ciclo vital de los virus una vez que estos han penetrado en las células del hospedador. En el caso de los virus de plantas, éstos entran en las células de manera pasiva a través de heridas producidos por causas naturales, herramientas agrícolas o vectores biológicos de transmisión viral. Una vez en

el interior celular, tiene lugar el proceso de replicación del virus utilizando la maquinaria celular y algunas proteínas virales. En los virus ssRNA+, la cadena de polaridad positiva es utilizada como molde para la síntesis de cadenas complementarias negativas. Como hemos visto, en los ilarvirus y el AMV se necesita la interacción del RNA viral con la CP (activación génica). A partir de las cadenas de polaridad negativa formadas inicialmente, tiene lugar la síntesis completa de nuevas cadenas de polaridad positiva, que pueden encapsidarse dando lugar a la progenie viral o, estas cadenas de polaridad negativa también pueden ser utilizadas para sintetizar los diferentes sgRNAs a partir de los que se expresarán las proteínas virales. Los virus de ssRNA+ suelen contener poca información genética, aunque han de tener la información para sintetizar las proteínas implicadas en la replicación de su genoma, denominadas RNA polimerasas dependientes de RNA (RpRd) (Novak y Kirkegaard, 1994; Ahlquist, 2002). El complejo activo de la RdRp está constituido, además de las proteínas codificadas en el genoma viral, por una serie de proteínas celulares tales como tubulina, actina y diversas proteínas implicadas en la maquinaria de traducción del RNA (proteínas heteronucleares, ribosomales y varios factores de traducción) (Lai, 1998). Hay evidencias de que diversas subunidades del factor de traducción eIF3 forman parte del complejo replicativo del BMV y del TMV (Quadt y col., 1993; Osman y Buck, 1997) mientras que los factores EF1 y HF1 parecen participar en la replicación del virus del mosaico amarillo del nabo (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) (Joshi y col., 1986) y el factor de procesamiento Lsm1p en la replicación de BMV (Díez y col., 2000).

4. Movimiento de virus

Otra parte importante del ciclo vital de los virus consiste en la colonización de nuevas células en el hospedador a partir del punto inicial de entrada. Los virus inician el movimiento invadiendo las células adyacentes a través de conexiones en la pared celular conocidas como plasmodesmos (PDs) (Figura 4), en un proceso llamado movimiento célula a célula o movimiento a corta distancia. Este movimiento intercelular permite al virus alcanzar el tejido vascular, a través del cual invadirá los tejidos distales de la planta en un proceso denominado movimiento viral sistémico (Fernández-Calviño y col., 2011; Pallás y García, 2011; Ueki y Citovsky, 2007).

4.1. Movimiento viral célula a célula

Los virus de plantas codifican en su genoma una o más MPs requeridas para transportar el genoma desde la célula infectada a una célula adyacente sana (Lucas, 2006). Estudios realizados con mutantes termosensibles del TMV permitieron identificar la primera MP en virus de plantas (Leonard y Zaitlin, 1982; Deom y col., 1987; Meshi y col., 1987). Las MPs presentan una serie de propiedades comunes como son la capacidad de unión a ácidos nucleicos, interacción con componentes del citoesqueleto celular y asociación a los PDs, facilitando la translocación de ácidos nucleicos a través de éstos (Boevink, y Oparka, 2005; Lucas, 2006; Pallás y col., 2013).

Para poder atravesar los PDs, los virus emplean diferentes mecanismos en los que además de la MP puede ser necesaria la presencia de la CP. Así, en la alubia (*Vigna unguiculada*) el TMV, el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) y el CCMV no requieren de CP y atraviesan los plasmodesmos en forma de complejos de MP-RNA (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999). En el caso de los virus que requieren la CP se han descrito dos formas de movimiento célula a célula: los virus pertenecientes a los géneros *Nepo* y *Comovirus* se mueven en forma de viriones atravesando los plasmodesmos mediante estructuras tubulares formadas por las MPs (van Lent y col., 1990; Wiczorek y Sanfaçon, 1993; Ritzenthaler y Hofmann, 2007) y virus como el CMV y el AMV que se mueven como complejos ribonucleoprotéicos aunque no sería necesaria la formación de viriones (Blackman y col., 1998; Sánchez-Navarro y col., 2006). En el caso del BMV se han identificado cepas del virus que requieren la presencia de la CP mientras que en otras esta proteína no es necesaria (Takeda y col., 2005). En cuanto a los miembros del género *Iilarvirus*, la falta de clones infecciosos ha dificultado el estudio *in vivo* del movimiento intercelular. Esta carencia ha sido suplida empleando un clon infectivo del RNA 3 de AMV en el que se puede intercambiar la MP del virus por otras MPs (Sanchez-Navarro y Bol, 2001). Con esta herramienta se ha comprobado que el PNRSV y probablemente otros ilarvirus se mueven a través de los PD (Figura 4) mediante complejos ribonucleoprotéicos constituidos por CP y MP (Sanchez-Navarro y col., 2006). En AMV y PNRSV, la región C-terminal de la MP es requerida para la interacción con la CP, además está implicada en el direccionamiento hacia los plasmodesmos y es crítica para la funcionalidad de la proteína (Sanchez-Navarro y col., 2006; Aparicio y col., 2010).

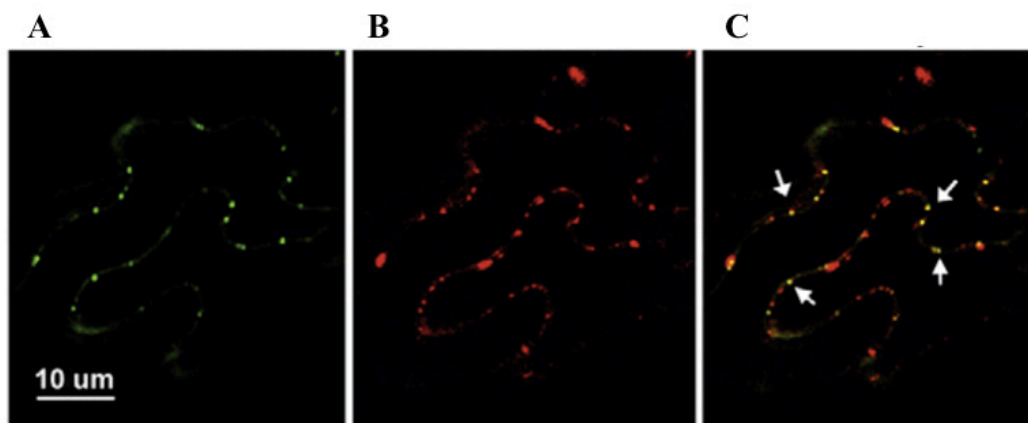


Figura 4. Localización subcelular mediante imágenes obtenidas con microscopía láser confocal en células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con la proteína de movimiento (MP) del virus de los anillos necróticos de Prunus (PNRSV) fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) (panel A) y co-expresada con la MP del virus del mosaico del tabaco (TMV) fusionado a la proteína fluorescente roja (DsRed) (Panel B). Las imágenes muestran el patrón típico de estructuras puntiformes en la pared celular, las cuales corresponden a la acumulación de las proteínas de fusión en plasmodesmos. El panel C corresponde a la superposición de la imágenes A y B para confirmar la colocalización de ambas proteínas en los plasmodesmos (indicado con flechas) (Adaptada de Pallás y col, 2013).

4.2. Movimiento viral sistémico

El movimiento célula a célula permite a los virus alcanzar el sistema vascular de la planta, a partir del cual se dispersan alcanzando las partes distales en lo que se conoce como movimiento viral sistémico. El transporte sistémico de un virus se podría dividir en cuatro etapas: *i)* entrada en el parénquima vascular a través de las células de la vaina, *ii)* translocación a las células acompañantes y a continuación a los elementos cribosos del parénquima vascular, *iii)* transporte por los elementos cribosos hacia otros órganos de la planta y *iv)* entrada desde los elementos cribosos y las células acompañantes al parénquima vascular de regiones no infectadas.

El paso del virus de las células del mesófilo al parénquima vascular no es diferente al movimiento entre células del mesófilo, ya que la ultraestructura de los PDs que interconectan las células de la vaina y el parénquima floemático son similares a los que comunican las células del mesófilo, mientras que la infección de las células acompañantes presenta mayor dificultad (Genovés, 2008). Esto se traduce en que siempre hay un mayor porcentaje de células del parénquima floemático infectadas con

respecto a las células acompañantes, siendo esta etapa un paso limitante de la infección sistémica (Nelson y van Bel, 1998; Moreno y col., 2004). Una vez alcanzadas las células acompañantes, los virus tienen un fácil acceso a los elementos cribosos debido a que los PDs que conectan estos tipos de células presentan una estructura y diámetro que no restringen el paso del virus. Por tanto, los virus pueden alcanzar los elementos cribosos como partículas virales, como el virus del mosaico verde del pepino (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) o como complejos ribonucleoproteicos (*Umbravirus*). Una vez alcanzado el floema, el virus viajará con el flujo de fotoasimilados (Oparka y Turgeon, 1999; Thompson y Schulz, 1999). Del mecanismo de salida del sistema floemático se conocen pocos detalles, aunque podría producirse un proceso inverso al de entrada. En cuanto a los miembros de la familia *Bromoviridae*, se sabe que AMV, CMV y BMV se transportan mayoritariamente a través del floema en forma de viriones (Van der Vossen y col., 1994; Blackman y col., 1998; Sánchez-Navarro y Bol, 2001).

5. Interacción del virus con el hospedador e inducción de procesos patológicos

Durante el proceso de infección, se produce un equilibrio entre el virus y los diferentes mecanismos de defensa de la planta, que en casos extremos puede conducir a la muerte de la misma. Lo normal es que se de una situación intermedia, observándose una amplia gama de sintomatologías que responde a cambios bioquímicos, metabólicos y de regulación genética de la planta inducidos por el patógeno.

5.1. Silenciamiento génico

El silenciamiento génico mediado por RNAs pequeños es un mecanismo de regulación génica implicado en muchos procesos biológicos como el desarrollo de la planta, la adaptación a condiciones de estrés y defensa frente a patógenos. Las diferentes rutas de silenciamiento por RNA presentes en plantas se inducen por la presencia de dsRNA que pueden tener varios orígenes. El proceso se inicia cuando las estructuras de dsRNA son reconocidas por una clase de RNAsa tipo III denominada DICER-LIKE (DCL) que corta el dsRNA dando lugar a lo que se denominan pequeños RNA (*small RNAs*, sRNAs) con una longitud final de 20-25 nucleótidos (Figura 5). A continuación, estos sRNAs son incorporados a una proteína llamada Argonauta (AGO)

que forma parte del complejo efector RISC. De este modo los sRNAs confieren especificidad al complejo RISC por sus moléculas diana (RNA o DNA). La interacción de estos complejos con las moléculas diana de RNA causa una regulación negativa bien mediante la fragmentación de ese RNA o bien reprimiendo su expresión. En el caso de la interacción con las moléculas diana de DNA, inducen la metilación del DNA y/o histonas lo que conlleva la represión transcripcional de ese DNA (Llave y col., 2002; Zheng y col., 2007).

El mecanismo de silenciamiento mediado por RNAs pequeños también constituye un sistema de defensa de la planta frente a diferentes patógenos entre los que se encuentran los virus. En el caso de los virus, los dsRNAs producidos durante el proceso de replicación viral, o formados por plegamientos y apareamientos de bases complementarias en determinadas zonas del genoma viral inducen la generación de moléculas de RNA pequeñas (21-24 nucleótidos) llamadas RNAs pequeños derivados del virus (*virus-derived small RNAs*, vsRNAs) (Ding y Voinnet, 2007). Estos vsRNAs pueden actuar tanto sobre el genoma del virus como el de la planta de modo que pueden, por un lado limitar la infección viral, pero también modular la expresión génica del huésped a través de interacciones con secuencias de RNA y/o DNA de la planta (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond y col., 2000; Dunoyer y Voinnet, 2005; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009; Llave, 2010). El proceso de silenciamiento se inicia con el reconocimiento de dsRNA viral por las mismas proteínas DCL que actúan en la formación de los sRNAs para dar lugar a los RNAs de interferencia pequeños (*small interfering RNAs*, siRNAs). Además, se produce la amplificación de siRNAs secundarios procedentes de moléculas de dsRNA sintetizadas por proteínas con actividad RpRd de la planta, los cuales son transportados a través del floema por toda la planta dando lugar a la dispersión sistémica del silenciamiento (Voinnet, 2008; Dunoyer y col., 2010). Los virus han desarrollado una contradefensa consistente en la expresión de proteínas que bloquean este mecanismo, denominadas supresores virales de silenciamiento de RNA (*viral suppressors of RNA silencing*, VSRs) (Li y Ding, 2006). Los VSRs pueden actuar de tres modos: *i*) uniéndose a los RNAs e impidiendo la generación de siRNAs por DICER, *ii*) secuestrando los siRNAs e impidiendo su unión a AGO y *iii*) interaccionando de manera directa con DICER y/o RISC e inhibiendo su acción (Incarbone y Dunoyer, 2013).

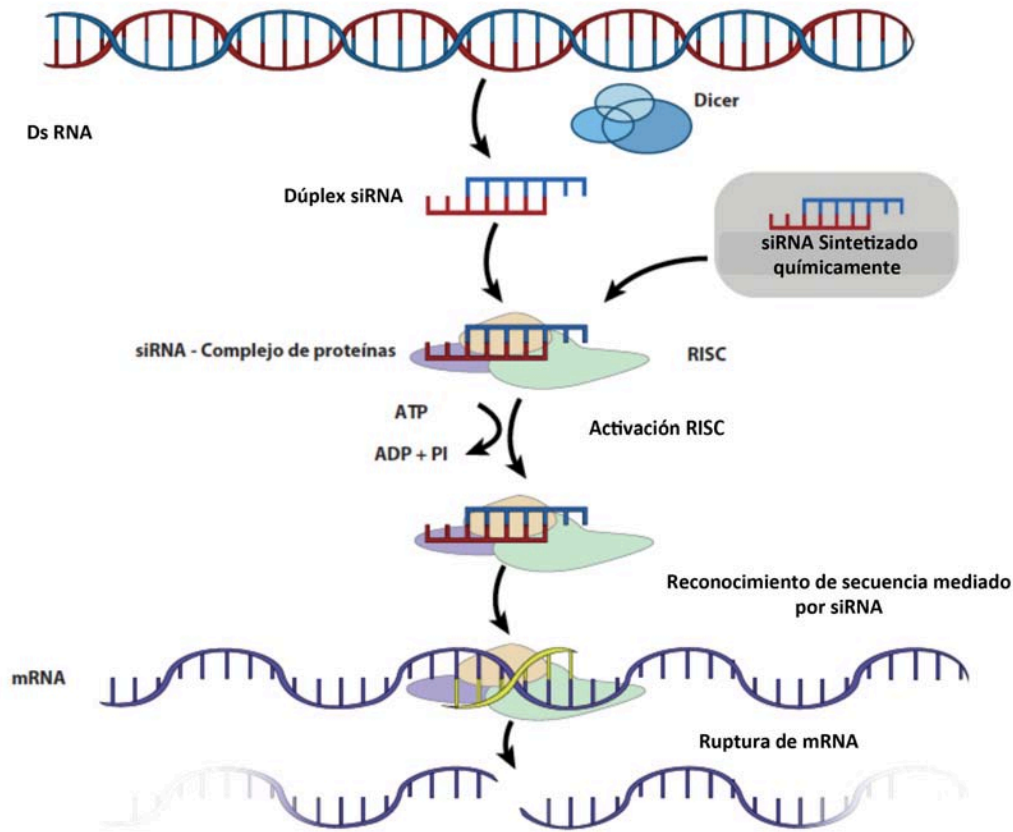


Figura 5. Esquema del silenciamiento génico post-transcripcional en plantas.

5.2. Resistencia sistémica adquirida

Otro mecanismo de defensa de la planta es el mecanismo de resistencia sistémico adquirido (*Systemic Acquired Resistance, SAR*) (Figura 6). Este mecanismo defensivo no es específico, y una vez desencadenado puede servir para defenderse de cualquier patógeno aunque sea distinto del que causó la infección inicial. En este caso, el determinante de patogenicidad viral induciría la expresión de ciertos compuestos (infección primaria) entre los que se encuentra el ácido salicílico (AS), el glicerol-fosfato (G3P) y el ácido azelaico (AzA) (Jung y col., 2009). Estos compuestos activan la expresión de genes que codifican proteínas de defensa (*Pathogenesis Related Proteins, PRs*) en toda la planta, incluso en partes alejadas del punto de infección con el fin de proteger la planta frente a una infección secundaria. El SAR puede ser inducido por la aplicación externa de la fitohormona AS o por análogos sintéticos del ácido dicloroisonicotínico (INA) y el benzotiadizol S-metiléster (BTH) (Durrant y Dong, 2004). Este mecanismo confiere resistencia frente a diferentes patógenos como nematodos, hongos, virus y bacterias y puede perdurar durante un amplio periodo de

tiempo (Kuc, 1987). El SAR no está asociado a la muerte celular programada, que se produce como respuesta a otro mecanismo de defensa diferente y que está mediado por los genes de resistencia (R) de la planta. Las proteínas que codifican estos genes interactúan directamente con determinados productos virales llamados efectores, desencadenando la muerte celular programada. Se trata de una respuesta rápida que fenotípicamente se caracteriza por la aparición de una necrosis en el punto de infección. Este fenómeno también recibe el nombre de respuesta hipersensible (Caplan y col., 2008)

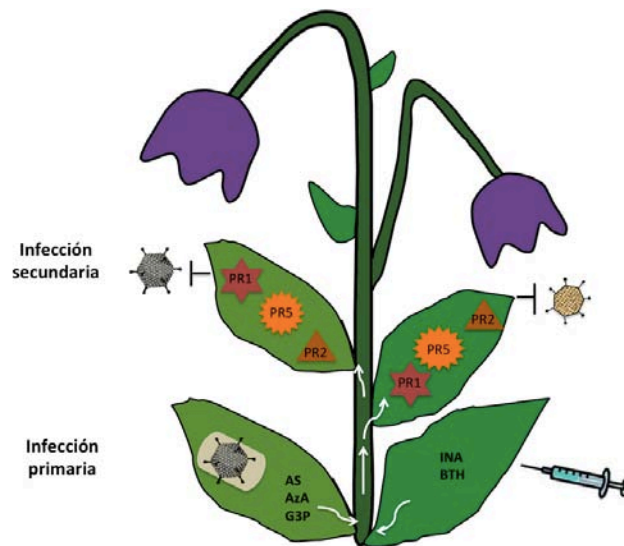


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo de resistencia sistémica adquirida (SAR), desencadenado por un patógeno viral. Durante la infección primaria se induce la expresión de ácido salicílico (AS), glicerol-fosfato (G3P) y ácido azelaico (AS), los cuales activan la expresión de genes que codifican las proteínas de defensa PRs (Indicadas dentro de los asteriscos y el triángulo) en toda la planta, para protegerla frente a una infección secundaria. El SAR también puede ser inducido por la aplicación externa de AS o por análogos sintéticos del AS, del ácido dicloroisocotínico (INA) y el benzotiadizol S-metilester (BTH) (Adapatado de Fu y Dong, 2013).

5.3. Determinantes de patogenicidad en virus

Muchos virus expresan proteínas que intervienen en la inducción de síntomas en plantas, a los que se les denomina determinantes de patogenicidad. Muchas de estas proteínas son VSR que reprimen el mecanismo de silenciamiento génico de la planta y están presentes en diferentes virus. Algunos ejemplos de VSRs son la P14 del virus

latente del potos (*Pothos latent virus*, PoLV) y la P38 del virus del arrugado del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV), que se unen a moléculas de dsRNA *in vitro*, sugiriendo que actúan protegiendo al dsRNA de la acción de DCL (Merai y col., 2005 y 2006); la P21 codificado por el virus occidental amarillo de la remolacha (*Beet western yellow virus*, BWYV) y la P19 codificada por el virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) secuestran los siRNAs e impiden la formación del complejo RISC (Chapman y col., 2004; Dunoyer y col., 2004; Lakatos y col., 2004); y la P6 del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), que interactúa físicamente con la proteína DRB4 que une dsRNA, inhibiendo de este modo el procesamiento de dsRNA por DCL4 (Haas y col., 2008). Otros ejemplos de VSRs son la proteína HC-Pro de potyvirus (Tenllado y col., 2003; Lin y col., 2007) y la P25 del virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) (Voinnet y col., 2000). En algunos casos, los virus pueden tener incluso varias proteínas supresoras del silenciamiento génico como el caso del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) que codifica las VSRs P20, P25 y P23 (Lu y col., 2004). En la Familia *Bromoviridae*, a la que pertenece PMoV, se sabe que la proteína 2b del virus del CMV, la del virus aspermia del tomate (*Tomato aspermy virus*, TAV) y del AV2, son VSRs (Brigneti y col., 1998; Shimura y col., 2011).

Sin embargo, numerosos virus codifican determinantes de patogenicidad que no intervienen en el mecanismo de silenciamiento génico. Entre ellas se encuentra la CP de CMV, que está implicada en la inducción de la respuesta hipersensible en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Sekine y col., 2006). También hay evidencias de que las MPs de algunos virus intervendrían en la modulación de los síntomas, pudiendo ser consideradas determinantes de patogenicidad. Así, determinados cambios de aminoácidos en la MP del BMV, del virus del mosaico dorado del tomate (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) y del TYMV están relacionados con un aumento en la severidad de los síntomas (Tsai y Dreher, 1993; Rao y Grantham, 1994; Saunders y col., 2001). Por otra parte, se han identificado unos aminoácidos muy conservados en la MP de aislados severos de PNRSV (género *Ilarvirus*) procedentes de cerezo que podrían estar relacionados con la patogenicidad (Hammond y col., 1999). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual estas MPs aumentan la intensidad de los síntomas. Por otro lado, el análisis de mutaciones espontáneas junto a la utilización de transcritos infecciosos procedentes de clones de cDNA ha permitido demostrar que algunas mutaciones puntuales en la MP son responsables de la adaptación de los virus de plantas

a huéspedes no permisivos lo que implica directamente a las MPs en la determinación de la especificidad del huésped (Fujita y col., 1996; Sasaki y col., 2001). Asimismo, se ha visto que los propios ácidos nucleídos virales pueden actuar como determinantes de patogenicidad. Por ejemplo, en algunos tomosvirus la excesiva acumulación de siRNAs derivados de una molécula defectiva de RNA viral, interfieren con la actividad de la proteína P19 del virus, que actúa como supresora del silenciamiento génico (Havelda y col., 2005). Por otra parte, un siRNA derivado de una molécula satélite del CMV actúa reprimiendo la expresión de un gen implicado en la síntesis de clorofila, lo que causa un amarillamiento general de la planta (Shimura y col., 2011; Smith y col., 2011).

6. Evolución viral

El estudio genético de las poblaciones virales y de su evolución es muy importante para conocer con mayor precisión la epidemiología de los virus y el riesgo de emergencia de nuevas variantes que puedan ser dañinas para la agricultura. Asimismo, con el fin de establecer estrategias adecuadas de control, estos estudios son necesarios para la puesta a punto de métodos de detección basados en técnicas moleculares como la PCR y/o hibridación molecular.

La mayor parte de virus que infectan plantas tienen genomas de RNA con un gran potencial para generar variación genética y evolucionar debido a su elevada tasa de replicación y de mutación (10^{-3} a 10^{-5} cambios por posición nucleotídica y ciclo de replicación), causada por la ausencia de actividad de corrección de lectura de las RNA polimerasas (Drake y Holland, 1999). Por tanto, las mutaciones son la principal fuente de variación genética en este tipo de virus. Otra fuente de variación a considerar es la recombinación genética o reordenamiento de segmentos genómicos entre distintos virus o aislados virales. Este intercambio genético tiene como efecto la aceleración de la adaptación a nuevos entornos o condiciones y también puede servir para eliminar mutaciones deletéreas (Chare y Holmes, 2006).

La selección natural actúa limitando la variabilidad genética y permite que las variantes que tengan una mayor eficacia biológica (*fitness*) aumenten su frecuencia en la población (selección positiva). Por el contrario, aquellas que tengan un menor *fitness* disminuirán su frecuencia pudiendo desaparecer (selección negativa). La selección puede estar condicionada por las interacciones que establecen los virus con sus hospedadores (Schneider y Roossinck, 2001) y con sus vectores de transmisión (Chare

y Holmes, 2004). La selección positiva permite la adaptación de los virus a nuevas especies hospedadoras y en algunos casos a la superación de medidas de control como el cultivo de variedades resistentes (López y col., 2011). La deriva genética es un mecanismo estocástico que también limita la variabilidad de los virus (Sacristan y col., 2003; Lin y col., 2004). Como consecuencia de un muestreo aleatorio, pueden variar las frecuencias alélicas de una población, siendo más acusadas estas variaciones al disminuir el tamaño de las poblaciones. La magnitud de la deriva genética será mayor cuando ocurre una reducción drástica de la población (cuello de botella), o por la formación de una nueva población a partir de pocos individuos (efecto fundador). El flujo genético o migración es otro mecanismo evolutivo que disminuye las diferencias genéticas entre poblaciones (Slatkin, 1987). La migración de variantes genéticas puede ocurrir entre diferentes áreas geográficas, entre plantas y entre distintas partes de una planta.

7. Métodos de Control.

El control de las enfermedades producidas por virus vegetales va dirigido a prevenir o disminuir la infección o la dispersión del virus, puesto que no existe ningún tratamiento efectivo que permita curar las plantas infectadas. Por tanto, los métodos de control han de basarse en el uso de material propagativo libre de virus, la realización de prácticas agronómicas adecuadas, la obtención de plantas resistentes o tolerantes y el control de los organismos que actúen como vectores de transmisión. Lo recomendable es llevar a cabo un programa en el que se apliquen todas estas medidas de manera coordinada, ya que la aplicación de medidas aisladas resulta poco eficaz. Para esta tarea, es muy importante la participación de productores, de entidades públicas con competencias de sanidad vegetal y la aplicación de una legislación apropiada en materia de regulación fitosanitaria (Navarro, 1993; Lee, 1999).

La utilización de material propagativo libre de virus evita la introducción de éstos en los cultivos a través de programas de certificación y cuarentena. La transmisión de virus por semilla tiene un gran impacto, sobre todo en los cultivos hortícolas. Además, la comercialización de semillas infectadas pueden ser agentes de transmisión de virus a grandes distancias, contribuyendo a su dispersión y la aparición de enfermedades emergentes en regiones en donde no estaba presente el patógeno. Por tanto, tiene una gran importancia la obtención de semillas libres de virus y el control

fitosanitario riguroso de los productos que se comercializan (Hull, 2002). Cuando el material propagativo está infectado con virus, éste se debe sanear mediante termoterapia, quimioterapia y cultivo *in vitro* de meristemos antes de ser comercializado (Walkey, 1991; Toussaint y col., 1993; Faccioli y Marani, 1998). La aplicación de prácticas agronómicas adecuadas también resulta de vital importancia para el control de las enfermedades producidas por virus. Entre las medidas más eficaces se encuentran: *i)* la descontaminación de las manos y de las herramientas de trabajo que favorecen la dispersión de los virus transmisibles por contacto, *ii)* dejar de cultivar ciertas especies durante un periodo de tiempo para romper el ciclo de transmisión del virus y *iii)* la eliminación de toda fuente de inóculo mediante la erradicación de las plantas infectadas, tanto del cultivo como de malas hierbas que puedan actuar como reservorios virales.

Otra forma de luchar contra este tipo de enfermedades es establecer métodos de control de los organismos que actúan como vectores transmisores de virus. La aplicación de pesticidas suele ser poco específica y poco respetuosa con el medio ambiente. En este sentido, las normativas europeas han ido encaminadas a suprimir un gran número de productos, por lo que el control de vectores mediante la utilización de fauna parasita y/o depredadora se está imponiendo cada vez más. Otra estrategia de reducido impacto ambiental es la utilización de barreras físicas como la protección del cultivo con mallas que impidan el acceso de los insectos y la utilización de plantas no susceptibles como barreras físicas.

La producción de plantas resistentes es el métodos más útil para la lucha contra los virus (Hull, 2002). La manera tradicional de obtenerlas se basa en la mejora genética, que consiste en incorporar genes que confieran una resistencia específica contra ciertos virus o genotipos virales en variedades vegetales de interés agronómico mediante hibridación, retrocruzamiento y selección. Otra forma de obtener plantas resistentes a virus es mediante transformación genética, que consiste en la producción de plantas transgénicas mediante la introducción de DNA foráneo en el genoma de la planta mediante ingeniería genética. Existen diferentes modalidades como *i)* la introducción de un gen de resistencia de otra especie vegetal, *ii)* la expresión de anticuerpos *in planta* (*plantibodies*) contra los virus, *iii)* la inducción de proteínas inhibidoras de la traducción mediante la inactivación de los ribosomas y *iv)* introducción de secuencias virales para la activación del mecanismo de silenciamiento génico (Fuchs y col., 2007; Qu y col., 2007; Prins y col., 2008). Sin embargo, actualmente existe una gran presión social en contra del uso de plantas transgénicas

debido a los efectos negativos que podrían tener en el medio ambiente y la salud humana. También se puede inducir la resistencia en plantas mediante la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta. De esta manera, la inoculación de variantes virales poco virulentas puede activar el mecanismo de silenciamiento génico confiriendo resistencia en la planta frente a variantes virulentas (protección cruzada). Esta técnica se ha aplicado con diferentes grados de éxito para controlar un gran número de enfermedades producidas por virus como el CTV (Moreno y col., 2008). La protección cruzada puede conllevar algunos problemas tales como que los aislados que inducen la protección sean virulentos en otras variedades, que se produzca emergencia de nuevos aislados virales por recombinación, o que la protección falle por interacciones sinérgicas con otros virus o patógenos. Alternativamente, la estimulación del SAR mediante la aplicación de determinados productos químicos como el AS, INA o BTH da como resultado la resistencia contra una amplia gama de patógenos (Durrant y Dong, 2004; van Loon, 1998). Su aplicación aún no está muy extendida aunque su bajo impacto ambiental, y la prohibición de numerosos tratamientos químicos le proporciona un gran potencial.

8. Virus objeto de este estudio: Virus del moteado de la parietaria (PMoV)

El virus del moteado de la parietaria (*Parietaria mottle virus*, PMoV) pertenece al género *Ilarvirus* (subgrupo 1) de la familia *Bromoviridae* y se caracterizó inicialmente a partir de plantas parietaria (*Parietaria officinalis*) que presentaban síntomas de mosaico o moteado (Caciagli y col., 1989). Posteriormente se detectaron variantes del virus en cultivos de tomate y pimiento que inducían síntomas de moteado y necrosis en hojas y lesiones necróticas en fruto imposibilitando su comercialización (Lisa y col., 1998; Janssen y col., 2005) (Figura 7). Otros huéspedes a los que se ha podido transmitir el virus mediante inoculación mecánica en condiciones de invernadero son: *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, *N. tabacum* cv. *White Burley*, *N. glutinosa*, *Petunia hybrida*, *Vigna unguiculata* y *Ocimum basilicum* (Janssen y col., 2005; Lisa y col., 1998). Hasta la fecha, el virus ha sido detectado en diversos países de la cuenca Mediterránea como España, Francia, Italia y Grecia (Lisa y col., 1998; Marchoux y col., 1999; Roggero y col., 2000; Aramburu, 2001; Janssen y col., 2005). En España, la primera detección de PMoV se llevó a cabo en el año 2001 en plantaciones de tomate del Nordeste de España, en la comarca del Maresme

(Barcelona), que mostraban síntomas de necrosis en hojas y fruto (Aramburu, 2001). La sintomatología inducida por PMoV es muy similar a la causada por otros virus ampliamente extendidos en la zona como el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt Virus*, TSWV) y el CMV, por lo cual se tuvieron que desarrollar métodos específicos de detección con el fin de establecer estrategias adecuadas de control de este patógeno. Así se pusieron a punto diversos métodos de detección del virus como la técnica ELISA usando anticuerpos específicos y mediante métodos moleculares como la hibridación molecular no radioactiva de tejidos infectados (improntas) y RT-PCR (Galipienso y col., 2005; Aparicio y col., 2009).



Figura 7. Síntomas de necrosis inducidos por el virus del moteado de la parietaria (PMoV) en tomate (panel A) y pimiento (panel B).

A nivel genómico, se ha determinado la secuencia nucleotídica completa de un aislado español de PMoV que infecta tomate (Galipienso y col., 2009). Este consta de un RNA 1 monocistronico de 3514 nucleótidos con un único ORF que codificaría la subunidad de la polimerasa P1 que presenta los dominios MT y NTPasa/helicasa. El RNA 2 tiene un tamaño de 2922 nts y presenta dos ORFs solapantes: El ORF 5'-terminal codifica la subunidad de la polimerasa P2 que contiene el dominio GDD mientras que el ORF 3'-terminal codificaría una proteína similar a la proteína 2b del CMV. El RNA 3 tiene un tamaño de 2272 nucleótidos y contiene dos ORFs, el 5'-terminal codifica la proteína 3a de movimiento o MP y el 3'-terminal la CP. Ambos ORFs se encuentran separados por una IGR de 170 nucleótidos en la que se ha identificado una posible región promotora con estructura en bucle (Galipienso y col., 2008). Curiosamente, la CP del aislado español del PMoV obtenido a partir de tomate (CR8) es 16 aminoácidos más corta que la CP del aislado italiano Pe1 secuenciado en

primer lugar, debido a la delección de una citosina (C) en la posición 1366, que da como resultado un codón de inicio de la proteína diferente (Galipienso y col., 2009). Este cambio se ha detectado en otros aislados españoles de PMoV obtenidos a partir de tomate y supone un cambio de la región promotora que sería diferente a la postulada para el aislado de parietaria (Jaspars, 1999; Galipienso y col., 2008). En las regiones 5' y 3'-NTRs se han predicho estructuras en tallo-bucle que podrían ser elementos reguladores implicados en la activación genómica y la regulación de la síntesis de los RNAs genómicos y sgRNAs (Galipienso y col., 2009).

El PMoV, como el resto de ilarvirus, se transmite a través del polen de plantas infectadas y en el caso de *P. officinalis*, además puede transmitirse mediante semilla (Aramburu y col., 2010). El virus se transmite eficientemente a plantas de *C. quinoa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, tomate y pimiento en presencia de polen de plantas de *P. officinalis* infectadas y de los insectos *Nesidiocoris tenuis*, *Dicyphustamaninii*, *Macrolophus caliginosus*, *Oriusmajusculus*, *Bemisia tabaci*, *Myzuspersicae* y *Frankliniella occidentalis*. De este modo, se ha propuesto que el PMoV se transmitiría en campo mayoritariamente desde polen de plantas de *P. officinalis* infectadas, las cuales servirían como reservorios virales, a través de insectos que transportarían el polen infectado en el estilete y/o adherido a su cuerpo, tratándose por tanto de una transmisión no persistente (Aramburu y col., 2010).

Justificación y objetivos

Las enfermedades producidas por virus causan importantes pérdidas económicas en las principales zonas productoras del mundo. Las estrategias empleadas para minimizar dichas pérdidas se basan en el cultivo de plantas libres de virus, el uso de variedades resistentes (obtenidas mediante mejora genética o mediante herramientas biotecnológicas) y el control de los vectores de transmisión, principalmente insectos. Para poder implementar estas estrategias, es necesario profundizar en el conocimiento sobre la variabilidad genética y evolución de las poblaciones virales, sobre todo para poder establecer programas adecuados de búsqueda de fuentes de resistencias que puedan ser incorporadas a variedades comerciales. Por otra parte, también es muy importante incrementar el conocimiento sobre los mecanismos que desencadenan los procesos patológicos una vez han infectado el hospedador.

En esta tesis doctoral hemos trabajado con el virus del moteado de la parietaria (PMoV), un virus que infecta dos cultivos de gran interés agronómico, como el tomate y el pimiento, que fue detectado por primera vez en el Noreste de España en el año 2001. Al inicio de esta Tesis, el conocimiento que se tenía sobre este patógeno era muy escaso. El área de distribución parece ser limitada a algunos países de la cuenca mediterránea como España, Italia y Grecia, aunque la similitud de los síntomas que induce con los del TSWV, ampliamente distribuido por todo el mundo, sugiere que podría estar presente en otros países aunque no haya sido identificado. Tampoco se disponía de datos acerca de su variabilidad genética ni de su estructura poblacional, lo cual es relevante ya que hasta la fecha se carece de resistencias naturales contra este virus. Finalmente, no se conocía si existían diferentes patotipos virales ni los mecanismos que intervienen en la interacción con el hospedador que pudiesen estar relacionados con la manifestación patológica de la enfermedad.

Por tanto, el objetivo general de este trabajo ha sido ampliar los conocimientos sobre algunos aspectos epidemiológicos y profundizar en el estudio de los mecanismos de interacción con el hospedador que podrían intervenir en el desarrollo de la enfermedad. Como hemos mencionado antes, esta información es muy importante para poder establecer estrategias que permitan controlar y minimizar las pérdidas producidas por este patógeno. De manera concreta, en el Capítulo 1 de esta tesis hemos realizado un estudio sobre la estructura poblacional de PMoV y sobre su variabilidad genética. También hemos estudiado los procesos y fuerzas que intervienen en la evolución del virus. En el Capítulo 2 hemos estudiado el comportamiento biológico de dos aislados (CR8 y T32) diferentes desde el punto de vista filogenético, a pesar de que ambos

fueron aislados originariamente de plantas de tomate. Hemos obtenido la secuencia completa del genoma del aislado T32 intentando buscar cambios que pudieran estar relacionados con las diferencias biológicas encontradas. En los dos siguientes capítulos nos hemos centrado en los mecanismos que pueden intervenir en el desarrollo y manifestación patológica de la enfermedad: En el Capítulo 3 hemos estudiado el movimiento intercelular del PMoV, identificando regiones y aminoácidos de la proteína 3a (MP) del PMoV implicadas en este proceso y finalmente en el Capítulo 4 hemos estudiado el papel que juegan algunas proteínas del virus (CP, 3a y 2b) en la inducción de síntomas empleando plantas de *N. benthamiana* como modelo de estudio.

En resumen, en esta tesis doctoral se presentan los siguientes capítulos:

- 1- Variabilidad Genética y evolución del virus del moteado de la parietaria: selección natural e intercambio genético entre aislados.
- 2- Caracterización biológica y molecular del aislado italiano T-32 del virus del moteado de la parietaria obtenido a partir de plantas de tomate.
- 3-Identificación de dos regiones hidrofílicas en la proteína 3a del virus del moteado de la parietaria con capacidad de unión al RNA y que intervienen en el transporte del virus entre células a corta distancia (célula a célula).
- 4-Implicación de la proteína de movimiento (MP), cubierta (CP) y 2b del virus del moteado de la parietaria en la inducción de síntomas y en la supresión de silenciamiento génico.

Capítulo 1

Variabilidad genética y evolución del virus del moteado de la parietaria: selección natural e intercambio genético entre aislados

Este capítulo de la tesis ha dado lugar a la siguiente publicación:

Galipienso L, Martínez C, Willemsen A, Alfaro-Fernández A, Font-San Ambrosio I, Davino S, Rubio L (2015). Genetic variability and evolutionary analysis of arietaria mottle virus: role of selection and genetic exchange. *Archives of Virology* 160, 2611-261.

1.1. Introducción

El virus del moteado de la parietaria (PMoV) fue inicialmente purificado y caracterizado parcialmente a partir de plantas de *P. officinales* que mostraban síntomas de moteado foliar (Caciagli y col., 1989). Sin embargo, posteriormente se detectaron aislados que producían daños en dos cultivos importantes, el tomate y pimiento (Lisa y col. 1998; Janssen y col., 2005). La información que disponemos sobre la distribución geográfica, incidencia, diversidad biológica y genética de PMoV es muy limitada. El virus parece estar restringido a unos pocos países de la cuenca mediterránea como Italia, Francia, Grecia y España (Caciagli y col., 1989; Marchoux y col., 1999; Roggero y col., 2000 Aramburu, 2001). En España, la primera detección de PMoV se llevó a cabo en el año 2001 en plantaciones de tomate del Nordeste de España, en la comarca del Maresme (Barcelona), las cuales mostraban síntomas de necrosis en hojas y frutos (Aramburu, 2001), muy similares a los inducidos por otros virus ampliamente extendidos en la zona como el TSWV, el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) y el virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV). Posteriormente, el virus se detectó en otras regiones como Andalucía, la Comunidad Valenciana, Islas Baleares, Murcia y País Vasco. La similitud de síntomas que producen estos aislados de PMoV con los síntomas inducidos por otros virus muy extendidos como los mencionados anteriormente, hace posible que la incidencia y la distribución geográfica de PMoV sea mayor a la conocida hasta el momento.

Para la puesta a punto de métodos de detección específicos y sensibles basados en técnicas moleculares como la PCR y para buscar fuentes de resistencias naturales que permitan controlar la enfermedad, es muy importante disponer de información sobre la diversidad genética de los virus y de los mecanismos implicados en su evolución. Los virus con genomas de RNA tienen gran potencial para generar variación genética y evolucionar debido a su elevada tasa de replicación y de mutación (10^{-3} a 10^{-5} cambios por posición nucleotídica y ciclo de replicación), causada por la ausencia de actividad de corrección de lectura de las RNA polimerasas (Drake y Holland, 1999). Otra fuente de variación genética es la recombinación genética o reordenamiento de segmentos genómicos en el caso de virus con genomas multipartitos como es el PMoV (Nagy, 2008). Sin embargo, existen diversas fuerzas que limitan la diversidad genética

generada por los procesos anteriormente mencionadas. Estas fuerzas son la selección natural, la deriva genética y el flujo genético entre poblaciones (Moya y col., 2004).

En este capítulo de la tesis hemos estudiado la diversidad genética y la estructura poblacional de PMoV así como las fuerzas implicadas en la evolución del virus mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas completas de los genes que codifican para la proteína 2b (RNA 2) y la CP (RNA 3).

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Aislados virales

En este trabajo se han empleado 24 aislados de campo recolectados en distintos países donde el virus ha sido detectado (España, Italia y Grecia) y procedentes de diferentes huéspedes (tomate, pimiento y parietaria) (Tabla 1.1). La mayor parte de aislados fueron recolectados en España (Almería, Barcelona, Gerona, Islas Baleares, Guipúzcoa, Tarragona, Valencia y Vizcaya) en distintos años y hospedadores. El aislado griego (GrT-1) se obtuvo a partir de una planta de tomate infectada recolectada en el año 2010 (amablemente cedido por la Dra. C. Varvery del BPI de Atenas, Grecia) y los dos aislados de Italia se recolectaron en parcelas de tomate de Sicilia (ST-1) y Torino (T32) (amablemente cedido por el Dr. A.M. Varia del IVV-CNR de Turín, Italia) en los años 2006 y 1979, respectivamente. Para los análisis genéticos se incluyeron las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes 2b y CP del aislado español CR8 (FJ858203 y FJ858204) y del aislado italiano Pe1 (AY496069 y U35145) que estaban disponibles en el GenBank (Ge y Scott, 1996; Scott y col., 2006; Galipienso y col., 2009).

Aislado viral	Hospedador	Origen geográfico	Año de recolección	2b (n° acceso GenBank)	CP (n° acceso GenBank)
TT-1	Tomate	Tarragona, España	2007	KP234324	KP234332
TT-2	Tomate	Tarragona, España	2007	KP234309	KP234333
TT-3	Tomate	Tarragona, España	2007	KP234310	KP234334
TT-4	Tomate	Tarragona, España	2007	KP234318	KP234342
TT-5	Tomate	Tarragona, España	2012	KP234322	KP234346
BT-1	Tomate	Barcelona, España	2007	KP234306	KP234330
CR8*	Tomate	Barcelona, España	2002	FJ858203	FJ858204
BP-1	Pimiento	Barcelona, España	2007	KP234305	KP234329
BT-2	Tomate	Barcelona, España	2012	KP234323	KP234347
BPar-1	Parietaria	Barcelona, España	2008	KP234313	KP234337
BPar-2	Parietaria	Barcelona, España	2008	KP234314	KP234338
BPar-3	Parietaria	Barcelona, España	2008	KP234315	KP234339
AP-1	Pimiento	Almeria, España	2007	KP234302	KP234326
AP-2	Pimiento	Almeria, España	2008	KP234303	KP234327
AP-3	Pimiento	Almeria, España	2004	KP234304	KP234328
GT-1	Tomate	Gerona, España	2007	KP234307	KP234331
GT-2	Tomate	Gerona, España	2012	KP234308	KP234348
VT-1	Tomate	Valencia, España	2005	KP234311	KP234335
VT-2	Tomate	Valencia, España	2010	KP234312	KP234336
GuiT-1	Tomate	Guipúzcoa, España	2011	KP234316	KP234340
ViT-1	Tomate	Vizcaya, España	2011	KP234317	KP234341
BaT-1	Tomate	Baleares, España	2012	KP234319	KP234343
GrT-1	Tomate	Grecia	2010	KP234320	KP234344
ST-1	Tomate	Sicilia, Italia	2006	KP234325	KP234349
T32	Tomate	Turín, Italia	1979	KP234321	KP234345
Pe1*	Parietaria	Italia	1989	AY496069	U35145

. * Aislados cuyas secuencia fueron obtenidas del GenBank

Tabla 1.1: Aislados del virus del moteado de la parietaria (PMoV) utilizados en este estudio

1.2.2. Extracción de RNAs virales, amplificación por RT-PCR y obtención de secuencias nucleotídicas

Los RNA virales se extrajeron empleando el reactivo comercial TRIZOL (Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogeneizaron aproximadamente 50 mg de material vegetal infectado con 0.5 ml de TRIZOL. El homogeneizado se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 min a 4° C y la fase acuosa se recogió y se le añadió 0.1 ml de cloroformo. A continuación, la fase acuosa se separó por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 min y el RNA se precipitó con 125 µl de isopropanol y 125 µl de 1,2 M NaCl. Tras una centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 min a 4° C, y lavado con etanol al 75 %, el RNA se resuspendió en 50 µl de H₂O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Los purificados de ácidos nucleico se guardaron a -80°C hasta su uso.

Los cDNAs correspondientes a la secuencias completas de los genes 2b y CP de PMoV se obtuvieron mediante una reacción de retrotranscripción empleando la transcriptasa reversa Superscript II (Life Technologies, USA) y 10 pmol de los cebadores específicos PMoV-CP Rv y PMoV-2b Rv (Tabla 1.2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 2 μ l del extracto en un volumen final de 20 μ l de la mezcla de reacción que contenía la Superscript II y se incubó a 42° C durante 50 min. A continuación el enzima se inactivó mediante desnaturalización a 65° C durante 5 min. La reacción de PCR se llevó a cabo con 5 μ l de cDNA en 50 μ l de reacción con la enzima Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, USA) y 50 pmol de las parejas de cebadores PMoV-CP For y PMoV-CP Rev para amplificar la CP y PMoV-2b For y PMoV-2b Rev para amplificar 2b. Los cebadores empleados se detallan en la Tabla 1.2 y fueron diseñados en base a la secuencia de CR8 publicada en el GenBank. La mezcla de reacción de PCR se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se sometió a las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización de 4 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, anillamiento de cebadores a 55° C durante 40 s y de síntesis de DNA a 72° C durante 1 min y para acabar una extensión final de cadenas de DNA a 72° C durante 7 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH: 8.0) y se visualizaron mediante tinción en bromuro de etidio. Los amplicones de tamaño esperado (618 p.b. y 612 p.b. para 2b y CP, respectivamente) se purificaron empleando el kit comercial UltraClean® PCR Clean-Up kit (Mo-Bio, USA) y se secuenciaron con un ABI 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV-CSIC). Las secuencias consenso de los genes 2b y CP de los diferentes aislados se depositaron en el GenBank con las accesiones KP23302-KP234325 para las secuencias de 2b y KP2343026-KP234349 para las secuencias de la CP (Tabla 1.1).

Cebador	Secuencia	Posición*
PMoV-2b For	5'-GTTCTAAAGCTTGTATTCGAA-3'	2.157-2.177
PMoV-2b Rev	5'-CCTCTCAAAGAGGCATCACAAC-3'	2.799-2.820
PMoV-CP For	5'-AGTCGCTTTTTGGAAATTAC-3'	1.281-1.300
PMoV-CP Rev	5'-GAACCGTCGGTAACAACCAT-3'	1.988-1.969

*Posición con respecto a la secuencia del RNA 2 y el RNA 3 del aislado CR8 (FJ858203 y FJ858204)

Tabla 1. 2: Cebadores usados para amplificar los genes de 2b y CP de los diferentes aislados del virus del moteado de la parietaria (PMoV).

1.2.3. Análisis de secuencias genéticas

Las secuencias nucleotídicas se alinearon mediante el algoritmo CLUSTAL W (Larkin y col., 2007) y MUSCLE implementado en el programa MEGA v.6.0 (Tamura y col., 2013). El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestro análisis fue el de Kimura 2-parámetros (K2P) (Kimura, 1980). Este modelo se utilizó para calcular las distancias nucleotídicas entre aislados y para inferir los árboles filogenéticos que se obtuvieron usando los métodos de Máxima Verisimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) y del vecino más próximo (*Neighbour Joining*, NJ) con 1.000 réplicas de *bootstrap* (Saitou y Nei, 1987) implementados en el programa MEGA v.6.0. Los análisis filogenéticos Bayesianos se realizaron con el programa BEAST v.1.8.2 (Drummond y Rambaut, 2007) siguiendo el modelo GTR + I4 + I. Los cálculos se hicieron usando un modelo de reloj exponencial no correlacionado relajado con una distribución exponencial. Se comprobó que esta combinación era el modelo más plausible calculando el factor de Bayes ($K = P(D|M1)/P(D|M2)$) en el que $P(D|Mx)$ es la probabilidad posterior de un modelo (x) según los datos (D). Se completaron dos algoritmos independientes (*Markov chain Monte Carlo*, MCMC) con una longitud de cadena de 10^8 muestras cada 1.000 árboles como establecen los parámetros de convergencia. Los árboles filogenéticos se combinaron en un único árbol empleando los programas LOGCOMBINER y TREEANNOTATOR v.1.8.2 implementados en el programa BEAST descartando el primer 10% de árboles. En todos los casos, los árboles

filogenéticos se enraizaron con las secuencias nucleotídicas de 2b y CP del TSV (Subgrupo I del género *Illarvirus*) (Accesiones del GenBank JX463338 y JX463339).

El papel de la selección natural en la evolución de PMoV se evaluó *i)* determinando la media de cambios no sinónimos por posición no sinónima (N) y la de cambios sinónimos por posición sinónima (S) mediante el método de Pamilo-Bianchi-Li (Pamilo y Bianchi, 1993) y *ii)* estimando la media de cambios no sinónimos por posición no sinónima (N) y la de cambios sinónimos por posición sinónima (S) en cada posición mediante el método FUBAR (Murrell y col., 2013) disponible en la página web Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (Pond y Frost, 2005).

El intercambio genético entre aislados virales (recombinación o reordenamiento de segmentos genómicos) como fuente de variabilidad en PMoV se analizó empleando el programa GARD (Pond y col., 2006) y RDP4 que contenía los algoritmos GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, SISCAN, 3SEQ, LARD, and RDP (Martin y col., 2015). Previamente, se concatenaron las secuencias de los diferentes aislados de PMoV y se alinearon mediante el algoritmo CLUSTAL W (Larkin y col., 2007) implementado en el programa MEGA v.6.0 (Tamura y col., 2013). De una manera conservadora, solo se consideró aquellos eventos de intercambio genético que resultaron estadísticamente significativos con cuatro o más de los algoritmos mencionados.

1.3. Resultados y discusión

Los árboles filogenéticos generados a partir de las secuencias de 2b y CP de los diferentes aislados de PMoV con los métodos ML, NJ y análisis Bayesiana mostraban una topología muy similar, por lo que en la Figura 1.1 solo se muestran los árboles obtenidos con el análisis Bayesiano. Para ambos genes, CP y 2b, los aislados de PMoV se agrupaban en diferentes clados con un soporte estadístico alto (probabilidad posterior ≥ 0.80): uno de los clados (clado I) se componía de aislados italianos y los tres restantes (clados II-IV) agrupaban a los aislados españoles. El aislado griego GrT-1 utilizado en este estudio se incluía en el clado IV en el árbol filogenético de la CP, mientras que en el árbol filogenético del gen 2b, no se incluía en ninguno de los clados definidos, quedando como un aislado individual. GrT-1 era genéticamente más cercano a los clados que contenían los aislados españoles (distancias nucleotídicas de 0.057 ± 0.009 , 0.051 ± 0.008 y 0.049 ± 0.008 para clados II, III y IV, respectivamente) que para el clado I que contiene aislados italianos (0.123 ± 0.017).

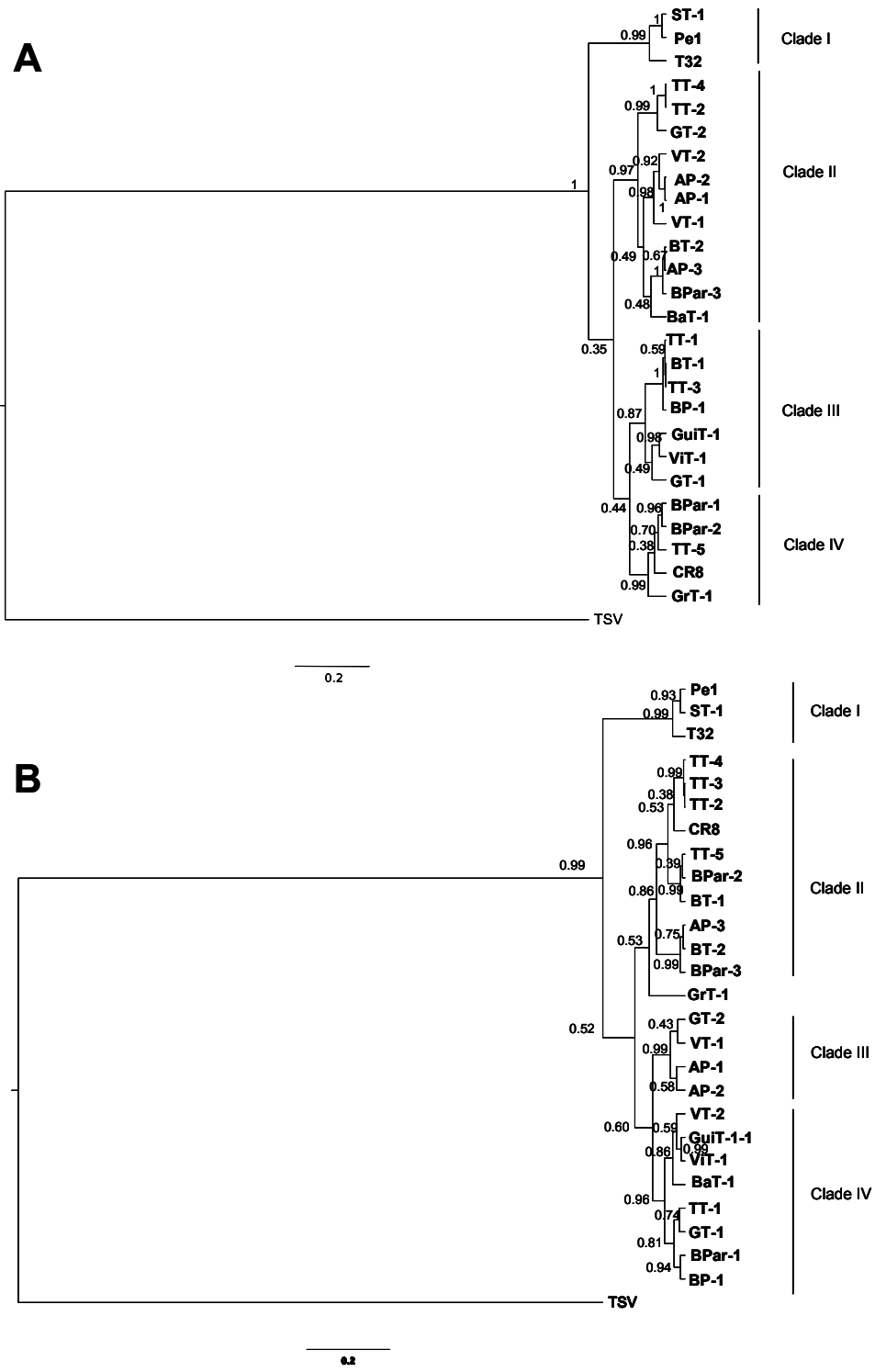


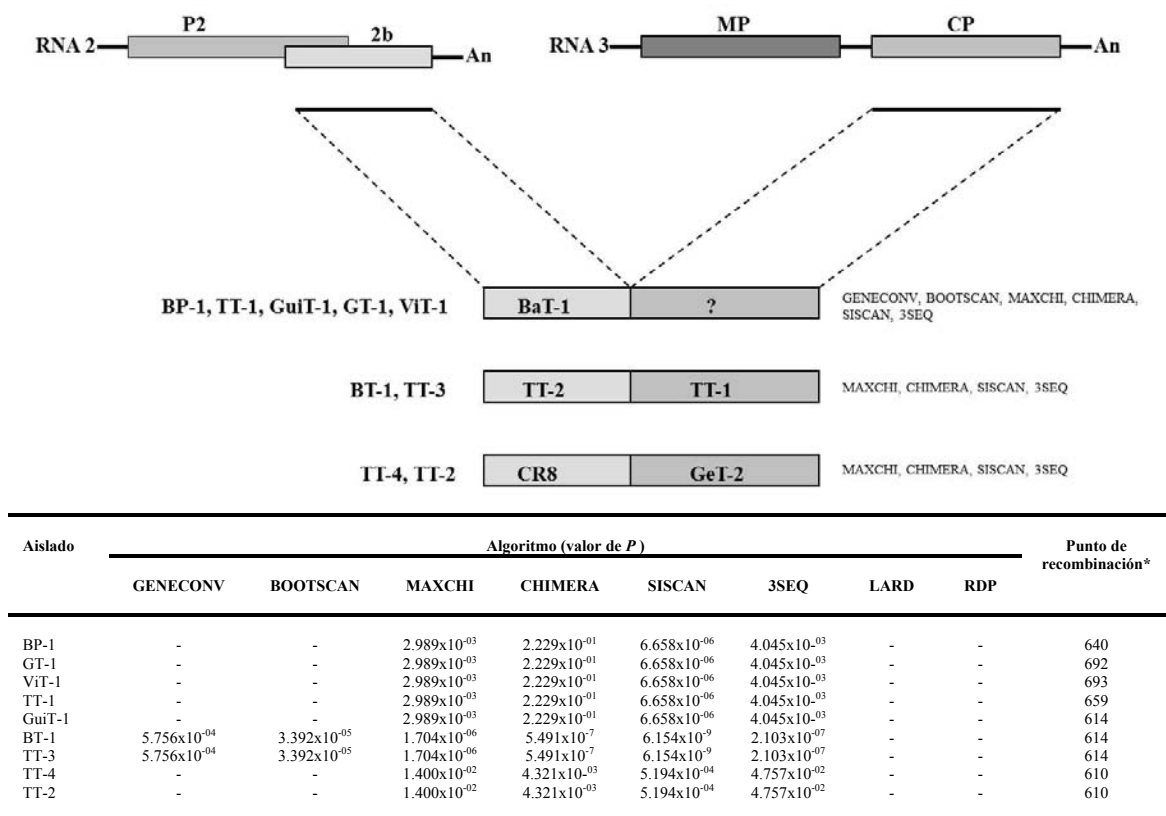
Figura 1.1: Árboles filogenéticos Bayesianos de los genes que codifican para las proteínas CP (panel A) y 2b (panel B) de diferentes aislados del virus del moteado de la parietaria (PMoV). El soporte estadístico de los nodos se indica con valores de probabilidad posterior. Los árboles fueron enraizados con las correspondientes secuencias del virus del estriado del tabaco (TSV) (JX463338 y JX463339).

La diversidad genética de la población de aislados de PMoV fue baja, con valores de 0.063 ± 0.006 y 0.062 ± 0.006 en los genes de la CP y 2b, respectivamente. Estos niveles de diversidad genética están en el rango de la mayor parte de virus que infectan plantas (García-Arenal y col., 2001; Vives y col., 2002). A pesar de que los virus de RNA tienen una tasa de mutación muy elevada, las fuerzas evolutivas, como la selección natural, actúan disminuyendo esta variabilidad notablemente. Dentro del género *Ilarvirus*, la diversidad genética encontrada en PMoV es mayor que la de otros virus con una distribución geográfica más amplia como el virus de los arabescos del ciruelo (*American plum line pattern virus*, APLPV), PNRSV y CVV, mientras que la diversidad genética del PMoV solo es menor que la encontrada en el PDV (Aparicio y col., 1999; Herranz y col., 2008; Barone y col., 2010; Kalinowska y col., 2014). La estructura de la población de PMoV no parece estar correlacionada con el hospedador, puesto que los aislados que infectan tomate y parietaria se localizan en diferentes clados. Los árboles filogenéticos de la CP y de la 2b mostraban incongruencias en la localización de alguno de sus aislados (por ejemplo CR8, BP1, etc.) que podrían ser el resultado de intercambios genéticos entre ellos o que los dos genes están sometidos a diferentes presiones de selección. Para dilucidar esto, se llevaron a cabo estudios sobre el intercambio genético (recombinación o reordenamiento) entre los aislados del PMoV y la presión de selección ejercida en los genes CP y 2b.

El intercambio genético entre organismos aumenta su diversidad genética y adaptabilidad eliminando mutaciones deletéreas (Nagy, 2008). Con el objetivo de estudiar el papel que juega el intercambio genético (recombinación o más probablemente reordenamiento entre segmentos genómicos) en la evolución de PMoV, las secuencias de los genes 2b y CP de cada aislado se concatenaron y se alinearon. Los análisis con los programas GARD (Pond y col., 2006) y RDP4 (Martin y col., 2015) mostraron tres eventos de intercambio genético entre los aislados españoles de PMoV que eran estadísticamente significativos para al menos 4 de los algoritmos contenidos en el programa (Figura 1.2). Uno de ellos correspondía al ancestro de los aislados BP-1, TT-1, GT-1, GuiT-1 y ViT-1, que sería el resultado de un intercambio genético entre la CP de un aislado de origen desconocido y de la 2b de un aislado tipo BaT-1 (GENCONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMERA, SISCAN, 3SEQ). El otro evento de intercambio genético podría haber ocurrido en un ancestro de los aislados BT-1 y TT-3, con la CP de un aislado del tipo TT-1 y la 2b de un aislado del tipo TT-2 (MAXCHI, CHIMERA, SISCAN, 3SEQ). Por último, el tercer evento de intercambio

genético podría haber ocurrido en el ancestro de los aislados TT-2 y TT-4 con la CP de un aislado del tipo GeT-2 y la 2b de un aislado del tipo CR8 (MAXCHI, CHIMERA, SISCAN, 3SEQ). El intercambio genético, producido por fenómenos de recombinación y/o por reordenamientos entre segmentos genómicos en el caso de los virus con genomas segmentados, es una fuente de variabilidad genética común entre los virus de plantas, incluyendo la familia *Bromoviridae* (Lin y col., 2004). Se han encontrado evidencias de reordenamientos en ancestros de APLPV, AMV y PDV así como durante la formación de los géneros *Cucumovirus* y *Bromovirus* (Codoñer y Elena, 2008).

Este fenómeno se produce cuando hay infecciones mixtas con diferentes aislados virales, o incluso con virus de especies diferentes. Este trabajo muestra la primera descripción de eventos de intercambio genético entre aislados de PMoV.



*Posición nucleotídicas en las secuencias concatenadas

Figura 1.2: Eventos de intercambio genético, probablemente debidos a reordenaciones de segmentos genéticos detectados en aislados españoles de virus del moteado de la parietaria (PMoV) por al menos 4 algoritmos del programa RDP4. Se muestran los RNA 2 y RNA 3 de PMoV y los recombinantes o reordenantes, con los aislados parentales en cajas (el signo de interrogación “?” indica que se desconoce el aislado parental). También se muestra una tabla con los eventos de intercambio genético más probables

entre aislados de PMoV y los valores de P inferidos por al menos 4 de los algoritmos de recombinación del programa RDP

El papel de la selección natural en la evolución de PMoV se evaluó i) determinando la media de cambios no sinónimos por posición no sinónima (N) y la de cambios sinónimos por posición sinónima (S) mediante el método de Pamilo-Bianchi-Li (Pamilo y Bianchi, 1993) y ii) estimando la media de cambios no sinónimos por posición no sinónima (N) y la de cambios sinónimos por posición sinónima (S) en cada posición mediante el método FUBAR (Murrell y col., 2013). Los valores del cociente N/S obtenidos con la secuencia de la CP fueron 0.200 y con la secuencia de la 2b fueron de 0.258 lo que indicaba que ambos genes estaban sometidos a una selección negativa o purificadora. Estos valores estaban dentro del rango de los obtenidos para otros virus de plantas (García-Arenal y col., 2001). Los análisis del cociente N/S en posiciones individuales revelaron que en la CP había 3 posiciones bajo selección positiva o diversificadora y 44 bajo presión negativa o purificadora (probabilidad posterior ≥ 0.9). En cuanto a la 2b, se detectó una posición con selección diversificadora y 34 bajo selección purificadora (probabilidad posterior ≥ 0.9). Estos resultados confirmaron que ambas proteínas estaban sometidas a presiones de selección que limitaban su variabilidad, debido a los importantes papeles que debían desempeñar en el ciclo vital de PMoV. La CP está implicada en la encapsidación del virus, y en el caso del PNRSV se sabe que interviene en el proceso de replicación (Aparicio y col., 2003). La proteína 2b actúa como supresor de silenciamiento génico a nivel sistémico en el ilarvirus AV2 (Shimura y col., 2013) mientras que se desconoce su función en PMoV. Un estudio de expresión transitoria de la 2b de PMoV en platas de *N. benthamiana* transgénicas que expresaban la proteína GFP (plantas 16c) mostró que 2b no actuaba como supresor local de silenciamiento (door Peters, 2009). Sin embargo, este trabajo no fue concluyente puesto que no se pudo detectar la proteína 2b *in vivo* por no haber disponible ningún anticuerpo. Por otra parte, ensayos de complementariedad con el vector TCV llevados a cabo en este trabajo de tesis (Capítulo 4) tampoco mostraron que 2b tuviera actividad supresora del silenciamiento.

Algunos aislados de PMoV presentaban CPs de diferentes tamaños: la mayor parte de ellos consistían en 204 aminoácidos excepto los aislados italianos Pe1 y ST-1, que presentaban una CP con 16 aminoácidos adicionales en la parte N-terminal de la

proteína (220 amino ácidos). Esta diferencia de tamaños de CPs entre aislados ya había sido descrita con anterioridad y era consecuencia de la delección de una citosina (C) en la posición 1.366 con respecto a la secuencia de Pe1 y que daba lugar a un codón de inicio diferente (Galipienso y col., 2008). En un principio se sugirió que esto podía deberse a un error en la secuenciación del aislado Pe1 ya que este era el único aislado que no presentaba dicha delección. Sin embargo, la identificación en este trabajo de otro aislado con una CP similar a la de Pe1 (sin la delección de la citosina y con una CP de 220 aminoácidos) apoya la hipótesis de la existencia de aislados con CPs de diferentes tamaños (Ge y Scott, 1996; Scott y col., 2006; Galipienso y col., 2008; Galipienso y col., 2009). Además, los aislados ST-1 y Pe1 (con la CP de 220 aminoácidos) mostraron dos cambios de aminoácidos con respecto al resto en el dominio conservado de unión al RNA rico en argininas (R) e implicado en algunos ilarvirus en el proceso de replicación viral. Uno de estos cambios suponía la sustitución de un residuo básico de arginina (R) por otro polar de serina (S), lo que podría tener efecto en la replicación del virus (Aparicio y col., 2003).

En el trabajo realizado en este capítulo de la tesis mostramos datos de la variabilidad y evolución de PMoV, un virus que infecta y causa daños en dos importantes cultivos, el del tomate y pimiento. Los resultados de los análisis filogenéticos y los realizados con los programas GARD y RDP4 muestran evidencias de intercambios genéticos, probablemente debido a reordenaciones entre segmentos, en varios aislados de PMoV. Por últimos, los estudios de presión de selección han mostrado que los genes que codifican para las proteínas 2b y CP están sometidos a fuertes presiones purificadoras, consecuencia del importante papel que juegan éstas en el ciclo vital del virus.

Capítulo 2

Caracterización biológica y molecular del aislado italiano T-32 del virus del moteado de la parietaria obtenido a partir de plantas de tomate

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

Martínez C, Aramburu J, Rubio L, Galipienso L (2015). Complete genome sequence of a tomato isolate of Parietaria mottle virus from Italy. *Genome Announcements*. (Aceptado el 27 de octubre de 2015)

2.1. Introducción

Los estudios filogenéticos realizados en esta tesis (Capítulo 1) han demostrado que la población de aislados de PMoV se divide en cuatro clados o linajes: el clado I contiene todos los aislados italianos mientras que los clados II, III y IV contiene todos los aislados españoles. El único aislado griego estudiado en este trabajo (GrT-1) está más próximo filogenéticamente a la población española que a la italiana. Por tanto, de los estudios filogenéticos realizados se desprende que la población de aislados españoles no es homogénea y puede dividirse en tres clados diferentes (II, III y IV).

Se han identificado aislados de PMoV españoles e italianos que infectan plantas de paretaria y tomate, aunque hasta el momento solo se han detectado aislados que infectan pimiento en la población española. Por tanto, resulta interesante saber si alguno de los aislados de la población italiana perteneciente al Clado I es capaz de infectar esta especie. Por otra parte, los estudios de variabilidad mostrados en el Capítulo 1 de esta tesis se realizaron estudiando dos zonas concretas del genoma, como son los genes que codifican 2b y CP, y es interesante comprobar si las diferencias genéticas entre ambas poblaciones del virus se extienden a otras zonas del genoma.

El aislado T32 de PMoV fue recogido en 1979 en Turín (Italia) en plantas de tomate con síntomas de necrosis apical (Lisa y col., 1998). Esta enfermedad había sido observada por primera vez en el norte de Italia en 1971 y aunque se desconocía el origen de la misma, se sospechaba que podría estar causada por un virus. Más tarde, Caciagli y col., (1989) purificaron por primera vez el PMoV a partir de plantas de paretaria con síntomas de moteado foliar. Este aislado del virus dio reacción positiva mediante ELISA empleando un antisuero que había sido obtenido previamente a partir de plantas infectadas con el aislado T32, por lo que se determinó que se trataba del mismo virus. Ambos aislados fueron considerados razas diferentes de PMoV, a pesar de que no se disponía de datos de secuencia de ninguno de ellos (Lisa y col., 1998). Por tanto, y según nuestros datos, T32 sería el primer aislado de PMoV descrito. Con posterioridad, PMoV fue detectado en plantaciones de tomate en Francia, Grecia y España (Marchoux y col., 1999; Roggero y col., 2000; Aramburu, 2001). En España, el virus fue detectado en la provincia de Barcelona (Aramburu, 2001) y a partir de una de estas plantas se obtuvo la primera secuencia completa de un aislado de tomate que se denominó CR8 (Galipienso y col., 2009). Anteriormente se había obtenido la secuencia

completa de un aislado italiano del PMoV (Pe1) procedente de plantas de parietaria infectadas (Ge y Scott, 1996; Scott y col., 2006).

En este trabajo hemos estudiado la infectividad y los síntomas inducidos por los dos aislados de tomate T32 y CR8 en algunas especies herbáceas, entre los que se incluye pimiento. Estos dos aislados pertenecen a poblaciones y a clados diferentes, y entre ambos hay una distancia genética de 0.098 ± 0.014 y 0.123 ± 0.017 (muy por encima de la media de distancias genéticas) para los genes de la CP y 2b respectivamente. También se ha obtenido la secuencia de la totalidad del genoma del aislado italiano T32, y se han detectado cambios con respecto a las secuencias publicadas de los aislados CR8 y Pe1 que se discuten a continuación.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Ensayos de infectividad en diferentes plantas hospedadoras

El aislado español CR8 de PMoV se encontraba disponible como un aislado puro en la colección de aislados de nuestro laboratorio en material congelado a -80°C de plantas de *Chenopodium quinoa* (Galipienso y col., 2009). El material infectado con T32 se subcultivó mediante inoculación mecánica en plantas de *C. quinoa*, a partir de 0.5 gr de material vegetal infectado (proporcionado por el Dr. A.M. Varia del IVV-CNR de Turín, Italia) en tampón de inoculación (TI) (0.15 M NaCl, 3 mM de NaH_2PO_4 y 75 mM de Na_2HPO_4 , 0.2% de Mercaptoetanol, 1% de Polivinil Pirrolidona (PVP), pH: 7.2) con el objetivo de multiplicar el virus y eliminar otras infecciones virales. Paralelamente, el aislado CR8 se revivió mediante inoculación mecánica de plantas de *C. quinoa* como se ha descrito anteriormente. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. La observación de síntomas se realizó a los 7 y 14 días post inoculación (d.p.i.).

Para descartar infecciones mixtas, las plantas de *C. quinoa* inoculadas con el aislado T32 se analizaron mediante ELISA tipo “sándwich” (Clark y Adams, 1977) usando anticuerpos específicos (Loewe, Alemania) de los virus más frecuentes que infectan cultivos de tomate en la cuenca del Mediterráneo como el CMV, virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY), ToMV, PepMV y TSWV). Para ello, placas de poliestireno se tapizaron añadiendo 100 μl por pocillo de una dilución apropiada recomendada por el fabricante de inmunoglobulinas (Ig) purificadas en tampón

carbonato (TC) (35mM de NaHCO₃ y 15mM de Na₂HCO₃, pH: 9.6) y se incubaron a 37 °C durante 2-4 h. Posteriormente se realizaron tres lavados con tampón lavador (TL) compuesto por AFT (0.15M de NaCl, 3mM de NaH₂PO₄ y 75mM de Na₂HPO₄, pH: 7.2-7.4) y 0.05% de Tween-20. A continuación se añadió 150 µl por pocillo de extracto de planta triturado con politrón (Kinematica, Suiza), obtenido a partir de 0.1 g de muestra vegetal en 2 ml de tampón de inoculación TI, y se incubó a 37 °C durante 2-4 h. Transcurrido este tiempo, se desechó el extracto viral y se llevaron a cabo tres lavados con TL. Inmediatamente después, las placas se bloquearon añadiendo 150 µl por pocillo de una disolución del 1-2% de leche descremada en polvo en AFT y se incubó a 37 °C durante 15-30 min, transcurridos los cuales se realizaron tres lavados con TL. A continuación a las placas se le añadieron 90 µl por pocillo de una dilución apropiada (recomendada por el fabricante) de Ig conjugadas con fosfatasa alcalina en AFT y éstas se incubaron a 37 °C durante 2-4 h, transcurridos los cuales se volvieron a realizar tres lavados con TL. Para el revelado de las placas, se añadieron 150 µl por pocillo de una disolución de 1 mg/ml de paranitrofenil fosfato en tampón 10% dietanolamina (pH: 9.8) y se incubaron a temperatura ambiente hasta que los pocillos empezaron a tomar coloración amarilla (máximo 2 h). La estimación de la densidad óptica (OD) se llevó a cabo a una longitud de onda de 405 nm mediante un lector de microplacas BioRad 3550 (Bio-Rad, USA). Se consideraron como positivas aquellas muestras cuya lectura media era al menos tres veces superior a la lectura media del control negativo.

Para realizar la caracterización biológica de los aislados CR8 y T32, se inocularon mecánicamente con extractos obtenidos a partir de tejido de *C. quinoa* infectado con cada uno de los aislados 20 plantas de *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *Gomphrena globosa*, *Ch. quinoa*, *L. sculentum* cv. Marmande, *C. annuum* cv. Mito y *N. Xanti*. La inoculación se realizó como se ha descrito anteriormente y las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. La observación de síntomas se realizó a los 7 y 14 d.p.i. Transcurrido este tiempo, las plantas inoculadas con PMoV se analizaron mediante la técnica de ELISA “indirecto” en el que las placas se recubren directamente con el antígeno, utilizando el anticuerpo contra la CP de PMoV (Aparicio y col., 2009). Las diferencias en el número de plantas infectadas inoculadas con ambos aislados se analizaron empleado el test estadístico de X^2 .

2.2.2. Obtención de la secuencia nucleotídica del genoma completo del aislado T32 de PMoV

La secuencia genómica del aislado T32 de PMoV se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito por Galipienso y col., (2009) para la obtención de la secuencia genómica del aislado CR8. Los RNAs virales se purificaron mediante extracción de tejido de plantas de *C. quinoa* infectadas con el aislado T32, utilizando el reactivo TRIZOL (apartado 1.2.2, Capítulo 1) y se desnaturalizaron y poliadenilaron utilizando la polimerasa poli (A) de levadura (USB Biochemicals, USA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, los RNAs virales se reto-transcribieron empleando la transcriptasa reversa Superescript II (1.2.2 Capítulo 1) y 50 pmol del cebador PM-1 (Tabla 1.1) y a partir del cDNA obtenido, se amplificaron mediante PCR las secuencias genómicas virales empleando la mezcla comercial de polimerasas “Expand Long Template PCR” (Roche, Suiza) y una combinación del cebador PM-1 con cebadores diseñados a partir de las secuencias publicadas de los diferentes RNAs del aislado Español CR8 de PMoV (GenBank FJ858202, FJ858203, FJ858204, para el RNA 1, 2 y 3, respectivamente) detallados en la Tabla 2.1, a una concentración de 50 pmol cada uno. Estas combinaciones de cebadores fueron seleccionadas para obtener amplicones con secuencias solapantes en cada uno de los RNAs virales. La mezcla de reacción de PCR se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se sometió a las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización de 4 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, anillamiento de cebadores a 55 °C durante 40 s y de síntesis de DNA a 72 °C durante 2 min y para acabar una extensión final de cadenas de DNA a 72 °C durante 10 min. Para obtener las mitades 5' y 3' de los diferentes RNAs genómicos se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores: en el RNA 1 se utilizaron las combinaciones de cebadores PM-1/PMoV-1R y PM-1/PMoV-1F para las mitades 5' y 3', respectivamente; en el RNA 2 se emplearon las combinaciones PM-1/PMoV-2R, y PM-1/PMoV-2F y finalmente, en el RNA 3 se emplearon las combinaciones PM-1/PMoV-3R y PM1/PMoV-3F. Los productos de PCR con los tamaños esperados (Tabla 2.1), se extrajeron de un gel de agarosa mediante el kit GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se clonaron en el plásmido linearizado pTZ57R/T (Thermo Scientific, USA), mediante ligación con el enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, USA), utilizando una relación de concentración 3:1 (inserto:vector), 5 µl del

tampón 2x tampón de ligación, 3 unidades de T4 DNA ligasa, ajustándose hasta un volumen final de 20 µl con agua estéril. La mezcla de ligación se incubó 1 h a temperatura ambiente y se dejó a 4 °C toda la noche. Posteriormente se guardó a -20 °C hasta su uso. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *Escherichia coli* (cepa DH5'α) mediante electroporación. Para ello, se mezcló 50 µl de células electrocompetentes con 3 µl de la mezcla de ligación. La mezcla se sometió a un choque eléctrico de 1.8 kV/cm² durante 5 milis en cubetas de electroporación con una distancia entre los electrodos de 0.1 cm. Las células se recuperaron en 500 µl de medio LB líquido (1% triptona, 0,5% extracto de levadura y 1% NaCl) en agitación a 200 r.p.m. y 37° C durante 1 h. Pasado este tiempo, el cultivo celular fue centrifugado a 3.000 r.p.m. durante 3 min, desechándose unos 400 µl de sobrenadante. A continuación, las células se resuspendieron en aproximadamente 100 µl del medio y se sembraron en una placa Petri con LB sólido suplementado con 50 µg/ml de ampicilina y 1mM de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) para seleccionar las colonias crecidas a partir de células transformadas con el plásmido conteniendo el inserto (colonias blancas). Las placas se incubaron a 37° C durante unas 12 h y se subcultivaron 10 colonias blancas individualmente en 5 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico mencionado y se incubaron en agitación a 200 r.p.m. durante 12 h a 37° C. Los plásmidos (10 por cada amplicón) se purificaron a partir de las células de *E. coli* con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron con un ABI 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV-CSIC).

Cebador	Secuencia	Tamaño pb	Posición	Región
PM-1	5'-CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGC(dT)17V-3'			
PMoV-1R	5'-TCGTTATCAAAGCTCGGTCC-3'	1925	1893 – 1874 ^a	RNA 1
PMoV-1F	5'-TGAGATCCGAGCGTTCTTTGG-3'	1896	1640 – 1660 ^a	RNA 1
PMoV-2R	5'-CAATGAGACACAAAGGTCTTC-3'	1817	1795 – 1775 ^b	RNA 2
PMoV-2F	5'-GAGTCATATACGAGATAGAG-3'	1335	1564 - 1583 ^b	RNA 2
PMoV-3R	5'-GAACGCAATGCGTTTCGC-3'	1905	1887 – 1873 ^c	RNA 3
PMoV-3F	5'-TTAGAGGTAGAATGTTTCG-3'	1782	530 – 513 ^c	RNA 3

a, b y c, indicial la posición nucleotídica con respecto a la secuencias del aislado CR8 del virus del moteado de la parietaria (CR8) publicadas en el GenBank con número de acceso FJ858202, FJ858203 y FJ858204, para los RNA 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2.1: Cebadores utilizados para la obtención de las secuencias completas del aislado T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) en la que se indica el tamaño de los amplicones obtenidos con la combinación del cebador PM-1 y el resto de cebadores. V representa los nucleótidos A, C o G.

2.2.3. Análisis de secuencias

Las secuencias de nucleótidos se analizaron con el programa BIOEDIT para editar y traducir secuencias y CLUSTAL W (Larkin y col., 2007) para alinear secuencias. Las secuencias completas de los tres segmentos del RNA genómico del aislado T32 de PMoV se depositaron en el GenBank con los números de acceso KT005243, KT005244 y KT005245 para los RNAs 1, 2 y 3, respectivamente. Estas secuencias se compararon con la del genoma del aislado español CR8 (GenBank FJ858202, FJ858203, FJ858204, para el RNA 1, 2 y 3, respectivamente) y con las del aislado italiano Pe1 (GenBank AY496068, AY496069 y U35145 para el RNA 1, 2 y 3, respectivamente).

Las identidades y similitudes de nucleótidos y aminoácidos se estimaron con el programa DOTPLOT (matriz de similitud Blossum 62). La media de cambios no sinónimos por posición no sinónima (N) y la de cambios sinónimos por posición sinónima (S) en cada ORF se calculó con el método de Pamilo-Bianchi-Li (Pamilo y Bianchi, 1993) implementado en el programa MEGA v. 6.0 (Tamura y col., 2013). Las estructuras secundarias de RNA se predijeron usando el programa MFOLD (Zuker, 2003).

2.3. Resultados

2.3.1. Ensayos de infectividad y rango de plantas hospedadoras

El ensayo realizado mediante la técnica ELISA “sandwich” del material de *C. quinoa* infectado con el aislado T32 mostro que éste estaba libre de CMV, PVY, ToMV, PepMV y TSWV. Los resultados de la inoculación mecánica y los síntomas inducidos por los aislados CR8 y T32 de PMoV en las plantas de las diferentes especies hortícolas se muestran la Figura 2.1 y en la Tabla 2.2 Ambos aislados de PMoV mostraron diferencias de infectividad y de sintomatología en algunas de las especies hortícolas inoculadas: ambos aislados infectaron sistémicamente plantas de *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *G. globosa* y *C. quinoa* pero solo el aislado CR8 infectó sistémicamente plantas de tomate y pimiento. Los síntomas inducidos por el aislado CR8 en plantas de tomate fueron mosaico foliar y necrosis mientras que en pimiento sólo indujo moteado. Estos síntomas son similares a los observados en campo en plantas de estas especies infectadas con PMoV. Ninguno de los dos aislados infectaron plantas de *N. xanti*, mientras que ambos indujeron fuertes síntomas de moteado y deformaciones en las hojas jóvenes de *N. benthamiana*. En plantas de *N. glutinosa* inoculadas con el aislado CR8 se podían apreciar síntomas de aclaramiento de las nerviaciones, moteado foliar y necrosis mientras que en las plantas inoculadas con T32 solo se apreciaban aclaramientos nerviales y moteado. En las plantas de *C. quinoa*, ambos aislados inducían síntomas de moteado y deformación foliar en las hojas jóvenes, que en el caso de T32 progresaba en necrosis, no apreciable en las plantas inoculadas con CR8. En plantas de *G. globosa* no se apreciaron diferencias de sintomatología entre ambos aislados, que consistían en la formación de un moteado muy disperso ocupando la mayor parte de la superficie de la hoja que con el tiempo evolucionaba formándose pequeñas zonas necróticas en el centro de la mancha clorótica.

La infectividad del aislado CR8 en tomate y pimiento fue baja, con 2 y 5 plantas infectadas de un total de 20, respectivamente. Por otra parte, en el resto de hospedadores herbáceos ensayados, los porcentajes de infectividad variaron mucho según la especie y el aislado, aunque el test estadístico X^2 sólo mostró diferencias significativas en el número de plantas infectadas de *N. glutinosa* y *G. globosa*: el aislado CR8 fue más

infectivo que T32 en *N. glutinosa*, infectando 8 plantas de 20, mientras que el aislado T32 solo infectó 2 plantas y T32 fue más infectivo que CR8 en *G. globosa*, infectando las 20 plantas inoculadas mientras que CR8 infectó 12 plantas. PMoV se detectó por ELISA en todas las plantas que mostraron síntomas de infección y no pudo ser detectado en plantas asintomáticas. No se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas (test X^2) en los valores de absorbancia del ELISA entre las diferentes especies hospedadoras infectadas ni entre los aislados del virus (datos no mostrados).

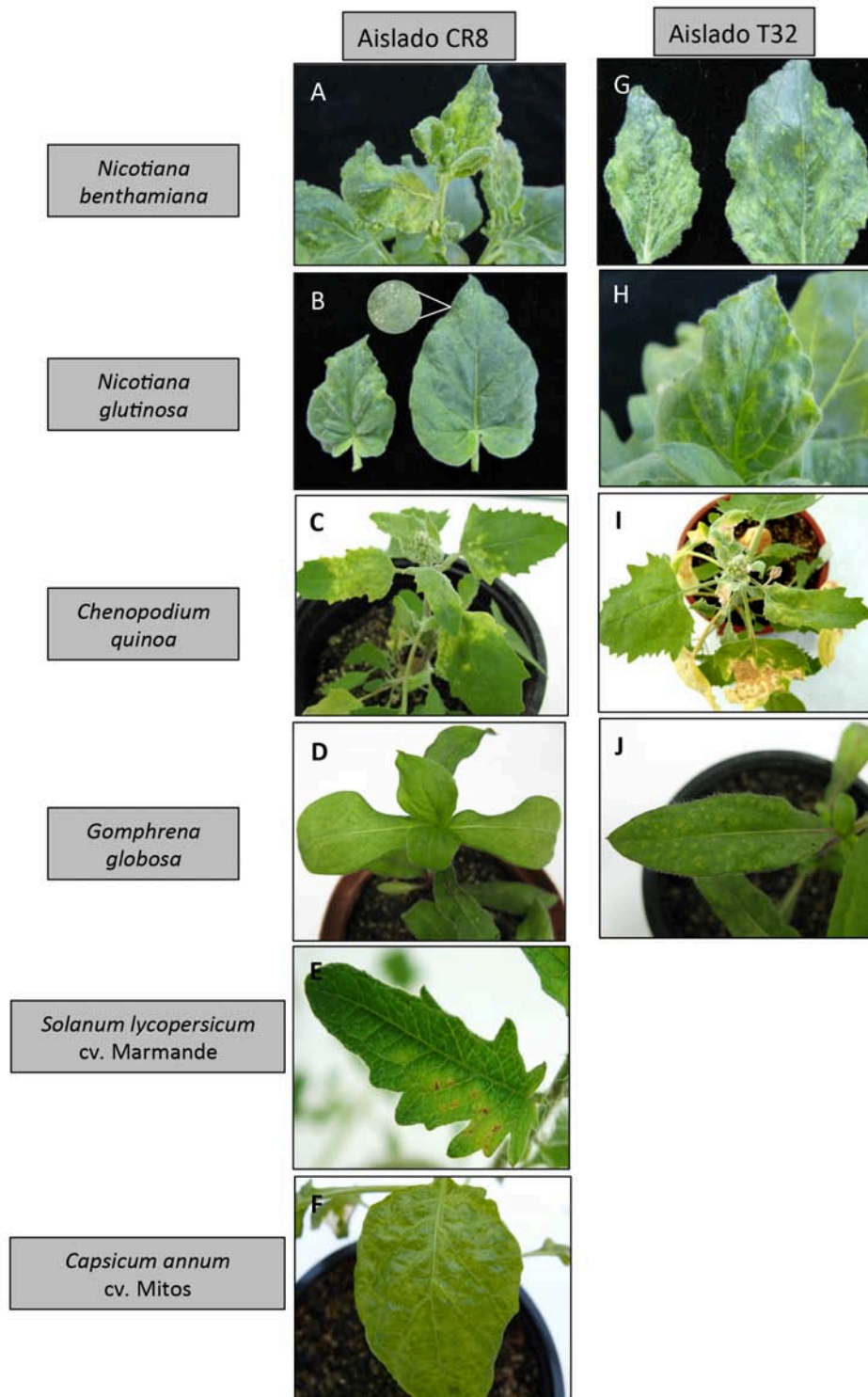


Figura 2.1. Síntomas inducidos por los aislados CR8 y T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) en diferentes especies hospedadoras. Los paneles A y G muestran los síntomas de mosaico y deformación foliar inducidos en plantas de *N. benthamiana* por los aislados CR8 y T32, respectivamente; el panel B muestra los síntomas de mosaico, aclaramiento nervial y necrosis inducidos por el aislado CR8 en plantas de *N. glutinosa* mientras que el panel H muestra los síntomas de mosaico y aclaramiento nervial (no se aprecian lesiones necróticas) en esta especie inducidos por el aislado T32; el panel C muestra los síntomas de mosaico y deformación foliar inducidos por el aislado CR8 en plantas de *C.*

quinoa mientras que el panel I muestra los síntomas descritos anteriormente pero con necrosis inducidos por el aislado T32 en esta especie; los paneles D y J muestran síntomas de mosaico y necrosis inducidos en plantas de *G. globosa* por los aislados CR8 y T32, respectivamente; el panel E muestran los síntomas de mosaico y necrosis en tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Marmande) inducidos por el aislado CR8 y el panel F los síntomas de mosaico inducidos en pimiento (*Capsicum annum* cv. Mitos) por este mismo aislado.

Hospedador	Aislado T32		Aislado CR8	
	PI/PE	S	PI/PE	S
<i>Nicotiana benthamiana</i>	9/29	IS, M, DF	8/20	IS, M, DF
<i>Nicotiana glutinosa</i>	(2/20)*	IS, AN, M	(8/20)*	IS, AN, M, N
<i>Chenopodium quinoa</i>	9/20	IS, M, DF, N	13/20	IS, M, DF
<i>Gonphrena globosa</i>	(20/20)*	IS, M, N	(12/20)*	IS, M, N
<i>Solanum lycopersicum</i> cv Marmande	0/20	-	2/20	IS, M, N
<i>Capsicum annum</i> cv. Mitos	0/20	-	5/20	IS, M
<i>Nicotiana xanti</i>	0/20	-	0/20	-

*Diferencias significativas analizadas mediante el test χ^2

(PI/PE) es el número de plantas infectadas/ número de plantas inoculadas, (S) el tipo de infección y síntomas, (IS) infección sistémica, (M) mosaico, (AN) aclaramiento nervial, (DF) deformación foliar, (A) arrugamiento foliar y (N) necrosis.

Tabla 2.2. Infectividad y síntomas observados en diferentes especies de plantas inoculadas con los aislados CR8 y T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV).

2.3.2. Obtención de la secuencia nucleotídica completa del genoma del aislado T32 de PMoV

A partir de las secuencias solapantes de los diferentes clones, se ensambló la secuencia completa de cada segmento que se depositaron en el GenBank con n° de acceso de KT005243, KT005244 y KT005245 para los RNAs 1, 2 y 3, respectivamente. Estas secuencias se compararon con las de los aislados CR8 (FJ858202, FJ858203, FJ858204 para los RNA 1, 2 y 3 respectivamente) y Pe1 AY496068, AY496069 U35145 para los RNA 1, 2 y 3 respectivamente), disponibles en el GenBank .Los resultados de este trabajo se muestran en la Tabla 2.3 y en la Figura 2.2.

Segmento genómico	Región genómica	Identidad % CR8		Identidad % Pe1		Presión de selección		. N/S
		nt	aa	nt	aa	N	S	
RNA 1	5'-NTR	88.57		100				
	P1	92.34	97.08	96.24	98.09	0.014	0.201	0.069
	3'-NTR	90.81		95.68				
RNA 2		92.63		96.24				
	5'-NTR	100		97.06				
	P2	90.15	93.3	93.34	96.4	0.034	0.266	0.127
	2b	89.97	88.3	98.06	98.54	0.052	0.158	0.329
RNA 3	3'-NTR	92.06		94.44				
		90.48		94.01				
	5'-NTR	93.12		95.55				
	3a	93.65	96.59	94.9	97.95	0.017	0.173	0.098
	IGR	96.47		98.43				
	CP	91.54	93.6	98.21	95.1	0,034	0.150	0.226
	3'-TR	96.38		99.01				
		93.78		96.69				

Tabla 2.3. Identities nucleotídicas (nt) y aminoacídicas (aa) y valores de presión de selección (N, S, N/S) de las diferentes regiones genómicas del aislado T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) con respecto a los aislados CR8 y Pe1 del virus.

A

T32	MDQNSLSPSSSRSGVFPVDINSLNSYIEHVRSDETTNVGRFLGEVALREIKSQVDINNGD	60
CR8	---N-V-----N-----	60
Pe1	---D-L-----Y-----	60
	:*.***	
T32	FQKLVNFGQLTADEKNALKTSFPGLEIAFKDSCQSSHSFAAAHRVCETLDVYKFKNTKTE	120
CR8	-----	120
Pe1	-----	120

T32	KIIDLGGNYVTHAKHGRSNVHSCCPILDVRDGRHTRDRYMSLASAVEKHHKDLPVDFCKK	180
CR8	-----	180
Pe1	-----	180

T32	KFEDCNVQAPYAMAIHSISDIPITTVAKHCVRRGVRKLIATVMMDPAMMIYDSGHIPFLN	240
CR8	-----	240
Pe1	-----	240

T32	VDWEKEDVECDGGVKTLIHFFVDAPGLSYSHDFSVLSQYMITNQVIVGDGYSYRVERTN	300
CR8	-----KT-T-----	300
Pe1	-----KV-P-----	300
	*****.******	
T32	DLNGVFIVEMTLSMTDGI TMNHRPLSDISC A WLTRLRKKV FVKLAVPV SHEWFTESFEI	360
CR8	-----T-----	360
Pe1	-----S-----	360
	*****:*****	
T32	RWALMDES LVRVYSEAAFRQYSKEKNAETVVQYIATMLSSSSNHVVINGITMRSGSPIKN	420
CR8	-----	420
Pe1	-----	420

T32	EEYVPLAVTFYAMAARWYKMI V PGLAAATKANRNIDEYRDK E -KARNSDETLS DVLVDI	479
CR8	-----A-V-----E-M-----	479
Pe1	-----I-V-----E-I-R-----	480
	*****.******:*** **	

```

T32      QKSILPDDDLGFKNFVKLPMIKSVGLRCLKIKGKTLKIRDDTLLQSRSFIRETLREIRA 539
CR8      -----K-----V-----FK----- 539
Pe1      -----E-----I-----IR----- 540
*****:*****:*****:*****

T32      FFGLTLTDSDFNFVEGTPASLKMVWVWKTFFARNLEFPSCLDVSECSYNLMNKHLAQKVEI 599
CR8      -----R--V-----V-----V----- 599
Pe1      -----K--V-----I-----I----- 600
*****:*.*****

T32      EREEKKRKDFLDARDRALITIAKVLEKPDVDPGLPLLDLCEVKDELVAATNSLSLTPQT 659
CR8      ----- 659
Pe1      ----- 660
*****

T32      IDVAADNSTVNPYAESIKEAIIHFNELEVVNTRNLRTLGSYINWRPASTPHTYNSLQGRN 719
CR8      ---T-N-I-----K-----G----- 719
Pe1      ---A-D-T-----K-----S----- 720
****:*.* *****:*****:*****

T32      DSVKVFIPFENKWPNTDRDLQPYERAMTEDGYVSLQWANDGKSFTDQCFASLRRYGAIVV 779
CR8      ET-----R---K-----TD-----R----- 779
Pe1      ES-----R---K-----TN-----Q----- 780
;:*****:*****:*****:*****:*****:*****

T32      DDSCVFNQRLIPALESALKIKPRFSVKIVDGVAGCGKTHLKKISRLDANPDIIVLTSN 839
CR8      ----- 839
Pe1      ----- 840
*****

T32      RSSSDELKEALTCPEAMKYRIRTVDSYLMLKSWFSASRMLFDECFLTHAGCVYAAATLAQ 899
CR8      -----D----- 899
Pe1      -----E----- 900
*****:*****

T32      VSEVIALGDTEQVPPFISRLPEFRMQHHKLLGEIETQTTTYRCPRDATYCLKSMFYKNKSV 959
CR8      -----S----- 959
Pe1      -----S----- 960
*****

T32      KTASVIERSIDLVPISPIQIPCENDVLYITHTRADKDALLKIPGFKKENIKTTHEAQGD 1019
CR8      -S--V--E----- 1019
Pe1      -T--V--D----- 1020
*.*.*.*.*:*****:*****:*****

T32      TWDKVVCFRLSKTTNLLHSGKGPGLPCHNLVAISRHRKSFYRYTVAPNDLDDQLVRCST 1079
CR8      -----Y-----S-----I-----S----- 1079
Pe1      -----C-----S-----L-----G----- 1080
***** *****:*****

T32      LVKTLNSDLDSVRRLKT 1097
CR8      -----K- 1097
Pe1      -----R- 1098
*****:*

```

B

```

T32      MDQIRINLIDLFLSSRLNFNSTFGARHDDYAEWVKLFLFKHVVEHTARFDFATIHTTLEM 60
CR8      -----EY-----N--S--VR---I-----V---R-----V--- 60
Pe1      -----DS-----C--A--VY---M-----I---K-----M--- 60
*****:***** **:*.*. *** *****:*****:*****

T32      VLCRLVPLGNALYPEELFEEDGLSSREIDPFYLPYDDLVDVDTALCRERDESVPITPPE 120
CR8      -----N---D--V-----H---E-V----- 120
Pe1      -----D--E--V-----R--D-I----- 120
*****:*****: * *****:*****:*****

T32      DELSVIVKNTTYMPEGTSWGDVSDSSFQEHLEEIQVPLGSDVGHTIPNEHIPFDDDGQL 180
CR8      -----M--I-----H--I--QIPSD--Q----- 180
Pe1      -----M--I-----G--V--HTIPN--H----- 180
***** **:*.*.*.*.***** **:*.*. .:*.*.*.*

```

```

T32      VDVHWSDAIPSLAPDVTCDADYRECGFVTYSSGSQHTSRWKPKVSQVKPDPSPSIQSAVDE 240
CR8      ---H---V---S-----A-----T-----I-- 240
Pe1      ---Q---I---T-----S-----S-----I-- 240
          ***:***:***.*****:*****:*****:***

T32      LFPHHHSVEDRFFQEWVETHDIDLEVSDCNLDMVFNDSKGTDTLRLVPQMCGGLSHRV 300
CR8      -----K-----R----- 300
Pe1      -----N-----C----- 300
          *****:*****

T32      PTQREALLAIKKRNMNVPELQSQFDHEDVLNRCVNRFLTHVVDKTRLGKLPISGEEVYF 360
CR8      ----- 360
Pe1      ----- 360
          *****

T32      FNQYLENKNPPLSEYKGPVLLALDKYMHMIKTTLKPVEDDSLHIERPVPATITYHKKGV 420
CR8      -----I----- 420
Pe1      -----V----- 420
          *****:*****

T32      VMMTSPYFLCAMVRLLYVLKSKVFIPTGKYHQIFQMDPVRLKNSKFFKEIDFSKFDKSQG 480
CR8      -----F-----I----- 480
Pe1      -----V-----V----- 480
          *****:*****

T32      RLHHDVQLRFLHLGIPQHFVDTWFNAHERSHIRDRDCGIGFSVDYQRRTGDACTYLGNT 540
CR8      -----H----- 540
Pe1      -----L----- 540
          *****

T32      LVTLSVLSYVYDLSKPDILFVAASGDDSLIGSLNPLPRDKEDLCVSLFNLETKFFHNQPF 600
CR8      ----- 600
Pe1      ----- 600
          *****

T32      PCSKFLLVVECDGTEEVLAVPNPLKILQKMGPKNLQVTVLDDYQSLCDILWVFEDADI 660
CR8      L----- 660
Pe1      L----- 660
          *****

T32      CRRVAQLAEYRQFKGKRSCMFLESALLSLPSLVANRLKFIRRTINLEGSKACIRNDAYS 720
CR8      -----K-I-----V-- 720
Pe1      -----R-V-----A-- 720
          *****:*.*****:***

T32      LIACNVSRACGRDATGSDSVNSARESVPTRTPKEWGGSRKRNPGR-AVGREGIREGDRS 779
CR8      -----T-GPT-A--N---KPLA-R-----R-R--I----N 780
Pe1      -----A-DSV-S--S--RTPK-W-----R--V----S 779
          *****:***.***:***.***: * ***** ** *:***.

T32      EFNGTGSHRTGYGRKKPSRKGGFVKH 805
CR8      -H--AD---SGF----- 806
Pe1      -F--TG---TDY----- 805
          *.***:***:*****

```

C

```

T32      MMLIPILLAMSLGLNADVMQPDPISTAPGKVSQPEPPKNGVGRGSATQD-VLLGEKES 59
CR8      --F-----V-P-LH--T-R-N-LLS----N-I--D----R-- 60
Pe1      --L-----I-S-AP--V-Q-E-PKN----S-T-----R-- 59
          **:*****:*. * **.*:* .***** * ** ***:**

T32      VKVTAASSTEQVPIELAMEERSPPGREGSKCIDCAVDYLPEVAFVSVKVPKLNIDFEVKDF 119
CR8      ----T-T--I--D-AL-----K-----Y----- 120
Pe1      ----A-S--V--E-TM-----R-----H----- 119
          *****:***:***:***:*****:*****:*****

T32      PSSKLIFANLAKRIRSIPIFVRSLSVSNLQRMQLKSLGNIDVHIEIPKFGWNQVLKLSDV 179
CR8      -----K-----K-----V--Y----- 180
Pe1      -----R-----R-----I--H----- 179
          *****:*****:*****:***:*****

```


G

3'-NTR RNA 1

```

T32      CCATTTTCGTGTCGCGAGACACGATACCTCCTTAAGGGAGATGATTTTCCACATTGAAAGT 60
CR8      ----G----A--AT-G--T-----TTA-----G-----A--G--- 60
PE1      ----T----A--GT-A--T-----AAG-----T-----A--G--- 60
          ****  ****  *  *  *  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      TGTGATGCCCCATTAGTGGGAAGAACGTTTCGGGTGGCTACTTAAGCGCTTCTATACTTAA 120
CR8      -----CA----- 120
PE1      -----AA----- 120
          ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GTACCGAACGTTGTTCCGTTATTATCTAGTGACAATAACGATGCCTATTTCTATGAAATA 180
CR8      -----T-T-A-----T----- 180
PE1      -----C-C-G-----C----- 180
          ****  ****  *  *  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GAAGC      185
CR8      ----- 185
PE1      ----- 185
          *****

```

3'-NTR RNA 2

```

T32      CCATTTTCGTGTCGCGAGACACGATACCTCCTTAAGGGAGATGATTTTCCACATTGAAAGT 60
CR8      ----G----A--AT-G--T-----TTA-----G-----A--G--- 60
PE1      ----T----A--GT-A--T-----AAG-----T-----A--G--- 60
          ****  ****  *  *  *  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      TGTGATGCCCCATTAGTGGGAAGAACGTTTCGGGTGGCTACTTAAGCGCTTCTATACTTAA 120
CR8      -----CA----- 120
PE1      -----AA----- 120
          ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GTACCGAACGTTGTTCCGTTATTATCTAGTGACAATAACGATGCCTATTTCTATGAAATA 180
CR8      -----T-T-A-----T----- 180
PE1      -----C-C-G-----C----- 180
          ****  ****  *  *  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GAAGC      185
CR8      ----- 185
PE1      ----- 185
          *****

```

3'-NTR RNA 3

```

T32      ATGATGTTACCGACGTTTCAGGCGTCGATGCCAACGTAAAGAGTGATGACTCCTATCAA 60
CR8      ---G-----G-----C-C--T----- 60
Pe1      ---G-----T-----A-G--A----- 60
          ***  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GACGGAGATTATTATTATGATACCGACATGTTCCAGTATGATTATACTGATGATGATGAC 120
CR8      -----C-----A-----T----- 120
Pe1      -----T-----G-----C----- 120
          ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      GGTACAGCCTACATGCAAGATTTCTTCTCGTGTGTAGCTGCCATGAATTTCTAATTGATT 180
CR8      -----T----- 180
Pe1      -----C----- 180
          ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

T32      CATGATGCCTCCTTGTGAGAAGGATGTTTCGGGTGGCTGCTTAAGCGCTTCTATACTTAAAG 240
CR8      -----A----- 240
Pe1      -----G----- 240
          ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****  ****

```

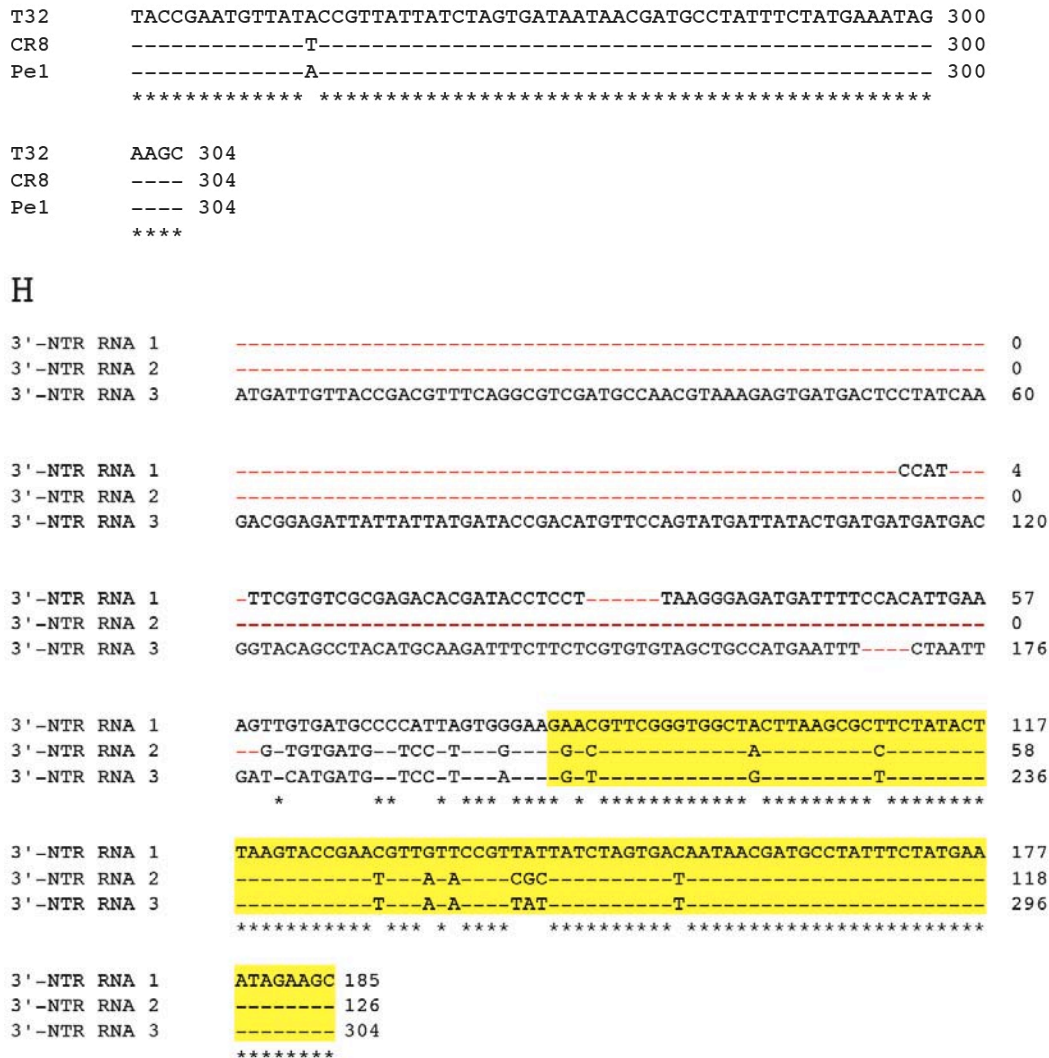


Figura 2.2. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas P1, P2, 2b, MP y CP (paneles A-E, respectivamente), de la región genómica IGR (panel F), y de las regiones 3'-NTRs de los RNAs 1, 2 y 3 de los aislados T32, CR8 y Pe1 (panel G) del virus del moteado de la parietaria (PMoV). En el panel H se muestra el alineamiento de las regiones 3'-NTRs de los RNAs 1, 2 y 3 del aislado T32 de PMoV. Se muestran recuadrados en color amarillo los dominios conservados de las proteínas, el núcleo del promotor del sgRNA 4 en la IGR y los últimos 100 nucleótidos de la región 3'-NTR. Los aminoácidos y/o nucleótidos que no cambian se muestran con un asterisco y los cambios vienen señalados con el nombre del aminoácido o nucleótido y el grado de similitud (en el caso de los aminoácidos) con un punto, dos o ninguno (según la matriz de similitud Blosum 62). Los aminoácidos delecionados se muestran con un guión rojo. El motivo GDD de la P2 se señala con un recuadro morado.

Los resultados de este trabajo se muestran en la Tabla 2.3 y en la Figura 2.2. El RNA 1 del aislado T32 presenta una longitud de 3514 nucleótidos, la misma que la del aislado CR8 y cuatro nucleótidos menos que la del aislado Pe1 (3518 nts). La identidad

nucleotídica fue del 92.63% y 96.24% con respecto al RNA 1 de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. Este RNA contiene un único ORF que codifica para la proteína P1, implicada en la replicación viral, de 1097 aminoácidos, los mismos que la proteína P1 de CR8 y uno menos que la de Pe1. Esta proteína mostró unas identidades aminoacídicas del 97.08% y 98.09% con la proteína P1 de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de P1 de los tres aislados se muestra en el panel A de la Figura 2.2. En el dominio metiltransferasa (aminoácidos 97-270) del aislado T32 se detectaron dos cambios (K253G y T254V) con respecto al aislado CR8 y otros dos con respecto a Pe1 (K253G y P256T). Todos estos cambios correspondían a aminoácidos con diferentes propiedades químicas y no afectaban a los aminoácidos críticos de esta región (Vlot y col., 2002). Por otra parte, en el dominio NTPasa/helicasa (aminoácidos 819-1056) del aislado T32 se observaron siete cambios de aminoácidos con respecto a la proteína P1 de CR8 (D854E, S929L, S961T, V965I, E970D, Y1026C y S1.046P) y tres con respecto a la de Pe1 (S929L, V965I y S1.046P). Las sustituciones de aminoácidos de las posiciones 854, 961, 965 y 970 correspondían a aminoácidos con las mismas propiedades químicas, mientras que los de las posiciones 929, 1026 y 1046, eran sustituciones de residuos con diferentes propiedades químicas. Al igual que sucedía con el dominio metiltransferasa, ninguno de estos cambios afecta a los motivos críticos conservados descritos en especies del grupo de los Alfavirus (Wang y col., 2005). El ORF que codifica la proteína P1 está flanqueado por regiones 5' y 3'-NTRs con unas homologías de secuencia con respecto a los aislados CR8 y Pe1 del 88.57% y 100% en la 5'-NTR, respetivamente y del 90.81% y 95.68 % en la 3'-NTR, respectivamente.

El RNA 2 del aislado T32 tiene una longitud de 2921 nucleótidos, uno menos que el de los aislados CR8 y Pe1, y las identidades nucleotídicas fueron del 90.48% y 94.01% con respecto al RNA 2 de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. Este RNA contiene dos ORFs que se solapan (corrimiento +2 en la pauta de lectura) de tal manera que el localizado en la parte 5'-terminal codifica para la proteína P2 implicada en la replicación viral y el localizado en la parte 3'-terminal codifica para la proteína 2b. El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de P2 de los tres aislados se muestra en el panel B de la figura 2.2 La proteína P2 del aislado T32 presenta un tamaño de 805 aminoácidos, los mismos que la del aislado Pe1 y uno menos que la del aislado CR8 y las identidades aminoacídicas fueron de 93.30% y 96.40% y con respecto a la proteína P2 de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. En la proteína P2 del aislados T32 se

observaron cinco cambios de aminoácidos (I409V, F443V, I459V, H488L y L601P) en el dominio RNA polimerasa (aminoácidos 318-667) con varios residuos altamente conservados, incluyendo el motivo GDD en las posiciones 565-567 (Koonin, 1991). Los cuatro primeros cambios de residuos fueron con respecto a la proteína P2 del aislado CR8 y el último con respecto a CR8 y a Pe1. Únicamente la sustitución en la posición 488 correspondía a un cambio de aminoácido con diferentes propiedades químicas. Adicionalmente, se observaron diversos cambios que implicaban cambios de residuos con las mismas o diferentes propiedades químicas en diferentes pares de la proteína. La proteína 2b del aislado T32, de función desconocida en PMoV, contiene 205 aminoácidos, los mismos que la del aislado Pe1 y uno menos que la del aislado CR8. El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de 2b de los tres aislados se muestra en el panel C de la Figura 2.2. Las diferencias de homologías de la proteína 2b, en la que no se han encontrado dominios funcionales conservados, fue muy grande: La identidad aminoacídica de la proteína 2b de T32 fue del 98.54% con la de Pe1 y del 88.30 % con la de CR8. Se detectaron 25 sustituciones en la proteína 2b de T32 con respecto a la del aislado CR8, 14 de las cuales correspondían a cambios de aminoácidos con iguales propiedades químicas (F3L, V25I, L29A, L39P, S41N, N47S, R57K, I71V, D74E, L77M, K85R, K132R, K140R y V159I) y once a sustituciones de aminoácidos con diferentes propiedades químicas (P27S, H30P, T33V, R35Q, N37E, L40K, I49T, I49T, T65A, T67S y Y62H). Con respecto a Pe1, se detectaron tres sustituciones, dos de las cuales suponían cambios de aminoácidos con diferentes propiedades químicas (T76A y H97Y) y una un cambio por un aminoácido con iguales propiedades químicas (R59K). Los ORFs que codificaban para las proteínas P2 y 2b estaban flanqueado por regiones 5' y 3'-NTRs con unas homologías de secuencia con los aislados CR8 y Pe1 del 100% y 97.06% en la región 5'-NTR, respectivamente y del 92.06% y 94.44% en la región 3'-NTR, respectivamente.

El RNA 3 del aislado T32 tenía un tamaño 2268 nucleótidos de longitud, los mismos que el del aislado Pe1 y cuatro nucleótidos menos el de CR8. Las identidades nucleotídicas fueron del 93.78% y 96.69% con los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. Este RNA contiene dos ORFs no solapantes: El ORF 5'-terminal codifica para la proteína 3a (MP) y el ORF 3'-terminal codifica la CP. Ambos ORFs están separados por una región intergénica no codificante (IGR). El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de P1 de los tres aislados se muestra en el panel D de la Figura 2.2. La MP del aislado T32 tenía 293 aminoácidos, los mismos que la MP del

aislado Pe1 y uno menos que la del aislado CR8, con unas identidades aminoacídicas de 93.65% y 94.90% con las MPs de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. En el posible dominio de unión al RNA de la MP se detectó un cambio de aminoácido en el aislado T32 respecto a la MP del aislado Pe1 (R66K). Curiosamente, el mayor número de cambios de aminoácidos en las MPs de los aislados T32 y CR8 se localizaba en la parte C-terminal de la proteína, con cambios de residuos con las mismas propiedades químicas (A239V, V243I y D291E) y con diferentes propiedades (A189T, P260S, A274T y G290D). Además, en esta región la MP del aislado T32 presentaba la delección de una histidina (H) en la posición 184.

La CP del aislado T32 tenía 204 aminoácidos, los mismos que en los aislados CR8 y 16 menos que la CP del aislado Pe1, como consecuencia de la delección de una citosina (C) que resultaba en un codón de inicio diferente (Galipienso y col., 2009). El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de P1 de los tres aislados se muestra en el panel E de la Figura 2.2. A parte de las diferencias de tamaño, las identidades aminoacídicas de la CP del aislado T32 fueron del 93.60% y de 95.10% con respecto a la CP de los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. La diferencia de tamaño de las CPs ya había sido descrito en otros aislados españoles que infectaban tomate y no afectaba al dominio implicado en el proceso de activación génica (aminoácidos 14-34) (Aparicio y col. 2003; Galipienso y col., 2008). Sin embargo, en este dominio, en la CP del aislado T32 se detectaron cinco cambios de aminoácidos, tres con respecto a la CP de CR8 (L24A, A31T y A32S) dos con respecto a la CP del aislado Pe1 (S16R y V19A) De estos cambios, los de las posiciones 16, 31 y 32 correspondían a aminoácidos con diferentes propiedades químicas.

La MP del aislado T32 estaba flanqueada en su parte N- terminal por una región 5'-NTR, con homologías del 93.12% y 95.55% con los aislados CR8 y Pe1, respectivamente, mientras que en la parte C-terminal estaba flanqueada por la IGR, que tenía un tamaño de 174 nucleótidos, cuatro más que en el aislado CR8 y 47 más que en el aislado Pe1. En esta región del aislado CR8 se predijo una estructura en bucle correspondiente al promotor del sgRNA 4 a partir del cual se sintetiza la CP que es energéticamente más estable que la correspondiente estructura predicha para el aislado Pe1 (Jaspar y col., 1998; Galipienso y col., 2008). En esta zona del promotor no se observó cambios con respecto al aislado CR8 y en toda la IGR solo se detectó un cambio (U111C) (Figura 2.2, panel F). La CP del aislado T32 estaba flanqueada en la parte N- terminal por la región IGR y en la parte C-terminal por una región 3'-NTR

cuyas homologías de secuencia eran del 96.38% y 99.01% con los aislados CR8 y Pe1, respectivamente. Los últimos 100 nucleótidos de la región 3'-NTR de los tres RNAs genómicos del aislado T32 estaban altamente conservados (Figura 2.2, panel G). En la Figura 2. 3 se muestra la predicción de la estructura secundaria de esta región del RNA 3 del aislado T32 en forma de tres tallos, que coincidía con la predicha en la misma región de los RNAs 1 y 2.

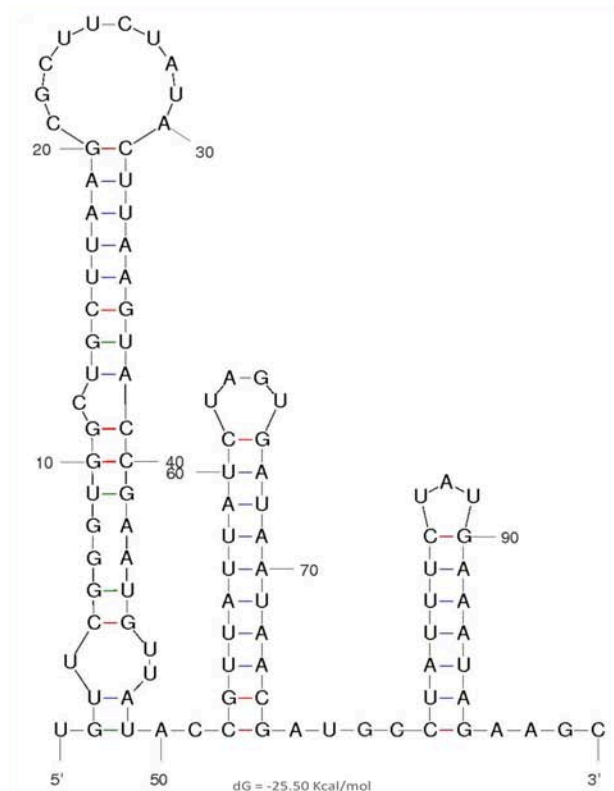


Figura 2.3. Predicción de estructuras en forma de tallo de los últimos 100 nucleótidos del RNA 3 del aislado T32 del virus del moteado de la parietaria (PMoV).

En esta zona conservada, se observaron cuatro cambios nucleotídicos en el RNA 1, tres con respecto al aislado CR8 (A129T, A133G, T153C) y uno con respecto al aislado Pe1 (C131T). En el RNA 2 de T32 se observaron siete cambios nucleotídicos, tres con respecto a los aislados CR8 y Pe1 (T50C, A82G y T83C), tres cambios con respecto al aislado CR8 (T76A, T81C) y C94T) y uno con respecto al aislado Pe1 (A28G). En la zona conservada de la región 3'-NTR del RNA 3 de T32, se observaron solamente dos cambios con respecto al aislado CR8 (A218G, T254A). Ninguno de estos

cambios alteraba las estructuras en forma de tallo predichas en el aislado T32 (datos no mostrados).

Con el objetivo de estudiar la presión que ejerce la selección natural en los diferentes ORFs, se realizó un análisis del cociente N/S de cada uno de los ORFs. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 2.3. Los valores de N fueron de 0.014, 0.034, 0.052, 0.017 y 0,034 y los valores de S fueron 0.201, 0.266, 0.158, 0.173 y 0.150 para los ORFs de la P1, P2, 2b, MP y CP, respectivamente. El cociente de N/S fue siempre menor a 1, con valores de 0.069, 0.127, 0.329, 0.098 y 0.226 para las proteínas P1, P2, 2b, MP y CP, respectivamente.

2.4. Discusión

En este trabajo hemos llevado a cabo la caracterización biológica y molecular del aislado italiano T32 de PMoV, obtenido a partir de plantas de tomate de la localidad italiana de Turín (Italia) con síntomas de necrosis apical (Lisa y col., 1998). Como hemos mencionado anteriormente, este aislado es probablemente la primera variante de PMoV detectada. Los estudios de variabilidad descritos en el Capítulo 1 de esta tesis mostraban que este aislado se agrupaba junto al resto de aislados de la población italiana (Pe1 y ST-1) en un linaje (clado I) separado del resto de aislados de la población española (clados II, III y IV) y del aislado griego (GrT-1), que estaba más próximo filogenéticamente a los aislados españoles que a los aislados italianos.

Los ensayos de infectividad realizados empleando diferentes especies hortícolas, mostraron que el aislado T32 tenía un rango de hospedadores diferente al CR8: *i)* El aislado CR8 infectó plantas de tomate y pimiento mientras que T32 no resultó infectivo en estas especies, *ii)* ambos aislados indujeron diferente sintomatología en plantas de *N. glutinosa* y *C. quinoa* y *iii)* se observaron diferencias significativas en el número de plantas infectadas de *N. glutinosa* y *G. globosa* por ambos aislados. Estos resultados no son atribuibles a diferencias en los títulos virales del material infectado que se utilizó para inocularlas diferentes especies herbáceas, puesto que los valores de ELISA era similar en los inóculos de CR8 y T32. Por otra parte, las diferencias de sintomatología observadas tampoco parece deberse a diferencias de multiplicación entre aislados, pues en todos los caso los valores de ELISA obtenidos de las plantas infectadas eran muy similares y no mostraban diferencias significativas (test X^2). Por tanto, estos resultados sugieren que los aislados T32 y CR8 son biotipos o patotipos diferentes de PMoV. No

se ha podido comparar si el comportamiento biológico del aislado T32 es similar al de los otros aislados del Clado I como Pe1, por no disponer de material infectado con este virus, aunque los resultados de ensayos de infectividad con algunas especies herbáceas realizadas por Lisa y col. (1998) mostraron que los aislados T32 y Pe1 también tenían un rango de hospedadores diferentes. De hecho, estos autores concluyeron que ambos aislados pertenecían a razas diferentes de PMoV, aunque no disponían de ningún dato de secuencias genéticas. Por otra parte, tampoco se ha podido estudiar el comportamiento biológico del aislado ST-1 del clado I, ya que el material del que se disponía no era infectivo. Como hemos mencionado en el Capítulo 1, la estructura poblacional de PMoV no parece que esté relacionada con la especie de donde se aisló el virus. Sin embargo, hasta la fecha solo se han detectado aislados de PMoV infectando pimiento en los aislados españoles, pero la falta de datos y el poco número de aislados de la población de aislados italianos, no permiten obtener conclusiones definitivas. El aislado T32, que pertenece a la población italiana, no resultó ser infectivo en pimiento en nuestros experimentos. Esto podría sugerir que solo los aislados españoles son capaces de infectar pimiento, aunque para confirmar esta hipótesis habría que hacer ensayos de infectividad con más aislados italianos. Curiosamente el aislado T32 no pudo ser transmitido mecánicamente a plantas de tomate, aunque originalmente se aisló de esta planta. El aislado CR8 sí que pudo ser transmitido mecánicamente a plantas de tomate, aunque con una efectividad muy baja (2 plantas infectadas de 20 inoculadas). Esto podría ser debido a que la transmisión mecánica no es la forma natural de transmisión del virus (Aramburu y col., 2010).

Con el objetivo de estudiar a nivel genético las diferencias del aislados T32 con respecto a los aislados CR8 y Pe1, cuyas secuencias están disponibles en el GenBank, se secuenció el genoma completo del aislado T32. Las identidades nucleotídicas de los tres RNAs genómicos fueron mayores con los RNAs del aislado Pe1 que con los del aislado CR8 y variaron entre el 90.48% del RNA 2 del aislado CR8 y 96.69% del RNA 3 del aislado Pe1 (Tabla 2.3). En cuanto a las proteínas virales, las diferencias más grandes se encontraron en la proteína 2b, cuyas identidades aminoacídicas oscilaron entre el 88.30% con la 2b de CR8 y el 98.54% con la de Pe1, lo que correspondía a 25 y tres cambios de residuos, respectivamente. Muchos de estos cambios implicaban sustituciones de aminoácidos con diferentes propiedades químicas que podían originar cambios importantes en la proteína. La proteína 2b desempeña funciones importantes relacionadas con la patogenicidad viral, movimiento y supresión de silenciamiento

génico en otros miembros de la familia *Bromoviridae* como CMV (género *Cucumovirus*) y supresión del silenciamiento génico sistémico en el AV2 (género *Ilarvirus*) (Lewsey y col., 2009; Shimura y col., 2013). Recientemente se han identificado ocho tripletes de aminoácidos en la proteína 2b de CMV indispensables en la inducción de síntomas en *N. clavelandii*, seis de ellas también relacionadas con la actividad VSR (NVE posición 10-12; KKQ posición 22-24; QNR posición 31-33; RER posición 34-36; SPS posición 40-42; LPF posición 55-57) y dos con el movimiento célula a célula (MEL posición 1-3 y RHV posición 70-72) (Nemes y col., 2014). En PMoV aún no se ha dilucidado el papel que puede jugar esta proteína viral aunque los estudios de expresión transitoria (door Peters, 2009) y complementariedad con el vector TCV llevados a cabo en este trabajo de tesis (Capítulo 4) mostraron que no tenía actividad supresora del silenciamiento génico. Por otra parte, los estudios de expresión en plantas de *N. benthamiana* con un vector viral basado en la secuencia de PVX, también realizados en esta tesis (Capítulo 4), mostraron que la proteína 2b podía ser un inductor de síntomas en esta especie hospedadora.

La siguiente proteína menos conservada con respecto al aislado CR8 fue la P2, que tenía una identidad nucleotídica del 93.30%, mientras que la identidad con la P2 del aislado Pe1 fue de 96.40%. Esta proteína tiene el dominio funcional conservado RNA polimerasa en el que se localiza el motivo GDD (Koonin, 1991). El aislado T32 tenía cinco cambios en este dominio, ninguno de los cuales afectaba al motivo GDD. Cuatro de estos cambios eran con respecto a la proteína P2 del aislado CR8 y solo uno con respecto a la del aislado Pe1. Además, salvo uno de los cambios (H488L), el resto implicaba cambios de residuos con las mismas propiedades químicas. Adicionalmente, se observaron diversos cambios que implicaban cambios de residuos con las mismas o diferentes propiedades químicas en diferentes pares de la proteína. Se ha descrito que cambios en el motivo GDD de la proteína P2 de AMV bloquea la síntesis de las cadenas negativas de RNA y suprimía la infectividad del virus. También se ha descrito que dos mutaciones en la P2 de CMV (F631Y y A641S) cerca del motivo GDD, afectaba a los síntomas inducidos por CMV en caupi (*Vigna unguiculata* sp. *Dekindtiana*) y a la acumulación de RNAs virales en protoplastos de esta especie (Kim y Palukaitis, 1997). Algunos estudios empleando reordenantes del RNA 2 han concluido que la especificidad del hospedador en algunos aislados de CMV viene determinada por este aislado (Edwards y col., 1983; Takeshita y col., 1998). Por otra parte, Tao y col (2003) determinaron que los aminoácidos fenilalanina (F) y alanina (A) en las posiciones 631 y

641, respectivamente, del dominio RNA polimerasa de la P2 del aislado CMV-Fny, estaban implicados en la inducción de lesiones necróticas en la plantas infectadas.

La CP del aislado T32 tenía una identidad aminoacídica del 93.60% con respecto a la CP del aislado CR8 y del 95.10% con respecto a la del Pe1. Sin embargo, el tamaño de la CP del aislado T32 era el mismo que el de la del aislado CR8 (204 amino ácidos), pero 16 aminoácidos menor que la CP del aislado Pe1. Esto se producía como consecuencia de la delección de una citosina (C) en la secuencia de los aislados CR8 y T32 que resultaba en un codón de inicio en una posición diferente (Galipienso y col., 2008). Sin embargo, esta diferencia en el tamaño de la CP no afectaba a la región situada entre los aminoácidos 14-34 de la proteína, implicada en el proceso de activación génica (Aparicio y col., 2003). En esta región se observaron tres cambios de aminoácidos (dos que suponían cambios de residuos con diferentes propiedades químicas) con respecto al aislado CR8 y dos cambios de aminoácidos con respecto a Pe1, uno de los cuales (S16R) suponía la ganancia de un aminoácido básico arginina (R), que podría modificar la afinidad de unión de esta proteína al RNA viral y por tanto afectar al proceso de activación génica. Algunos estudios sugieren que el responsable de la interacción de esta proteína con las regiones 3'-NTR de los tres RNAs virales es un único residuo de R en esta región de la CP (Ansel-McKinney y col., 1996; Swanson y col., 1998; Yusibov y Loesch-Fries, 1998). En el PMoV este residuo podría localizarse en la posición 37 en el aislado Pe1 (Pallás y col., 2013) y en la posición 21 en los aislados T32 y CR8, que está conservada. Dentro de la familia *Bromoviridae*, se ha descrito que cambios en la posición 129 de la CP de un aislado de CMV está directamente relacionado con la inducción de fuertes síntomas de clorosis en plantas de *N. tabacum* (Mochizuki y col, 2014). También se ha descrito que mutantes en distintas posiciones de la CP pueden alterar la formación de vesículas en el retículo endoplásmico y a la inducción de síntomas en *N. benthamiana* y *C. quinoa* (Bamunusinghe y col., 2013). Fuera de la familia *Bromoviridae* se ha comprobado que mutaciones puntuales en el gen de la proteína de cubierta del TMV pueden desencadenar una respuesta hipersensible de alguna especie de nicotianas (Culver y col., 1994) o inducir necrosis severa en otras (Banerjee y col., 1995).

La MP del aislado T32 tenía unas identidades aminoacídicas de 93.65% con respecto a la MP del aislado CR8 y del 94.90% con la de los aislados Pe1. Esta proteína mostraba dos dominios conservados de unión al RNA, implicados en el movimiento intercelular del virus, cada uno en un extremo de la proteína (Capítulo 3). En el dominio

N-terminal no se detectó ningún cambio con la MP del aislado CR8 y solo se detectó un cambio (R66K) con respecto a la del aislado Pe1 que afectaba a un aminoácido básico crítico dentro del dominio (R), pero que se substituía por otro aminoácido básico (K), por lo que no debía de implicar cambios funcionales. En el dominio C-terminal no se detectó ningún cambio. Fuera de los dominios funcionales de la proteína también se detectaron cambios de aminoácidos y curiosamente se detectó que gran parte de estos cambios se producían entre los aislados T32 y CR8 y se concentraba en la parte C-terminal de la proteína, incluida la pérdida de un residuo de Histidina (H) en la MP de T32. Se han identificado aminoácidos en las MPs de diferentes virus que están implicados en la modulación de los síntomas, como en la MP de CMV, TGMV) y el Tymovirus TYMV. En CMV, el cambio de un aminoácido serina (S) por una asparagina (N) en la posición 51 de la MP es la responsable de pérdida de la capacidad de inducir síntomas fuertes de mosaico y de falta de crecimiento del aislado CMV-Y en plantas de la especie de calabaza *Lagenaria siceraria* (Takeshita y col., 2001). En TGMV, cambios de aminoácidos en las posiciones 272 y/o 288 de la MP también se han relacionado con la modificación de los síntomas inducidos en *N. benthamiana* y *Petunia hybrida* y con el movimiento a corta distancia entre células vecinas (Saunders y col., 2001). En TYMV, la sustitución de un solo nucleótido en la MP que resultaba en una sustitución de una tirosina (Y) a una histidina (H) daba lugar a un aumento de la gravedad de los síntomas en col china (*Brassica rapa, ssp. chinensis*), también relacionado con una mayor eficacia en el movimiento a corta distancia (Tsai y Dreher, 1993). También se ha comprobado que la MP podría jugar un papel importante en la especificidad del virus a determinados hospedadores. Así, algunas mutaciones puntuales en la MP de BMV son responsables de la adaptación de los virus de plantas a huéspedes no permisivos (Mise y Ahlquist 1995; Fujita y col., 1996; Sasaki y col., 2001). Por el contrario, esto no sucede con la MP del PNRSV en el que la MP es funcional en huéspedes no permisivos para el virus, lo que sugiere que esta proteína no sería determinante en la especificidad de huésped (Sánchez-Navarro y col., 1997).

Finalmente, la proteína más conservada fue la proteína P1 con identidades aminoácidas del 97,08% con respecto a la P1 del aislado CR8 y del 98,09% con la del aislado Pe1. Se detectaron algunos cambios de aminoácidos tanto en los dominios conservados metiltransferasa y NTPasa/helicasa, como fuera de ellos, aunque ninguno de ellos afectaba a los aminoácidos críticos conservados descritos en especies del grupo de los Alfavirus (Wang y col., 2005). Algunos de estos cambios suponían cambios de

aminoácidos con diferentes propiedades químicas y otros correspondían a residuos con las mismas propiedades. Se han descrito cambios de aminoácidos en los dominios funcionales que resultan críticos para la multiplicación viral, como en el AMV donde la mutación individual de algunos residuos conservados reducía la acumulación de las cadenas negativas y positivas de RNA (Vlot y col., 2002). En el BMV, una mutación en el dominio Metiltransferasa disminuía el nivel de acumulación viral (Ahola y col., 2000) y el cambio de una histidina (H) por una alanina (A) en el dominio NTPasa/helicasa bloquea totalmente la replicación del virus (Wang y col., 2005).

Con respecto a las regiones no traducidas, la IGR de los aislados T32 y CR8 presentaba un tamaño diferente a la IGR del aislado Pe1 con regiones promotoras distintas, lo cual podría tener implicaciones biológicas importantes (Jaspars, 1998; Galipienso y col., 2008). En la región promotora de los aislados T32 y CR8 no se observó ningún cambio nucleotídico y sólo se detectó un cambio fuera de dicha región (U111C) el cual no afecta la estructura en bucle del promotor. Los últimos 100 nucleótidos de la región 3'-NTR de los tres RNAs genómicos del aislado T32 presentaron alta homología, como se ha descrito para otros aislados del PMoV (Galipienso y col., 2009). Estas zonas están muy conservadas en otros ilarvirus y al igual que en ellos, se han predicho estructuras en forma de bucle (Figura 2.3), que podrían intervenir en el proceso de activación génica (Ansel-McKinney y Gehrke, 1998; Aparicio y col., 2003). En esta zona se detectaron muy pocos cambios entre los aislados T32, CR8 y Pe1 sin consecuencias estructurales (datos no mostrados).

Por tanto, los resultados presentados aquí muestran que los aislados T32 y CR8 tienen diferencias genéticas y de comportamiento biológico, pudiendo tratarse de razas diferentes de PMoV. Estos dos aislados también muestran diferencias genéticas con el aislado Pe1, que a su vez mostró diferencias de infectividad con el aislado T32 (Lisa y col., 1998) indicando que estos dos aislados también podrían pertenecer a razas diferentes del virus, tal y como sugerían estos autores a pesar de que no disponían de datos de secuencias.

Capítulo 3

**Identificación de dos regiones hidrofílicas
en la proteína 3a del virus del moteado de
la parietaria con capacidad de Unión al
RNA y que intervienen en el transporte del
virus entre células a corta distancia
(movimiento célula a célula)**

Este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

Martínez C, Coll-Bonfill N, Aramburu J, Pallás V, Aparicio F, Galipienso L
(2014). Two basic (hydrophilic) regions in the movement protein of Parietaria
mottle virus have RNA binding activity and are required for cell-to-cell transport.
Virus Research. 184, 54-61.

3.1. Introducción

Los virus codifican en sus genomas unas proteínas que intervienen en el movimiento viral (MPs). Estas proteínas desempeñan un papel central en el proceso de infección ya que permiten a los virus alcanzar las partes más distales de la planta desde el punto de entrada o de inoculación. El virus del moteado de la parietaria (PMoV) pertenece al género *Ilarvirus* de la familia *Bromoviridae*, cuyas MPs se engloban dentro de la superfamilia 30K, un grupo de proteínas relacionadas en secuencia y estructuralmente (Melcher., 2000). Las MPs de esta familia presentan capacidad de unión a ácidos nucleicos, de interactuar con las membranas del retículo endoplásmico (ER) y se localizan en los plasmodesmos (PD), en los que inducen el aumento de su límite de exclusión molecular. El dominio de unión a RNA (RBD) de estas MPs son ricas en amino ácidos básicos cargados positivamente como argininas (R) y lisinas (K), presentan una alta probabilidad de superficie y adoptan estructuras secundarias en α -hélices (Mushegian y Kooning, 1993).

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios para dilucidar el papel de las MPs en el movimiento célula a célula de los virus, algunos pertenecientes a la familia *Bromoviridae* como el AMV (*Alfamovirus*), CMV (*Cucumovirus*), PNRSV (*Ilarvirus*) y BMV (*Bromovirus*). Los resultados de estos estudios mostraron que las MPs presentaban un único RBD, aunque situado en diferentes posiciones de la proteína: en AMV y PNRSV se localizaba en el extremo N-terminal mientras que en BMV y CMV se localizaba en el extremo C-terminal (Schoumacher y col., 1994; Li y Palukaitis, 1996; Fujita y col., 1998; Herranz y Pallás, 2004; Kim y col., 2004). En el género *Ilarvirus*, la MP de PNRSV es la más estudiada y mediante estudios *in vitro* con mutantes de ésta se ha determinado que el RBD se localiza entre los residuos situados en las posiciones 56 y 88 (Herranz y Pallás, 2004; Pallás y col., 2012, 2013). Este dominio es esencial para el movimiento inter e intracelular y contiene una alta proporción de residuos básicos de lisinas (K) y argininas (R) con una estructura secundaria consistente en dos α -hélices (Herranz y Pallás., 2004; Herranz y col., 2005). Por otro lado, estudios de expresión transitoria de la MP fusionada a la GFP mostraron que la MP de PNRSV se acumulaba en PDs (Herranz y col., 2005; Aparicio y col., 2010). Además, se ha demostrado que la región hidrófoba situada entre los residuos 89 a 109 interactúa con la superficie de la membrana del ER y es crítica en el movimiento célula a célula (Martínez-Gil y col., 2009).

Por homología con proteínas de otros ilarvirus, se supuso que la MP de PMoV debería de intervenir en el movimiento de PMoV, aunque no había evidencias experimentales de esta hipótesis. En el presente trabajo, hemos estudiado el papel jugado por la MP en el movimiento del virus. De este modo, se han identificado las regiones con capacidad de unión al RNA y se ha realizado un análisis mutacional de los residuos básicos presentes en éstas con el objetivo de determinar cuales son los aminoácidos fundamentales en la unión al RNA y en el movimiento del virus.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína de movimiento de PMoV

La identificación del hipotético RBD de la MP del PMoV se realizó mediante el programa de análisis de secuencias de proteínas (PSIPRED) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>) (Nugent y Jones, 2012). Este programa predice las estructuras secundarias más probables de una proteína dependiendo de la secuencia aminoacídica. Para la elección de las regiones candidatas a RBD se tuvo en cuenta las características de las proteínas pertenecientes a la superfamilia 30K, las cuales contienen una región hidrofóbica (*hydrophobic region*, HR) precedida de una región rica en aminoácidos básicos (K y R) que adopta una estructura secundaria en forma de α -hélice, que podría participar en la unión al RNA viral (Pallás y col., 2013).

3.2.2. Elaboración de las construcciones derivadas del plásmido quimérico de AMV

Las construcciones R3PMoVwt con las secuencias de la MP de PMoV se obtuvieron a partir del plásmido pGFP/MP/CP que contiene el RNA 3 del AMV y expresa la GFP, de modo que permite la visualización de la infección mediante microscopía de fluorescencia (Sánchez-Navarro y Bol, 2001). En este plásmido se intercambió la MP de AMV por la del PMoV. Para ello, el ORF correspondiente a la MP del PMoV se obtuvo mediante una reacción de retrotranscripción (Capítulo 1) en presencia del cebador antisentido EV-1R (Tabla 3.1) y usando como molde 1.5 μ g de extracto de ácido nucleico total obtenida empleando el reactivo comercial TRIZOL (apartado 1.2.2, Capítulo 1) a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el

aislado CR8 de PMoV (Capítulo 2). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 10 pm de los cebadores EV-1F/EV-1R que contenía las dianas de restricción *NcoI* y *NheI* (Tabla 3.1), respectivamente, siguiendo el protocolo establecido (1.2.2, Capítulo 1). Las condiciones de PCR fueron: una etapa inicial de desnaturalización de 4 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillamiento de cebadores a 58 °C durante 40 s y síntesis de DNA a 72 °C durante 1 min y para acabar una extensión final de cadenas de DNA a 72 °C durante 7 min. El producto PCR correspondiente y el plásmido pGFP/MP/CP se digirieron con los enzimas de restricción *NcoI* y *NheI* (Thermo Scientific, USA) durante 2 h a 37 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante, para liberar la MP del AMV del plásmido. Posteriormente, el plásmido linearizado sin la MP y el fragmento de PCR digerido se purificaron en geles de agarosa mediante el kit GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific, USA) y se ligaron con el enzima T4 ligasa (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (apartado 2.2.2, Capítulo 2). De esta manera se generó la construcción R3MPVwt en la que se había intercambiado la MP del AMV por la del PMoV. Las diferentes construcciones mutantes de la MP del PMoV (R3(ΔR1), R3(ΔR2), R3(ΔR1-2), R3(59,62:A), R3(66,71:A), R3(73,75:A), R3(204,207:A), R3(211,213:A) y R3(204-213:A) se obtuvieron mediante PCR inversa utilizando el plásmido R3PMoVwt como molde, 10 pm de los correspondientes cebadores (Tabla 3.1) y la mezcla comercial de polimerasas termoestables “Expand Long Template PCR” (apartado 2.2.2, Capítulo 2). Las condiciones de la PCR fueron: una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 92 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 10 s, anillamiento de cebadores a 55 °C durante 15 s y de síntesis de DNA a 68 °C durante 4 min y para acabar una extensión final de cadenas de DNA a 68 °C durante 7 min). Los productos de PCR se purificaron (Capítulo 1), se fosforilaron con la enzima T4 Polinucleotido Kinasa (New England BioLabs, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante y finalmente se ligaron como se menciona anteriormente (apartado 2.2.2, Capítulo 2).

Las diferentes construcciones R3PMoVwt se emplearon para transformar células de *E. coli* DH5α mediante electroporación (apartado 2.2.2, Capítulo 2) y las colonias de células transformadas se seleccionaron en placas de LB con ampicilina (50 μg/ml). Los plásmidos correspondientes a las diferentes construcciones se purificaron y se secuenciaron (Capítulo 2).

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIAS DE LOS DOMINIOS DE UNIÓN AL RNA (RBDs)	CEBADORES
MP, His-MPs		EIN-1F 5'- AGTGGATCCATGGCATTGTTCTACGAAGACC-3'
	59-KEAKGV LKSLADKVRGR-75	EIN-1R 5'-ACACCCGGGTCAACTGGAATCACCCGACC-3'
R3MPwt, 35S-MPwt:GFP	202-SDKEMRSL LRSR-213	EV-1F 5'-AAACCATGGCATTGTTCTACGAAG-3'
		EV-1R 5'-ACAGCTAGCACTGGAATCACCCGACCC-3'
R3(ΔR1), 35S-MPΔR1:GFP	59-.....-75	EV- 2F 5'-AGAATGTTCTGTCGATCATG-3'
		EV-2R 5'-GGTTGTCAATTCACAAAGGAAAG-3'
R3(ΔR2), 35S-MPΔR2:GFP	202-.....-213	EV-3F 5'-TCAACAGATATTGCCTCCAAG-3'
		EV-3R 5'-TCGAGTGTGGTCAAAGCAGC-3'
R3(ΔR1-2), 35S-MPΔR1-2:GFP	59-.....-75 202-.....-213	EV-3F 5'-TCAACAGATATTGCCTCCAAG-3'
		EV-3R 5'-TCGAGTGTGGTCAAAGCAGC-3'
R3(59,62:A) 35S-(59,62:A):GFP	59-AEAAGV LKSLADKVRGR-75 202-SDKEMRSL LRSR-213	EV-11F 5'-GCTGCTGGCGTCTTGAAGTCTCTCG-3'
		EV-11R 5'-TTCAGCGGTTGTCAATTCACAAAG-3'
R3(66,71:A), 35S-(66,71:A):GFP	59-KEAKGV LKSLADKVRGR-75 202-SDKEMRSL LRSR-213	EV-12F 5'-GCCGATGCTGTTAGAGGTAGAATGTTCTCGTC-3'
		EV-12R 5'-GAGAGAAGCCAAGACGCCTTTAGCTTCTTTG-3'
R3(73,75:A), 35S-(73,75:A):GFP	59-KEAKGV LKSLADKVRGR-75 202-SDKEMRSL LRSR-213	EV-13F 5'-GGTGCTATGTTCTGTCGATCATGCCG-3'
		EV-13R 5'-AGCAACCTTATCGGCGAGAGACTTC-3'
R3(204,207:A), 35S-(204,207:A):GFP	59-KEAKGV LKSLADKVRGR-75 202-SDAEMASLLRSR-213	EV-14F 5'-ATGGCTAGCTTGTGAGAAGTCGTGCCTC-3'
		EV-14R 5'-TTCAGCATCCGAATGTATCATTGTTCTG-3'

R3(211,213:A), 35S-(211,213:A):GFP	59-KEAKGVLKSLADKVRGR-75 202-SDKEMRSLLASA-213	EV-15F 5'-AGTGCTGCCTCAACAGATATTGCCTCCAAG-3' EV-15R 5'-AGCCAACAAGCTTCGCATTTCTTTATC-3'
R3(204-213:A), 35S-(204-213:A):GFP	59-KEAKGVLKSLADKVRGR-75 202-SDAEMASLLASA-213	EV-16F 5'-ATGGCTAGCTTGTTGGCTAGTGCTGCCTC-3' EV-15R 5'-AGCCAACAAGCTTCGCATTTCTTTATC-3'

Tabla 3.1. Cebadores usados para la elaboración de las construcciones recombinantes (R3PMoVwt) con la secuencia de la proteína de movimiento (MP) del virus del moteado de la parietaria (PMoV). Los residuos en color azul corresponden a los aminoácidos básicos de lisina (K) y arginina (R) de los dominios de unión a RNA (RBDs). Los aminoácidos mutados se muestran en color rojo y las secuencias delecionadas se indican con puntos suspensivos. Las secuencias nucleotídicas de las dianas de restricción se indican subrayadas y en negrilla.

3.2.3. Obtención de transcritos de las construcciones quiméricas de AMV e inoculación de plantas de *N. tabacum* P12

Para la reacción de transcripción, los plásmidos se linearizaron con el enzima de restricción *Pst*I y se transcribieron con la T7 RNA polimerasa (Invitrogen, USA) incubándose durante 3 h a 37 °C en una mezcla de reacción que contenía 1 µg de plásmido, 0.4mM de cada nucleótido (ATP, UTP, GTP, CTP), 5mM DTT, 1X del tampón de transcripción (Invitrogen, USA), 40U de inhibidor de RNAsas (Invitrogen, USA) y 50U de T7 RNA polimerasa (Invitrogen, USA), en un volumen final de 20 µl. A continuación se añadió a la mezcla 20U de DNasa (Invitrogen, USA), se incubó 15 min a 37 °C, y la reacción se detuvo añadiendo 2 µl de 0.5M EDTA pH: 8.0. El RNA se precipitó con 75 µl de etanol absoluto y 2,5 µl de acetato de sodio (3M AcNa, pH: 5.5) a -20 °C durante 2 h. A continuación se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 50 µl de etanol 70% y se volvió a centrifugar durante 5 min. El RNA precipitado se resuspendió en 20 µl de H₂O estéril tratada con DEPC. El transcrito de RNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA). Se inocularon directamente plantas transgénicas P12 de *N. tabacum* (que expresan las RNAs polimerasas P1 y P2 de AMV) con 10 ug de transcrito de RNA, mediante inoculación mecánica directa en dos hojas/planta previamente

laceradas con carborundum. Las plantas se mantuvieron en una cámara, siguiendo las mismas condiciones de luz y temperatura que se describen en el Capítulo 2. La expresión de la GFP en las células infectadas se visualizó y fotografió con un estereomicroscopio de fluorescencia LEICA MZ16F (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) con una longitud de onda de excitación y emisión de 488 y 535 nm, respectivamente. El área de los focos de infección se midió utilizando el software Image J v. 1.48c software (<http://imagej.nih.gov/ij>).

3.2.4. Expresión y purificación de la proteína de movimiento del PMoV y sus mutantes correspondientes en *E. Coli*.

La MPwt y las distintas MPs mutantes se amplificaron por PCR empleando la mezcla comercial de enzimas “Expand Long Template PCR (Roche, Suiza) en las condiciones previamente descritas a partir de los respectivos plásmidos R3 y utilizando los cebadores EIN-1F (5'-AGTGGATCCATGGCATTGTTCCTACGAAGACC-3') y EIN-1R (5'- ACACCCGGGTCAACTGGAATCACCCGACC-3') que contienen los sitios de restricción *Hind*III y *Xma*I (New Englan BioLabs, USA), respectivamente (subrayado). Los productos de PCR se digirieron con los enzimas de restricción correspondientes y se ligaron con el enzima T4 ligasa (apartado 2.2.2, Capítulo 2) en el vector de expresión pQE-30 (Qiagen, Alemania) previamente linearizado mediante digestión con las mismas enzimas. Los plásmidos obtenidos presentaban una secuencia de seis histidinas (H) fusionadas al extremo N-terminal de las MPs (His-MP). Con las construcciones recombinantes se transformaron en células de *E. coli* de la cepa M15 mediante electroporación (apartado 2.2.2, Capítulo 2). Las colonias de bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB sólido con ampicilina (50 µg/ml) durante 24 h. La expresión de las diferentes MPs se indujo incubando los cultivos de células con 1mM IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.6. Las proteínas expresadas a partir de las diferentes construcciones se purificaron mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes utilizando el kit comercial Ni-NTA Quick-Start Kit, (Qiagen, Alemania). Se partió aproximadamente de 500 ml de cultivo bacteriano, a partir del cual se recuperaron las células bacterianas mediante centrifugación a 10.000 r.p.m. y posteriormente se lisaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación de las proteínas se llevó a cabo pasando el lisado en una columna que contenía resina de níquel con la capacidad

de retener las proteínas que contienen una cola de histidinas. A continuación, se adicionó a las columnas los tampones de lavado A (6M Hidrocloruro de guanidina, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-ClH, pH: 8.0), B, C y D (8 M Urea, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, pHs: 8, 6.3 y 5.9 para los tampones B, C y D, respectivamente) y el tampón de elución (8M Urea, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, pH: 4.5). Las proteínas purificadas se dializaron por cromatografía de filtración a 4 °C durante 24 h en tampón 100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH: 7.0. Las proteínas purificadas se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% y su concentración se estimó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976). Los polipéptidos purificados y dializados correspondientes a las diferentes construcciones se utilizaron para los análisis de unión al RNA.

3.2.5. Ensayos de movilidad electroforética de complejos ribonucleoprotéicos

Parte de los amplicones de la MPwt obtenidos con los cebadores EIN-1F/EIN-1R se clonaron en el plásmido PTZ57R/T (Thermo Scientific, USA) con el enzima T4 ligasa (apartado 2.2.2, Capítulo 2) y se seleccionaron las colonias que tenían el inserto en la dirección apropiada para obtener un transcrito de polaridad positiva. Para obtener transcritos de RNA marcados con Digoxigenina (DIG), el plásmido se linearizó con el enzima *Pst*I y se transcribió con la T7 RNA polimerasa como hemos descrito en el apartado 3.2.3 de este capítulo pero con DIG-11-UTP (0.35 mM) (Roche, Suiza). El transcrito de RNA marcado se precipitó con etanol, se resuspendió en 20 µl de H₂O estéril tratada con DEPC y se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (apartdo 3.2.3 de este capítulo).

Los ensayos de unión de proteínas al RNA se realizaron mediante la técnica de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) (Carey, 1991). Para ello, 5 ng de transcrito de RNA de cadena positiva marcado con DIG se calentó 5 min a 85 °C y a continuación se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. Este RNA se incubó con las distintas proteínas purificadas (His-MPwt o de las MPs mutantes) durante 30 min a temperatura ambiente en un volumen final de 10 µl en tampón PE (10mM Na₂HPO₄, 1mM EDTA, pH: 7.0) junto con 5U de inhibidor de RNAsas (Invitrogen, USA). Tras la incubación, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% en 1X TAE a 80 V y los RNAs se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon cargadas positivamente en tampón 10X SSC (1.5M NaCl, 150 mM

Citrato Sódico, pH:7.0) durante toda la noche. Tras la fijación de los RNAs a la membrana mediante radiación UV ($700 \times 100 \mu\text{J} / \text{cm}^2$) se realizó el revelado de éstas. Para ello, las membranas se equilibraron con dos incubaciones de 5 min cada una en tampón 1 (100mM ácido maleico, 150 mM NaCl, pH: 7.5) y se bloquearon mediante incubación de 1 h con una solución que contenía tampón 1 más un 2% de Reactivo de Bloqueo (Roche, Suiza). A continuación, las membranas se sumergieron en una dilución del anticuerpo Anti-DIG (Roche, Suiza) a una relación de volumen de 1:10.000 en solución de bloqueo y se incubaron durante 30 min. Después se realizaron dos lavados de 15 min cada uno con tampón 1 y 0.3% de Tween 20. Finalmente, las membranas se incubaron durante 5 min en tampón 3 (10 mM Tris-HCl, 10mM NaCl, pH: 9.5). Las membranas se revelaron con substrato quimioluminiscente CSPD (Roche, Suiza) mediante incubación en oscuridad durante 5 min en una dilución 1:100 en tampón 3 y se expusieron a una película sensible a rayos X BioMax XarFilm (Kodak, país). Todo el este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente.

La cuantificación de las señales de hibridación en las películas se llevó a cabo empleando el Software ImageJ v. 1.48c software (<http://imagej.nih.gov/ij>). La constante de disociación aparente (K_d) de esta interacción se calculó mediante cuantificación densiométrica de la relación de los complejos ribonucleoprotéicos frente al RNA libre a partir una curva de regresión lineal generada con datos obtenidos de dos experimentos independientes de retardo en gel (EMSA).

3.2.6. Clonación de la MP del PMoV en el vector binario pMOG y expresión transitoria mediante agroinfiltración

La MPwt y las distintas MPs mutantes del PMoV se amplificaron por PCR empleando la mezcla comercial de enzimas “Expand Long Template PCR (Roche, Suiza) a partir de los respectivos plásmidos R3 utilizando los cebadores EV-1F y EV-1R que contienen los sitios de restricción *Hind*III y *Xma*I (New England BioLabs, EE.UU), respectivamente (Tabla 3.1). Los productos de PCR se digirieron con los correspondientes enzimas de restricción y se ligaron con el enzima T4 ligasa (Capítulo 2) en el vector pSK35S/GFP (Herranz y col., 2005) que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), la secuencia de la GFP y el terminador NOS, previamente linearizado mediante digestión con los mismos enzimas de restricción. Las diferentes secuencias de MPs se insertaron entre el promotor

35S y la GFP de modo que ésta quedó fusionada en fase al extremo C-terminal de las MPs (35S:MP-GFP:NOS). Posteriormente los casetes 35S:MP-GFP:NOS se liberaron mediante digestión con la enzima *XhoI* (New Englan BioLabs, USA) y ligaron al vector binario pMOG, previamente linearizado mediante digestión con la misma enzima. Las construcciones recombinantes se introdujeron en células de *Agrobacterium tumefaciens* C58 mediante electroporación (2.4 kV/cm², 5 milis). Las colonias transformadas se seleccionaron por crecimiento a 28 °C durante 48 horas en placas con medio LB que contenían los antibióticos kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (25 µg/ml). Las células transformadas se cultivaron a 28 °C durante 16 h en LB líquido con kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (25 µg/ml).

Para estudiar la localización subcelular de las distintas MPs, se cultivaron células de *A. tumefaciens* C58 transformadas con los correspondientes plásmidos binarios a 28 °C durante 16 h en LB líquido con kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (25 µg/ml). Posteriormente, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 1 min y se resuspendieron en tampón de infiltración (10 mM C₆H₁₃NO₄S, 10 mM MgCl₂ pH: 5.6) a una OD₆₀₀=0.2. Finalmente, las células se infiltraron a presión con una jeringa hipodérmica sin aguja por el envés de las hojas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad. La localización subcelular de las MPs se analizó dos días después de la infiltración con CLSM.

3.2.7. Inoculación de protoplastos de P12 y análisis tipo *Northern blot*

Los protoplastos se extrajeron a partir de hojas jóvenes de plantas de *N. tabacum* P12 a las que previamente se les eliminó la epidermis del envés mediante laceración con carborundum. Las hojas se sumergieron en una solución enzimática (0.4M manitol, 0.44% medio MS (Murashige y Skoog, 1962), 0.1% Pectoliasa Y-23 y 1% Celulasa, pH: 5.5) durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró la solución con miracloth y los protoplastos se pasaron a tubos de 10 ml. Seguidamente se agregó 1 ml de sacarosa al 20% al fondo del tubo para formar dos fases. Se centrifugó a 800 r.p.m. durante 10 min, depositándose los protoplastos enteros en la interfase. Estos se recuperaron, se pasaron a un nuevo tubo y se diluyeron con solución de lavado 1:3 V/V (0.4M manitol, 0.44% medio MS, pH: 5.6) y se volvió a repetir el proceso. Los protoplastos purificados fueron inoculados con 5 µg de los correspondientes transcritos R3 mediante el método del polietilenglicol (PEG 3000) al 40% (Loesch-Fries y col.,

1985). Para esto, los protoplastos se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en presencia del PEG 3000 con los transcritos obtenidos de las diferentes construcciones de R3. Tras la inoculación, los protoplastos se resuspendieron en solución de lavado y se incubaron durante 18 h con luz constante a una temperatura de 25 °C. Los protoplastos se recuperaron centrifugando 1 min a 1.000 r.p.m. y el RNA total se extrajo usando el reactivo TRIZOL (apartado 1.2.2, Capítulo 1). Para el análisis en mediante *Northern blot*, 1 µg de los RNAs totales se separaron en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% en tampón 1X MOPS (200 mM C₇H₁₅NO₄S, 50 mM NaCH₃COO, 20 mM EDTA, pH: 7.0) con el 2% de formaldehído (Sambrook y col., 1989). Posteriormente los RNAs se transfirieron por capilaridad en 10X SSC a una membrana de Nylon cargada positivamente y se fijaron mediante UV como se ha descrito anteriormente. Las membranas se hibridaron con una sonda obtenida mediante transcripción en presencia de DIG-UTP (Roche, Suiza) del gen de la CP de AMV con la T7 RNA polimerasa (Invitrogen, USA) como hemos descrito en el apartado 3.2.5 de este capítulo a partir de un plásmido PTZ57R/T (Thermo Scientific, USA) que contenía dicho gen.

Para la hibridación, las membranas se incubaron durante 2 h a 68 °C en solución de hibridación (50% de formamida, 0.02% SDS, 5X SSC, 0.1% Lauryl sulfato de sodio, 2% Reactivo de bloqueo). Tras desechar la solución de hibridación, la membrana se hibridó con la misma solución pero conteniendo 100 ng de la sonda marcada con dogixigenina a 68°C durante toda la noche. Una vez retirada la solución de hibridación, la membrana se sometió a dos lavados de 5 min en un tampón 2X SSC y 0.1% SDS a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 min en un tampón que contenía 0.1x SSC y 0.1% SDS a 68°C. Las membranas se revelaron como se ha descrito en el apartado 3.2.5 de este capítulo.

3.3. Resultados

3.3.1. Estudio de la actividad de unión a RNA de la proteína de movimiento de PMoV

La capacidad de unión *in vitro* de la MP del PMoV al RNA viral se determinó mediante ensayos EMSA (Carey, 1991). Para ello, tras purificar la MP del aislado Español CR8 en un sistema de expresión bacteriano se incubaron cantidades crecientes de la proteína (0,05 a 1,2 µg) con una cantidad constante de transcrito de RNA marcado

con DIG correspondiente al ORF de la MP del aislado CR8 de PMoV. El retardo electroforético del RNA mostró que el complejo de ribonucleoproteína se formaba a partir de 0.6 μ g de MP (Figura 3.1, panel A, carril 3). La relación de los complejos de ribonucleoproteína y RNA libre se cuantificó por densitometría con el fin de calcular la constante de disociación (Kd) de la interacción entre ácido nucleico y proteína. A partir de datos de dos experimentos independientes, se generó una curva de regresión lineal, a partir de la cual se calculó el valor de Kd (concentración de MP en la cual la mitad del RNA) que era de 5.8 mM (Figura 3.1, panel B).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la MP mediante el programa de análisis de secuencias protéicas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>) (Nugent y Jones, 2012), reveló la presencia de dos regiones hidrofílicas ricas en amino ácidos lisinas (K) y argininas (R) que tenían una estructura en α -hélice (R1 y R2) y que podían corresponder a los RBDs (Figura 3.2). La región R1 se localizaba en la mitad N-terminal de la MP, entre los residuos situados en las posiciones 59 a 75, y coincidía con el RBD propuesto para las MPs de otros ilarvirus (Pallás y col., 2012; 2013), mientras que la región R2 se localizaba en la parte C-terminal, entre los residuos de las posiciones 203 a 214. Para comprobar si R1 y R2 tenían capacidad de unión al RNA se construyeron una serie de mutantes en los que se eliminaron de la construcción MPwt las regiones R1, R2 o bien ambas (R1-R2), resultando los mutantes MP Δ R1, MP Δ R2 y MP Δ R1-2 (Tabla 3.1). Tras su expresión y purificación, estas proteínas mutantes se usaron en ensayos EMSA para analizar sus actividades de unión al RNA viral. Tal y como muestra la Figura 3.1 (panel C), no se observó el retardo electroforético típico del complejo ribonucleoprotéico cuando el RNA se incubó con la MP mutante a la que se le habían eliminado ambos RBDs (MP Δ R1-2) mientras que las proteínas mutantes MP Δ R1 y MP Δ R2, sí eran capaces de formar dichos complejos ribonucleoprotéicos. Asimismo, una MP mutante a la que se le había deleccionado la mitad N-terminal (MP Δ N-t) de modo que sólo contenía el dominio R2 siguió siendo capaz de unir RNA (dato no mostrado). Estos resultados indicaban que ambas regiones R1 y R2 eran capaces de unir RNA de manera independiente.

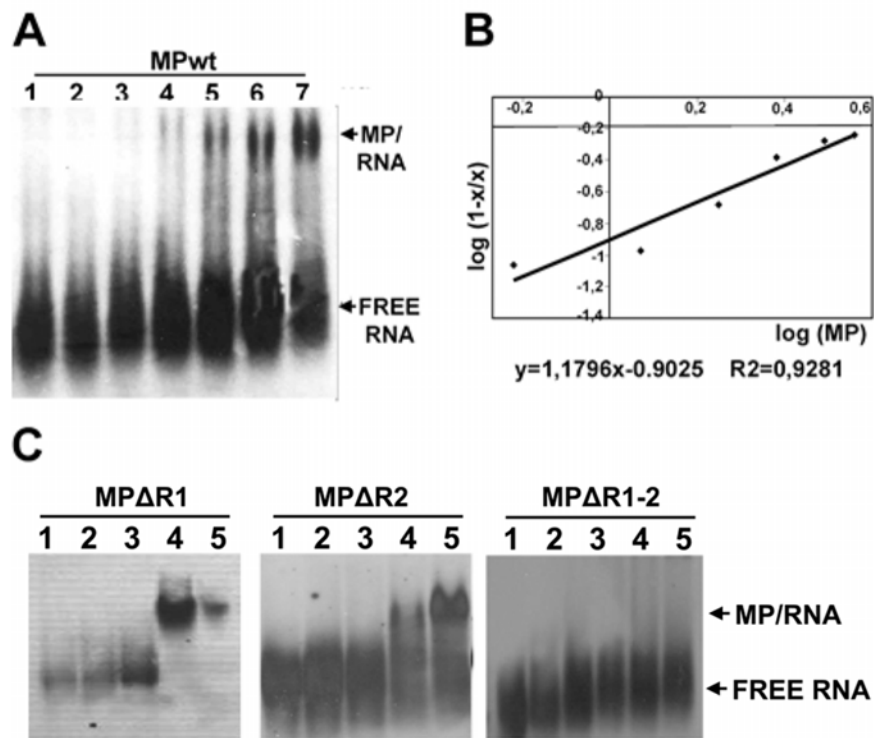


Figura 3.1. Ensayos de movilidad electroforética de complejos ribonucleoprotéicos (EMSA) para determinar la capacidad de unión de la proteína de movimiento (MP) al RNA del virus del moteado de la parietaria (PMoV). El panel A muestra los ensayos del RNA marcado con DIG correspondiente al gen de la MP de PMoV incubado sin proteína (carril 1) o con 0.1, 0.25, 0.5, 0.6, 0.8 o 1.2 μg de la MP del aislado CR8 (MPwt) (carriles 2 a 7, respectivamente). El panel B representa la gráfica de la pendiente de unión de la MPwt al RNA; la recta muestra el ajuste determinado por el análisis de mínimos cuadrados, con la ecuación correspondiente ($y = 1.1796x - 0.9025$), a partir del cual se calcula el valor de K_d (constante de disociación aparente). El panel C muestra el ensayo del RNA incubado sin proteína (carril 1) o con 0.2, 0.4, 0.5 o 1.2 μg (carriles 2 a 5, respectivamente) de las MPs mutantes que carecen de las regiones R1 (MP Δ R1), R2 (MP Δ R2) o ambos (panel MP Δ R1-2). Las flechas indican la posición del RNA libre (FREE RNA) y el complejo ribonucleoprotéico (MP/RNA).

3.3.2. Estudio del papel jugado por la proteína de movimiento del PMoV en el movimiento del virus empleando una construcción quimérica de AMV

A continuación se analizó la implicación de las regiones R1 y R2 en el movimiento célula a célula del virus. Para esto, y debido a la falta de clones infecciosos de PMoV, se utilizó una construcción quimérica del RNA 3 de AMV que había sido usada para estudiar la implicación de las MPs de otros virus de la familia 30K en el movimiento intercelular (Herranz y col., 2005; Sánchez-Navarro y col., 2006; Aparicio y col., 2010; Fajardo y col., 2013). Este RNA 3 quimérico, llamado R3, expresaba la GFP, además de la MP y la CP del AMV (Sánchez-Navarro y col., 2001). En este clon, la MP puede ser sustituida por MPs de la familia 30K de otros virus lo que permite estudiar su funcionalidad (Sánchez-Navarro y col., 2006). Además, la expresión de la GFP permite visualizar el proceso de infección mediante microscopía de fluorescencia. Para nuestro propósito, la MP del AMV se sustituyó por la MPwt del PMoV, generando la construcción R3PMoVwt (Figura 3.3, panel A). Para analizar el movimiento célula a célula de esta construcción, se obtuvieron transcritos de RNA que se inocularon en plantas de *N. tabacum* transgénicas P12 que expresaban las proteínas P1 y P2 de AMV de manera constitutiva (Taschner y col., 1991). A los cuatro d.p.i se observaron los focos de infección, confirmando que la MP de PMoV era funcional en el transporte intercelular de la construcción R3PMoVwt (Figura 3.3, panel B). Posteriormente, la MPwt se intercambió por los mutantes MP Δ R1 y MP Δ R2, generándose las construcciones R3(Δ R1) y R3(Δ R2), respectivamente. Tras la inoculación de plantas P12 con éstas, sólo pudo observarse fluorescencia en células individuales, lo que indicaba que en ambas construcciones el movimiento intercelular estaba bloqueado. El resultado de este experimento indicaba que las regiones R1 y R2 de la MP de PMoV eran indispensables para movimiento del virus célula a célula. Dichas regiones contienen 6 y 4 residuos básicos (K y R), respectivamente, que podrían estar implicados en la unión al RNA. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis mutacional a partir de la construcción quimérica R3 PMoVwt, sobre la que se intercambiaron grupos de dos residuos básicos por residuos neutros, alaninas (A) (construcciones R3(59,62:A), R3(66,71:A), R3(73,75:A), R3(204,207:A), R3(211,213:A)) (Figura 3.3, panel B y Tabla 3.2). Tras la inoculación de plantas P12 con los transcritos de las respectivas construcciones, se observó infección en células individuales de las plantas inoculadas con todos los mutantes de la región R1 (R3(59,62:A), R3(66,71:A) y R3(73,75:A)). En los mutantes del dominio R2 (R3(204,207:A) y R3(211,213:A)) se observaron focos de

infección, aunque con un área más reducida que los observados en la construcción R3PMoVwt. Finalmente también se observó el bloqueo total de transporte de virus en la construcción R3(204-213:A) que contenía el mutante en el que los cuatro residuos básicos de R2 se habían sustituido por alaninas (A).

El nivel de reducción del movimiento célula a célula de los mutantes de la región R2 se cuantificó midiendo el área de 20 focos de infección mediante el software Image J v. 1.48c software (<http://imagej.nih.gov/ij>). Como se puede observar en la Figura 3.3 (panel C) los mutantes R3(211,213:A) y R3(204,207:A) mostraron una reducción del movimiento intercelular con respecto al movimiento observado de R3PMoVwt del 76% y 92,5%, respectivamente. Finalmente, con el objetivo de confirmar que el confinamiento de los diferentes mutantes en células individuales estaba causado por la falta de movimiento intercelular y no por alteración de la replicación viral se analizaron mediante *Northern blot* los niveles de acumulación de RNA viral de estos mutantes en protoplastos de plantas P12. Esta aproximación mostró que todos los mutantes, tanto de la región R1 (Figura 3.3, panel D) como de la región R2 (no mostrado), acumularon niveles similares de RNA viral corroborando su capacidad para replicarse en plantas P12. Estos resultados indicaban que los residuos básicos dentro de R1 no eran necesarios para el proceso de replicación, pero sí eran críticos para el transporte intercelular. En el caso de la región R2, el bloqueo total del transporte se produjo sólo cuando los cuatro residuos básicos se sustituyeron por alaninas (A).

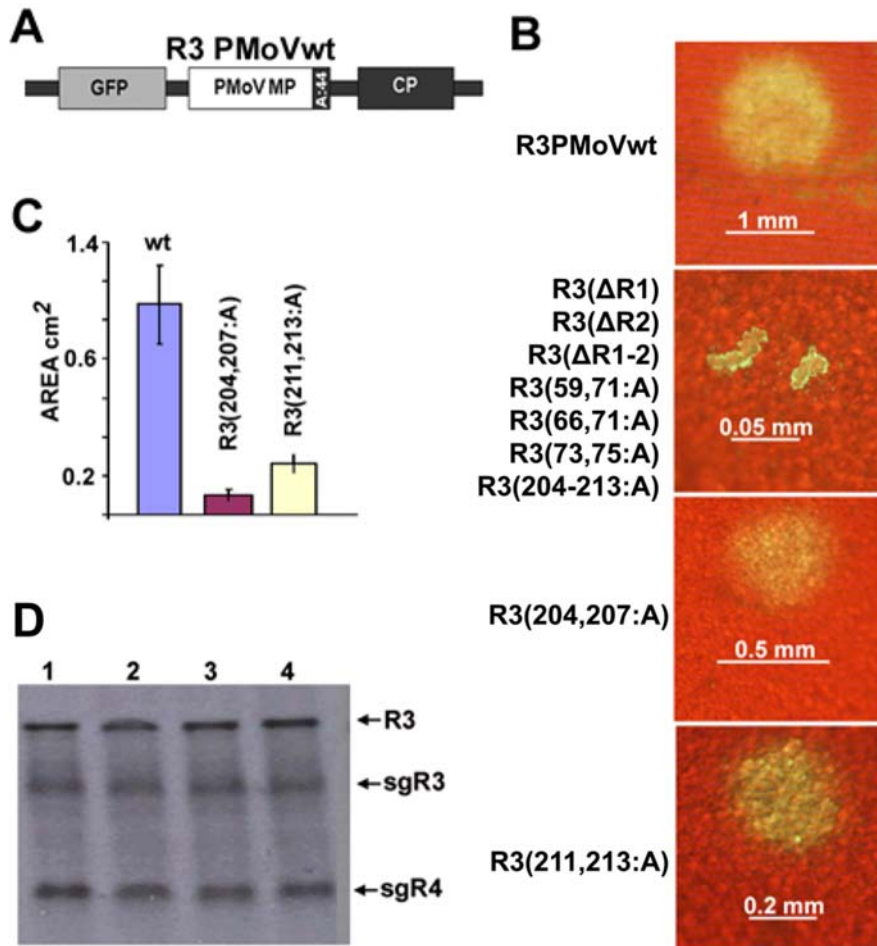


Figura 3.3. Análisis de la capacidad de movimiento intercelular de los diferentes mutantes de la proteína de movimiento (MP) del virus del moteado de la parietaria (PMoV). El panel A muestra una representación esquemática del RNA 3 quimérico con la MP del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) intercambiada por la del PMoV (construcción R3PMoVwt). Los rectángulos representan la GFP (gris), la MP de PMoV (blanco) fusionada a los últimos 44 residuos de la MP de AMV (negro) y la CP del AMV. El panel B corresponde a imágenes de los focos de infección en plantas P12 inoculadas con transcritos de las diferentes construcciones quiméricas de R 3 (indicadas a la izquierda) tomadas a los 4 d.p.i. El panel C muestra un gráfico del área media de los focos de infección inducidos por los mutantes R3(204,207:A) y R3(211,213:A) respecto a R3PMoVwt. El panel D muestra los resultados de un ensayo de *Northern blot* del RNA total extraído de protoplastos P12 inoculados con las construcciones quiméricas R3PMoVwt (carril 1), R3(59,62:A) (carril 2), R3(66,71:A) (carril 3) y R3(73,75:A) (carril 4) en el que la posición de los RNAs virales se indica a la derecha (R3 corresponde al RNA 3 genómico y los sgRNA 3 y 4 corresponden a los RNA subgenómicos a partir de los cuales se expresan la MP quimérica PMoV-AMV y la CP, respectivamente).

3.3.3. Localización subcelular de la proteína de movimiento de PMoV

Una posible explicación del bloqueo del movimiento intercelular observado con las diferentes MPs mutantes podría deberse a la pérdida de la capacidad de unión de éstas al RNA viral. Para confirmar esta hipótesis, cantidades crecientes de estas MPs (0.05, 0.5 y 1.2 μg) se incubaron con una cantidad constante del RNA viral marcado con DIG y se analizaron mediante ensayos EMSA. Estos análisis mostraron que todas las MPs mutantes mantuvieron la capacidad de unión al RNA, ya que la formación de complejos ribonucleoprotéicos se pudo observar en presencia de 1.2 μg de proteína (Figura 3.4).

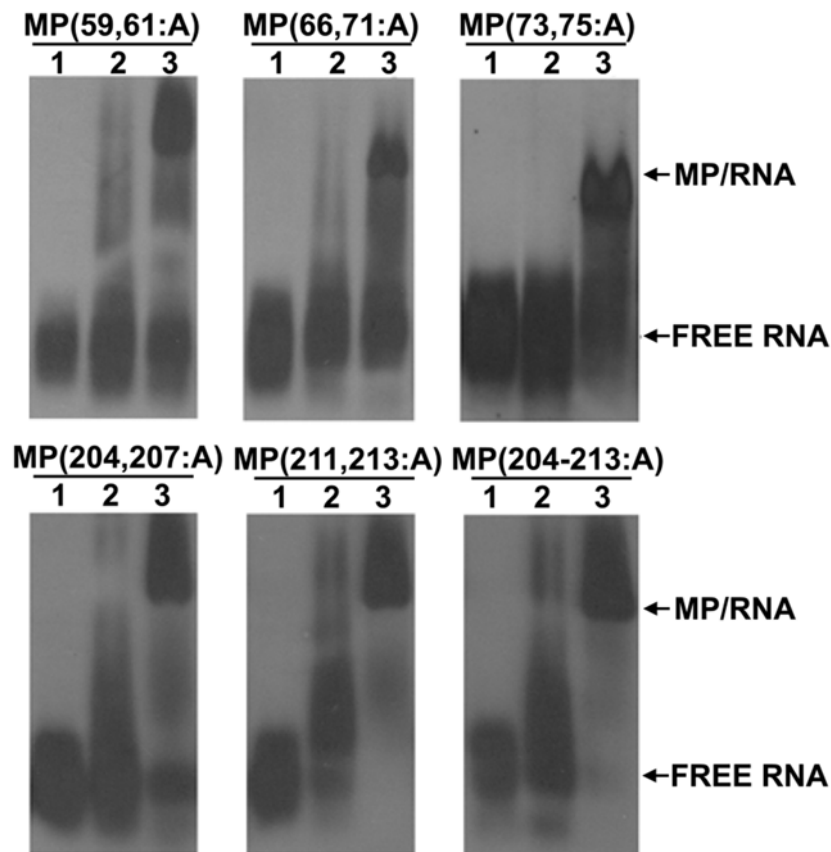


Figura 3.4. Ensayos de movilidad electroforética de complejos ribonucleoprotéicos (EMSA) para determinar la capacidad de unión de las proteínas de movimiento (MPs) mutantes en los residuos básicos R1 y R2 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) al RNA viral. El carril 1 corresponde a RNA incubado sin la proteína, y los carriles 2 y 3 al RNA incubado con 0.5 o 1.2 μg de las MPs mutantes (indicadas en la parte superior de cada panel), respectivamente. La posición del RNA libre (FREE RNA) y el complejo ribonucleoprotéico (MP/RNA) se indican con flechas.

A continuación, la MPwt y los distintos mutantes se fusionaron a la GFP en su extremo C-terminal en el plásmido pSK35S/GFP obteniéndose las construcciones 35S-MPwt:GFP, 35S-(59,62:A):GFP, 35S-(66,71:A):GFP, 35S-(73,75:A):GFP, 35S-(204,207:A):GFP 35S-(211,213:A):GFP y 35S-(204-213:A):GFP que se utilizaron para analizar su localización subcelular. Cada construcción se expresó transitoriamente mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* y dos días después se detectó la emisión de fluorescencia mediante microscopía láser confocal (CLMS) (Figura 3.5). La construcción 35S-MPwt:GFP (Figura 3.5, panel A) formaba estructuras puntiformes sobre la periferia celular, como sucede en diferentes MPs que se localizan en PDs (van der Wel y col., 1998; Boyko y col., 2000; Herranz y col., 2005; Aparicio y col., 2010). Para confirmar que este patrón representaba la acumulación de la MP del PMoV en PDs, ésta se co-expresó junto con la MP de TMV, que es un marcador de localización en PD bien caracterizado, fusionada a la proteína fluorescente roja (DsRed) (Boyko y col., 2000). Las imágenes de CLSM mostraron a ambas proteínas localizaban en la periferia celular formando estas estructuras puntiformes, confirmando así que la MP de PMoV también se acumulaba en PD (Figura 3.5, panel B). Sin embargo, las MPs con las mutaciones en la región R1 y el doble mutante de la región R2, no se localizaban específicamente en PDs sino que se distribuían de manera difusa sobre la periferia celular (Figura 3.5, panel C- I, mutantes 35S-(59,62:A):GFP, 35S-(66,71:A):GFP, 35S-(204-213:A):GFP y Tabla 3.2) o formando cuerpos esféricos (Figura 3.5, panel C-II mutante 35S-(73,75:A):GFP y Tabla 3.2). Los mutantes 35S-(204,207:A).GFP y 35S-(211,213:A):GFP mostraron un patrón intermedio consistente en la acumulación de una fracción de la proteína en PDs y otra fracción siguiendo un patrón difuso (Figura 3.5, panel C-III, Tabla 3.2). En resumen, la eliminación completa o los cambios de los residuos básicos lisinas (K) o argininas (R) por alaninas (A) en las regiones R1 y R2 no impedía la actividad de unión al RNA, pero afectaba la localización subcelular de la MP, causando un bloqueo total (mutantes R1 y R2 doble mutante) o parcial (mutantes R2) de la acumulación de ésta en PDs (Tabla 3.2). Estos resultados sugieren que la pérdida de la capacidad movimiento intercelular de las MPs mutantes estaría causada por la imposibilidad de éstas de llegar a los PDs.

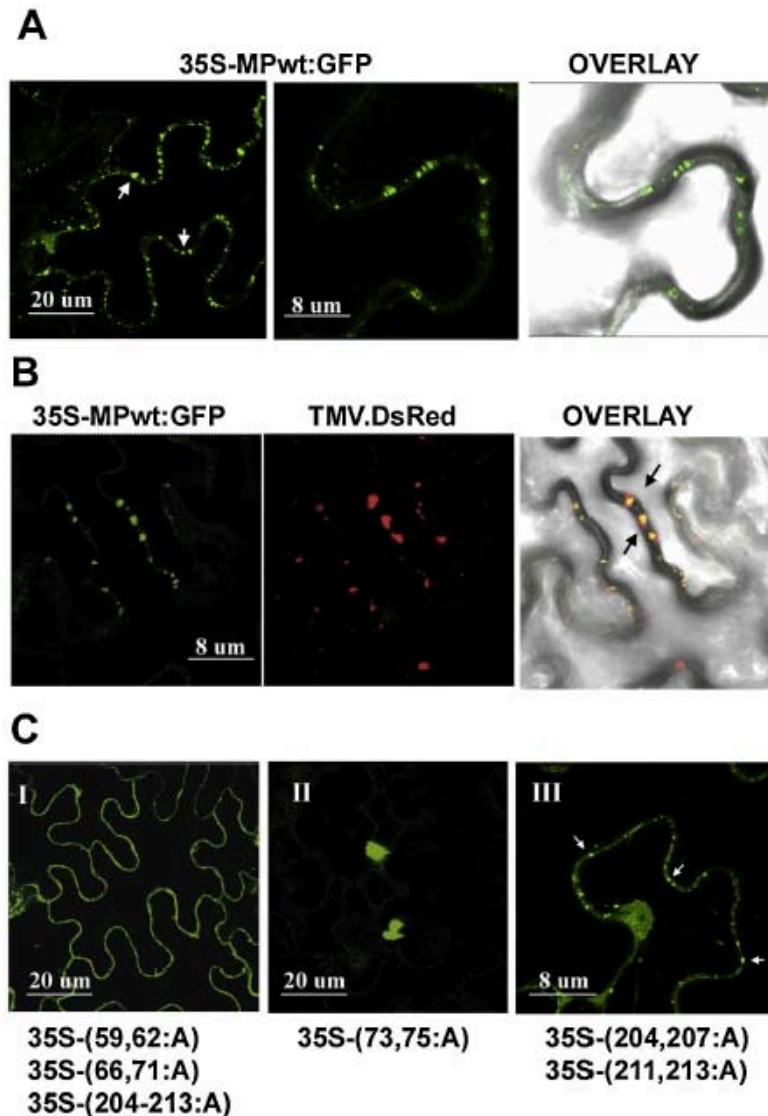


Figura 3.5. Localización subcelular de la proteína de movimiento (MP) del virus del moteado de la parietaria (PMoV) y de los diferentes mutantes de ésta. El panel A muestra imágenes de células epidérmicas agroinfiltradas con la construcción 35S-MPwt:GFP con estructuras puntiformes en la periferia celular asociadas a la localización en plasmodesmos (PDs). El panel B corresponde a imágenes de co-localización en PDs de la MP de PMoV y del virus del mosaico del tabaco (TMV) fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP) y a la proteína roja fluorescente (DsRed), respectivamente. El panel C muestra imágenes de la localización subcelular no asociadas a PDs de las MPs mutantes fusionadas a la GFP de las construcciones 35S-MP Δ R1:GFP, 35S-MP Δ R2:GFP, 35S-MP Δ R1-2:GFP, 35S-MP(59,62:A):GFP, 35S-MP(66,71:A):GFP y 35S-MP(204-213:A):GFP (imagen I); de la construcción 35S-MP(73,75:A):GFP (imagen II) y de patrones intermedios con localización difusa y puntiforme de las construcciones 35S-MP(204-207:A):GFP y 35S-MP(211-214:A):GFP (imagen III). Las flechas señalan los PDs con MPs. Las imágenes en OVERLAY de los paneles A y B corresponden a imágenes de superposición en los que se pueden apreciar que las estructuras puntiformes se localizan a lo largo de la membrana celular.

3.4. Discusión

Las MPs de los virus de plantas son proteínas indispensables para el movimiento de éstos entre células adyacentes. En este trabajo hemos demostrado que la MP del PMoV interviene el movimiento intercelular del virus. Aunque se sospechaba que esta proteína podría intervenir en el movimiento viral por analogía con las MPs de otros ilarvirus, hasta la fecha no se disponía de evidencias experimentales. En la mayoría de los casos, las MPs deben interactuar con el ácido nucleico viral y acumularse en los PDs. En este trabajo, hemos mostrado que la MP del PMoV tiene actividad de unión *in vitro* al RNA viral, con un valor constante de disociación (K_d) de 5.8 mM, ligeramente mayor que la calculada para la MP de otro ilarvirus, el PNRSV ($K_d=1.4$ mM) (Herranz y Pallás, 2004). Mediante el programa bioinformático PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>) (Nugent y Jones, 2012) diseñado para la predicción de estructuras de proteínas, hemos identificado en la MP del PMoV dos regiones hidrofílicas ricas en residuos lisinas (K) y argininas (R) con una estructura en α -hélice (regiones R1 y R2) que, curiosamente, se encuentran en los extremos N y C-terminal de la proteína, respectivamente. Los ensayos de unión del RNA a proteínas mediante la técnica EMSA mostraron que las MPs mutantes que carecían de una de estas regiones (mutantes MP Δ R1, MP Δ R2 y MP Δ N-t) conservaban la capacidad de unión al RNA, lo que indicaba que ambos motivos tenían la capacidad de unir al ácido nucleico de forma independiente. Hasta la fecha se ha descrito que el virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) y el TMV presentan MPs que contienen también dos RBDs, aunque estos se sitúan de manera contigua en la proteína (Citovsky y col., 1992; Isogai y Yoshikawa., 2005). Por otro lado, la presencia de dos RBDs en la MP de PMoV contrasta con los otros cuatro miembros de la familia *Bromoviridae* estudiados hasta ahora, los cuales contienen un único RBD. Además, mientras que la MP del AMV y PNRSV presentan el RBD en el extremo N-terminal, en BMV y CMV está situado en el extremo C-terminal (Schoumacher y col., 1994; Li y Palukaitis, 1996; Fujita y col., 1998; Herranz y Pallás., 2004; Kim y col., 2004). Por tanto, esta sería la primera descripción de un virus de la familia *Bromoviridae* que contiene dos RBDs en su MP. Desde el punto de vista evolutivo, la presencia de dos RBDs en la PM podría haber supuesto una ventaja frente al resto de ilarvirus que solo tienen un RBD, o por el contrario, podría ser el vestigio de un ancestro común en el

grupo, a partir del cual evolucionaron adquiriendo un solo RBD, cada uno en un extremo de la MP.

Nuestros resultados indican que a pesar de que PMoV y PNRSV pertenecen al género *Ilarvirus*, difieren en la estructura de la MP. Curiosamente, también difieren la organización de su genoma: El RNA 2 de PMoV contiene un ORF que codificaría para la proteína 2b, que está ausente en el RNA 2 de PNRSV. Aunque en un trabajo previo se demostró la acumulación de un sgRNA 4A en plantas de *C. quinoa* infectadas con PMoV (door Peeters., 2009), no se ha podido identificar hasta la fecha la existencia de un producto de traducción (proteína 2b) de este RNA subgenómico. La estructura genómica de PMoV es similar a la de CMV, en el cual el RNA 2 es también bicistrónico y el sgRNA 4A traduce la proteína multifuncional 2b (Ding y col., 1994). Además, la proteína 2b de CMV actúa como supresor de silenciamiento génico (Brigneti y col., 1998) y también está implicada en el movimiento local y sistémico viral (Ding y col., 1995; Du y col., 2007). A pesar de que no se ha confirmado la existencia de un producto de traducción en el PMoV, es tentador especular que ambas, MP y 2b podrían participar en el movimiento del virus. Esto lo diferenciaría de PNRSV, el cual no necesitaría del producto 2b para moverse.

Por otro lado, al igual que sucede con las MPs de otros virus (Sánchez -Navarro y col., 2006) hemos demostrado que la MP del PMoV es funcional en el RNA 3 de AMV quimérico, lo que nos ha permitido analizar su papel en el movimiento célula a célula. Nuestros resultados muestran que la construcción R3 PMoVwt mantiene la capacidad de movimiento entre células adyacentes mientras que las construcciones con las MPs mutadas que carecen de las regiones R1, R2 o de ambas, son incapaces de moverse entre células vecinas, sugiriendo que la unión al RNA es una condición necesaria pero no suficiente en el movimiento célula a célula de PMoV. Resultados similares se obtuvieron cuando se eliminaron los RBDs de las MPs de PNRSV y CMV (Vaquero y col., 1997; Herranz y col., 2005). Sorprendentemente, cuando grupos de dos residuos básicos (K o R) en la región N-terminal (R1) se cambiaron por el residuo neutro A, las construcciones resultantes no se movieron y quedaron confinadas en células individuales correspondientes a los puntos de entrada. Esto indicaba que la ausencia de dos cargas positivas en R1, independientemente de su posición, era suficiente para impedir el transporte viral. Por otra parte, los protoplastos P12 transfectados con transcritos de estos mutantes acumularon RNA viral en niveles similares que los acumulados por R3PMoVwt, indicando que las mutaciones de la MP

no afectaban el proceso de replicación. Cuando los residuos básicos en la región R2 se cambiaron por residuos neutros de alaninas (A), encontramos que la ausencia de dos cargas positivas permitía el movimiento de célula a célula, pero a muy bajo nivel, mientras que el cambio de los cuatro residuos básicos bloqueaba completamente el movimiento viral. Para averiguar cómo afectaban estas mutaciones puntuales al transporte de la MP, se analizó su capacidad de unión al RNA y su localización subcelular. Los análisis EMSA demostraron que todos los mutantes de MP mantenían la actividad de unión al RNA, aunque se observaron diferencias en su localización subcelular: los mutantes con un movimiento célula a célula reducido se acumulaban tanto en PDs como en la periferia celular, mientras que los mutantes incapaces de moverse entre células vecinas habían perdido completamente la capacidad de acumularse en los PDs y se localizaban de manera difusa en la periferia celular. Por el contrario, la construcción 35S-MPwt:GFP se acumulaba en estructuras puntiformes entre las células vecinas, una ubicación similar a la observada con las MPs de AMV y PNRSV y que correspondían a la localización en PDs (van der Wel y col., 1998; Herranz y col., 2005; Aparicio y col., 2010). Esto fue corroborado mediante ensayos de co-localización con la MP del TMV, que se utiliza habitualmente como control de co-localización en PDs (Aparicio y col., 2010). En el caso del PNRSV, se ha demostrado que el cambio de grupos de tres residuos básicos por otros neutros como alaninas (A) o glicinas (G) en el RBD de la MP bloqueaba por completo el movimiento célula a célula (Herranz y col., 2005). Por otra parte, los análisis EMSA con péptidos sintéticos de estos mutantes demostraron una afinidad de unión al RNA mucho menor que la MP intacta (Herranz y col., 2005). En el caso del PMoV, la ausencia de los residuos básicos en los motivos R1 y R2 de la MP podría afectar al plegamiento de la proteína, lo que afectaría a la capacidad de movimiento pero no a la actividad de unión al RNA. De hecho, las cargas positivas en la región R1 serían más importantes para mantener la conformación estructural de la MP que las que están en R2. En general, nuestros resultados indican que los residuos básicos en ambas regiones son necesarios para una correcta localización de la MP en los PDs, lo que afecta finalmente el movimiento viral entre células vecinas. Sin embargo, las mutaciones de la región R1 son más determinantes que las R2, con la excepción de la eliminación completa de este último dominio o el intercambio de todos sus residuos básicos por alaninas (A). La interferencia en el movimiento célula a célula al intercambiar residuos básicos en el RBD por residuos neutros se ha demostrado anteriormente con la MP del BMV (Takeda

y col., 2004) y PNRSV (Herranz y col., 2005). Además, una ineficiente localización de la MP en los PDs podría explicar la incapacidad de estos mutantes para moverse entre células vecinas como se mostró anteriormente para CMV, TMV, PNRSV y RCNMV (Berna y col., 1991; Canto y Palukaitis, 2005; Tremblay y col., 2005; Aparicio y col., 2010).

Finalmente, no podemos descartar que la CP del PMoV pueda intervenir en el movimiento célula a célula del virus, ya que en las construcciones de AMV se haya presente la CP de este último virus. La ausencia de clones infectivos del PMoV y la imposibilidad para generar una construcción quimérica del RNA 3 del AMV con la MP y la CP del PMoV, no permiten llevar a cabo este tipo de análisis. En conclusión, hasta la fecha la MP del PMoV es la primera proteína de movimiento de la familia *Bromoviridae* que posee dos regiones con capacidad de unión al RNA de manera independiente. Nuestros resultados indican que no se requiere ninguna de las dos regiones para la replicación viral, pero los residuos básicos localizados en éstas están implicados en el transporte intercelular del virus. También sugieren que la presencia de los residuos básicos en R1 y R2 es necesaria para la localización de la MP en los PD. La eliminación de alguno de estos podría alterar la conformación del plegamiento de la proteína, lo que interferiría con su capacidad para interactuar con factores del huésped necesarios para su transporte a los PDs.

Construcción	Secuencia y posición del RBD ^a	Unión al ARN ^b	Localización ^c	Movimiento ^d
MPwt	59- <u>KEAKGVLKSLADKVRGR</u> -75 202- <u>SDKEMRSLRSR</u> -213	Si	Plasmodesmos	Si (100%)
MP Δ R1	59-----75 202- <u>SDKEMRSLRSR</u> -213	Si	Difusa periferia celular	No
MP Δ R2	59- <u>KEAKGVLKSLADKVRGR</u> -75 202-----213	Si	Difusa periferia celular	No
MP Δ R1-2	59-----75 202----213	No	Difusa periferia celular	No
MP(59,62:A)	59- A EA A GVLKSLADKVRGR-75	Si	Difusa periferia celular	No
MP(66,71:A)	59- <u>KEAKGVL</u> A SLAD A VRGR-75	Si	Difusa periferia celular	No
MP(73,75:A)	59- <u>KEAKGVLKSLADK</u> V A G A -75	Si	Cuerpos esféricos en la periferia celular	No
MP(204,207:A)	202-SD A EM A SLLRSR-213	Si	Plamodesmos/Difusa periferia celular	Si (8.4%)
MP(211,213:A)	202- <u>SDKEMRSL</u> L A S A -213	Si	Plamodesmos/Difusa periferia celular	Si (24%)
MP(204-213:A)	202-SD A EM A SLL A S A -213	Si	Difusa periferia celular	No

(a). Secuencia aminoacídica de los dominios de unión a ácidos nucleicos (RBDs) predichos de la proteína de movimiento (MP) del virus del moteado de la parietaria (PMoV) y su posición en la proteína.

(b). Unión de la MP y las diferentes construcciones al RNA mediante ensayos de movilidad electroforética de complejos ribonucleoprotéicos (EMSA)

(c). Localización subcelular de la MPwt y las diferentes construcciones mutantes

(d). Resultados de los ensayos de movimiento intercelular.

Tabla 3.2. Resumen de los resultados obtenidos en este estudio con las diferentes construcciones R3PMoVwt conteniendo secuencias de la proteína de movimiento (MP) del virus del moteado de la parietaria (PMoV). Se muestran las diferentes construcciones correspondientes a la MP intacta (MPwt) y a las MPs mutantes obtenidas mediante deleciones o mediante el cambio de residuos básicos de lisina (K) y arginina (R) (subrayados) por residuos neutros de alaninas (color rojo). Entre paréntesis se muestra el porcentaje del área infectada por las construcciones con los diferentes mutantes con respecto a la construcción con la MPwt

Capítulo 4

Implicación de la proteína de movimiento (MP), cubierta (CP) y 2b del virus del moteado de la parietaria en la inducción de síntomas y en la supresión del silenciamiento génico.

4.1. Introducción

Para establecer una infección, los virus necesitan factores del huésped y poder escapar de los sistemas defensivos de la planta. La inducción de síntomas asociados a una infección viral puede estar causada por la activación de las respuestas defensivas de la planta, pero también puede ser consecuencia de la interacción entre alguno de los componentes del virus (determinantes de patogenicidad) y alguno de los factores de la planta. La manifestación de síntomas en las plantas infectadas ocurre como consecuencia de la alteración de diversos procesos fisiológicos como regulación hormonal, ciclo celular, transporte de macromoléculas y expresión de determinados genes del hospedador. Normalmente, se establece un equilibrio entre el patógeno y los sistemas de defensa del hospedador de manera que éste no causa la muerte de la planta (interacción compatible) (García y Pallás, 2015).

Las plantas tienen diversos sistemas de defensa y protección, alguno de los cuales son pasivos mientras que otros implican complejos procesos que inducen una resistencia específica contra el patógeno. Uno de estos mecanismos es el denominado silenciamiento génico mediado por RNA (Ding y Voinnet, 2007; Pallás y García, 2011), presente en los cuatro reinos eucariotas (protozoos, hongos, plantas y animales) a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Baulcombe, 2004). Las moléculas efectoras son pequeños RNAs (sRNAs) de 21 a 30 nucleótidos, y este mecanismo, además de ser un sistema de defensa contra agentes patógenos, tiene otras funciones como el control de la expresión de genes clave en el desarrollo y la regulación de la estabilidad del genoma (Llave y col., 2002; Chapman y Carrington, 2007; Rodríguez-Campos y Azorín, 2007; Zheng y col., 2007). Este proceso de regulación genética puede ser alterado por la infección de diversos virus, dando lugar a manifestaciones patológicas. Por ejemplo, se han descrito cambios en los niveles de determinados microRNAs (miRNAs), como el miR158 en plantas de *Brassica rapa* infectadas con el virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) (He y col., 2008) mientras que plantas de tomate infectadas con el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*, TYLCV) mostraban alteraciones de los niveles de los miR159, miR164 y miR171 (Naqvi y col., 2008). Por otra parte, se ha encontrado que una o más proteínas virales pueden actuar como supresoras del silenciamiento génico de la planta (VSR) y que además, en muchos casos, son determinantes de patogenicidad. Por ejemplo, la P21 del virus del amarillamiento de la remolacha (*Beet yellows virus*, BYV)

(Chapman y col., 2004), la HC-Pro de diversos potivirus como el PPV y del virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) (Sáenz y col., 2001; Tenllado y col., 2003; Lin y col., 2007) y la P25 del PVX (Lu y col., 2004; Aguilar y col., 2015). Algunos virus presentan varias proteínas VSR como la P20, P23 y CP del CTV (Lu y col., 2004). En la Familia *Bromoviridae*, a la que pertenece el PMoV, se sabe que la proteína 2b del CMV, TAV y AV-2 son proteínas VSR (Shimura y col., 2013).

Por otro lado, existen ejemplos de virus que codifican proteínas que actúan como determinantes de patogenicidad pero que no intervienen en el mecanismo de silenciamiento génico. Entre estas se encuentran las MPs de algunos virus; determinados cambios de aminoácidos en la MP del BMV (Rao y Grantham, 1994), el TGMV (Saunders y col., 2001) y el TYMV (Tsai y Dreher, 1993) están relacionados con un aumento en la severidad de los síntomas. En el género *Ilarvirus*, se han identificado en la MP de aislados de PNRSV procedentes de cerezo unos aminoácidos característicos de los aislados pertenecientes a un patotipo viral severo (Hammond y Crosslin, 1998). Por otro lado, el análisis de mutaciones espontáneas junto a la utilización de transcritos infecciosos procedentes de clones de cDNA ha permitido demostrar que algunas mutaciones puntuales en la MP híbrida de CCMV y BMV son responsables de la adaptación de los virus de plantas a huéspedes no permisivos (Mise y col., 1993; de Jong y Ahlquist 1995; Mise y Ahlquist 1995; Fujita y col., 1996; Sasaki y col., 2001), lo que implica directamente a las MPs en la determinación de la especificidad del huésped. Igualmente, se ha encontrado que las CPs de algunos virus pueden actuar como determinantes de patogenicidad. Por ejemplo, determinadas mutaciones puntuales en la CP del TMV, TCV, CMV y BMV afectan a la expresión de síntomas en sus respectivos hospedadores (García y Pallás, 2015).

Finalmente, también se ha encontrado que los propios ácidos nucleídos virales pueden actuar como determinantes de patogenicidad. Por ejemplo, en algunos tombusvirus la excesiva acumulación de siRNAs derivados de una molécula defectiva de RNA viral, interfieren con la actividad de la proteína P19 del virus, que actúa como supresora del silenciamiento génico (Havelda y col., 2005). Por otra parte, un siRNA derivado de una molécula satélite del CMV actúa reprimiendo la expresión de un gen implicado en la síntesis de clorofila, lo que causa un amarillamiento general de la planta (Shimura y col., 2011; Smith y col., 2011).

En este trabajo hemos estudiado el papel que juegan las proteínas CP, MP y 2b de PMoV (aislado CR8) en la inducción de síntomas. Para ello, estas proteínas se expresaron en plantas de *N. benthamiana* mediante un vector viral que contiene la secuencia completa del genoma del PVX y que ha sido modificado para permitir la expresión de proteínas de interés durante la infección viral (Baulcombe y col., 1996). Por otro lado, y dada la estrecha relación entre inducción de síntomas y supresión de silenciamiento génico, también hemos estudiado la posible actividad VSR de estas proteínas mediante un sistema de complementación de movimiento viral empleando una construcción basada en un mutante del TCV (Powers y col., 2008).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Amplificación y clonaje de los genes de la CP, MP y 2b en el vector pGR107

A partir de extractos de ácidos nucleicos obtenidos de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el aislado CR8 de PMoV se amplificaron mediante RT-PCR los genes de la CP, MP y 2b del virus utilizando los cebadores con las dianas de restricción *ClaI* y *SalI* mostrados en la Tabla 4.1. Las extracciones de ácidos nucleicos y las RT-PCRs se realizaron como se describe en el apartado 1.2.2 del Capítulo 1. Los respectivos productos de PCR y el vector pGR107 (cedido por el Dr. Carmelo López) (Figura 4.1) se incubaron con las enzimas de restricción *ClaI* y *SalI* (Fermentas, Canadá) a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante y se ligaron empleando la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, USA) como se describe en el apartado 2.2.2 del Capítulo 2. Los productos de la ligación correspondientes a las construcciones de pGR107 recombinantes se emplearon para transformar células de la cepa *DH5'α* de *E. coli* mediante electroporación (apartado 2.2.2, Capítulo 2). Las colonias de bacterias transformadas se crecieron en medio LB. con kanamicina (50 µg/ml) durante 24 h. Finalmente, las construcciones recombinantes (pGR107:CP, pGR107:MP y pGR107:2b) se purificaron mediante el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Alemania) y se secuenciaron para confirmar su integridad (apartado 2.2.2, Capítulo 2)

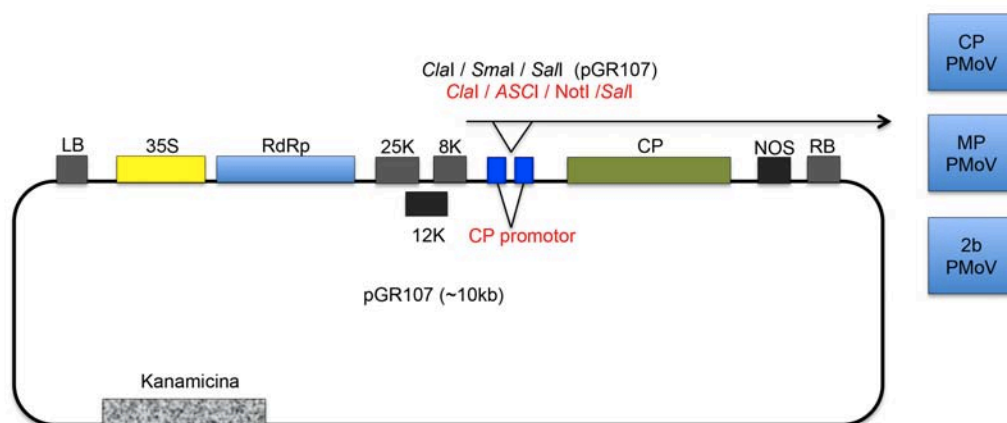


Figura 4.1. Representación esquemática del vector pGR107 basado en la secuencia del virus X de la patata (PVX) utilizado para expresar las proteínas de movimiento (MP), de cubierta (CP) y 2b del virus del moteado de la parietaria (PMoV).

Cebadores	Secuencia (a)	Región	Diana restricción	Tamaño
PAT CP F	AGTATCGAT ATGTCTTCGAGTCAAGG	CP	<i>ClaI</i>	615 pb
PAT CP R	ACA GTCGAC TCATTGGTTCCCGTCCT	CP	<i>SaII</i>	
PAT MP F	AGTATCGATATGGCATTGTTCCTACGAAG ACC	MP	<i>ClaI</i>	885 pb
PAT MP R	ACA GTCGAC TCA ACT GGA ATC ACC CGA CC	MP	<i>SaII</i>	
PAT 2b F	ATA ATCGAT ATGATGTTTATTCCAATC	2b	<i>ClaI</i>	621pb
PAT 2b R	ACA GTCGAC TCACGTTGTGGAACAACC	2b	<i>SaII</i>	
EV-MP F	AAACCATGGCATTGTTCCTACGAAG	MP	<i>NcoI</i>	885 pb
EV-MP R	ACAGCTAGC ACT GGA ATC ACC CGA CCC	MP	<i>NheI</i>	
EV- CP F	AGT CCGATGG TGTCTTCGAGTCAAGG	CP	<i>NcoI</i>	615 pb
EV- CP R	AGTGCT AGCTCATTGGTTCCCGTCCT	CP	<i>NheI</i>	
EV-2b F	AGTCCATGGTGATGTTTATTCCAATC	2b	<i>NcoI</i>	621 pb
EV-2b R	AGTGCTAGCTTACGTTGTGGAACAACC	2b	<i>NheI</i>	
CP-PVX F	AAGATGTCGGCACCAGCTAGCACAACA	CP-PVX		714 pb
CP-PVX R	ACATTATGGTGGTGGGAGAGTGACAAC	CP-PVX		714 pb

(a) Los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias del aislado CR8 (FJ858203 y FJ858204) y de PVX (AF111193) disponibles en el GenBank.

Tabla 4.1. Cebadores usados para amplificar los genes que codifican . la proteína de movimiento (MP), de cubierta (CP) y 2b del aislado CR8 del virus del moteado de la parietaria (PMoV) y elaborar las

correspondientes construcciones genéticas en los vectores pGR107 y pMOG. También se indican los cebadores usados para amplificar el gen de la proteína de cubierta (CP) de PVX utilizado para la síntesis de la ribosonda de los ensayos con las construcciones pGR107. En negrita se indican las secuencias del virus mientras que las correspondientes a las dianas de restricción están subrayadas.

4.2.2. Clonaje de los genes de la CP, MP Y 2b de PMoV en el vector binario pMOG

Los genes de la CP, MP y 2b de PMoV fueron amplificados por RT-PCR a partir de extractos de ácidos nucleicos obtenidos de plantas de *N. benthamiana* infectadas con el aislado CR8 de PMoV (apartado 1.2.2, Capítulo 1) usando los cebadores mostrados en la Tabla 4.1, que contenían los sitios de restricción *NcoI* y *NheI*. Los productos de PCR obtenidos y el vector pSK35S que contiene el promotor 35S del CaMV se digirieron con *NcoI* y *NheI* (Thermo Scientific, USA), durante 2 h a 37 °C y posteriormente se ligaron como se ha descrito anteriormente. Las construcciones recombinantes se introdujeron en células de *E. coli* cepa *DH5'α* mediante electroporación y las colonias de bacterias transformadas se seleccionaron como se describe en el apartado 2.2.2 del capítulo 2

Las construcciones resultantes pSK:35S:CP, pSK:35S:MP y pSK:35S:2b se purificación (apartado 4. 2.1 de este capítulo) y a partir de éstas se extrajeron los respectivos casetes de expresión mediante digestión con la enzima *HindIII* (New Englan BioLabs, USA) a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. Los castes de expresión se introdujeron en el vector binario pMOG, previamente linearizado con *HindIII* mediante ligación con la enzima T4 DNA ligasa (apartado 2.2.2, capítulo 2) dando lugar a las construcciones pMOG:CP, pMOG:MP y pMOG:2b. A continuación, se transformaron células de *E. coli* cepa *DH5'α* con cada una de las construcciones mediante electroporación (apartado 2.2.2, capítulo 2). Los plásmidos se purificaron con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Alemania) descrita en que apartado 2.2.2 del Capítulo 2. La construcción pMOG-HC-Pro, que contenía el supresor de silenciamiento génico del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) y que se utilizó como control positivo de supresión de silenciamiento génico, estaba disponible en el laboratorio. Como control negativo se utilizó el vector pMOG sin ningún inserto (pMOG-θ).

4.2.3. Agroinfiltración de las construcciones en plantas de *N. benthamiana*

Células de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa C58 se transformaron mediante electroporación (apartado 3.2.6, Capítulo 3) con las construcciones recombinantes del vector pGR107 (pGR107:CP, pGR107:MP, pGR107:2b y pGR107- θ), pMOG (pMOG:CP, pMOG:MP, pMOG:2b, pMOG-HC-Pro, pMOG- θ) y PZP-TCVs-GFP. La selección de colonias se realizó mediante crecimiento en medio LB sólido a 28 °C durante 48 h con los antibióticos kanamicina (50 ug/ml) y rifampicina (25 ug/ml) para las bacterias transformadas con pGR107 y pMOG, y espectinomicina (50 ug/ml) y rifampicina (50 ug/ml) para las transformadas con PZP-TCVs-GFP. Posteriormente, las células bacterianas transformadas se crecieron en LB líquido con los con los antibióticos mencionados anteriormente a 28° C hasta alcanzar una OD= 0,6 (600 nm) y se concentraron mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 min y se resuspendieron en tampón de infiltración (apartado 3.2.6, Capítulo 3) que contenía 150 μ g/ml de acetosiringona. Tras una incubación de 3 h en el tampón, se agroinfiltraron hojas jóvenes y totalmente expandidas de plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas de edad tal y como se describe en el apartado 3.2.6 del Capítulo 3.

En los ensayos con las construcciones de pGR107 se agroinfiltraron 20 plantas por cada una de las construcciones a una OD= 0.5 (600 nm) de cultivo celular en tampón de agroinfiltración. Como control, en estos ensayos se utilizó el vector viral pGR107 sin ningún inserto (pGR107- θ). En el ensayo de complementación mediante co-infiltración se utilizaron tres plantas para cada construcción y en cada planta se agroinfiltraron tres hojas con una mezcla de cultivos de células transformadas con la construcción PZP-TCVs-GFP (OD= 0.025) y con las construcciones de pMOG (OD= 0.5) (Figura 4.2, panel B). Para el caso del ensayos de complementación empleando transcritos de TCVs-GFP, también se utilizaron tres plantas y se agroinfiltraron tres hojas por planta de cada una de las construcciones de pMOG (OD= 0.5) en tampón de infiltración. Las hojas se infiltraron a presión por el envés de la hoja, con una jeringa sin aguja abarcando el total de la superficie con una o varias entradas.

4.2.4. Inoculación de plantas con transcritos de RNA

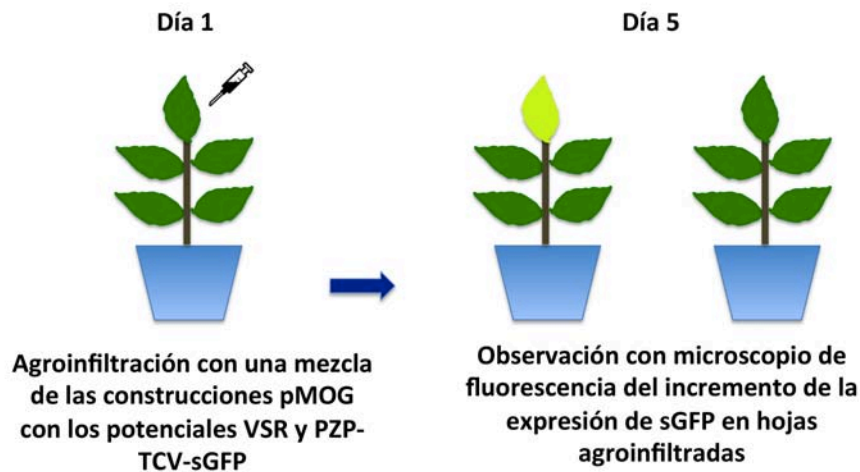
En los ensayos de complementación empleando transcritos de TCVs-GFP se inocularon mecánicamente tres hojas (previamente agroinfiltradas con las construcciones de pMOG) por cada planta de *N. benthamiana* con 5 μ g/hoja de

transcritos de RNA obtenidos a partir de la construcción PZP-TCV-sGFP (Figura 4.2 panel A). Para realizar la transcripción, el plásmido fue linearizado mediante el enzima *Pst*I (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y la transcripción se hizo con la T7 RNA polimerasa (Invitrogen, USA) como se describe en el apartado 2.2.5 del Capítulo 3. Los transcritos se inocularon mecánicamente en las mismas hojas de las plantas de *N. benthamiana* previamente infiltradas con las construcciones pMOG:CP, pMOG:MP, pMOG:2b, pMOG-HC-Pro y pMOG- θ . La expresión de la GFP en los sitios de infección se visualizó y fotografió mediante CLSM. El área de los focos se midió usando el software Image J.

4.2.5. Extracción y análisis de RNA

Los RNAs virales se extrajeron a partir de aproximadamente 100 mg de tejido fresco hojas apicales de *N. benthamiana* con síntomas usando el reactivo TRIZOL (apartado 1.2.2, Capítulo 1). Los RNAs fueron sometidos a una electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de agarosa al 1% con formaldehído (Sambrook y col., 1989) y se transfirieron mediante capilaridad a membranas de nylon donde se fijaron mediante luz UV (apartado 3.2.5, Capítulo 3). Las membranas se hibridaron con una sonda de RNA marcada con digoxigenina correspondiente al gen de la CP del PVX como se describe en el apartad 3.2.7 del Capítulo 3. La síntesis de la ribosonda se realizó a partir de ORF correspondiente a la CP de PVX (plásmido pGR107), el cual se obtuvo mediante una reacción de PCR (apartado 1.2.2, Capítulo 1) en presencia de la pareja de cebadores CP-PVX -1F y CP-PVX -1R (Tabla 4.1). El producto de PCR se purificó (apartado 1.2.2, Capítulo 1) y se insertó en el plásmido PTZ57R/T (Thermo Scientific, EE.UU) en la orientación correcta (apartado 3.2.5 Capítulo 3). La transcripción en presencia de DIG, la hibridación y los procedimientos de detección se llevaron a cabo como describe en los apartados 3.2.3 y 3.2.5 del Capítulo 3.

A Ensayo de co-infiltración con PZP-TCV-sGFP



B Ensayo de complementación con TCV-sGFP

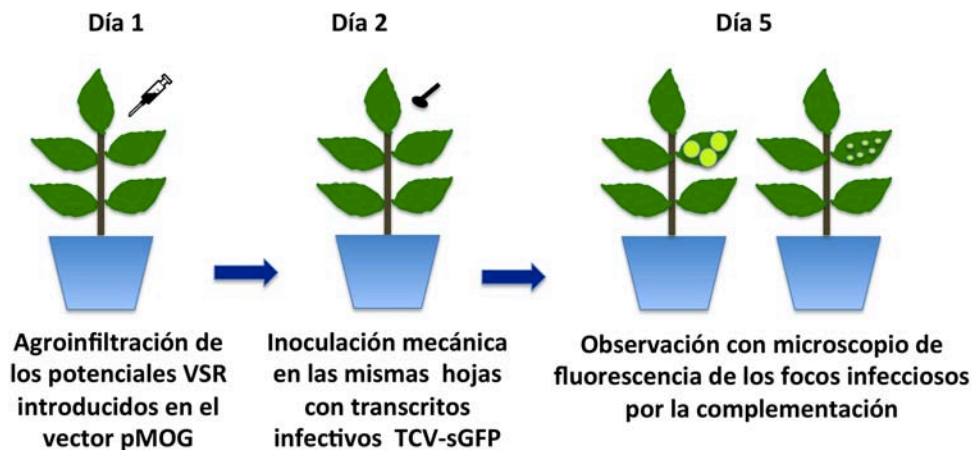


Figura 4.2. Representación esquemática de las estrategias seguidas para realizar los estudios de supresión de silenciamiento génico (VSR) mediante complementación *in trans* co-inoculando mediante agroinfiltración la construcción PZP-TCV-sGFP con cada una de las construcciones en pMOG (panel A) o mediante agroinfiltración de PZP-TCV-sGFP y transcritos infecciosos del TCV-sGFP (panel B).

4.2.6. Análisis ELISA

Para detectar la CP del PVX en las plantas agroinfiltradas con pGR107, se utilizó un anticuerpo comercial (Loewe, Alemania) contra esta proteína. La preparación

de los extractos, el tapizado con los anticuerpos, la incubación con los extractos, los lavados, el revelado de las placas y la lectura de las placas se realizó como se describe en el apartado 2.2.1 del Capítulo 2. Para detectar la CP de PMoV se utilizó un anticuerpo desarrollado por Aparicio y col (2009). En este caso se utilizó el ELISA indirecto, donde en primer lugar se incuba la placa con la muestra vegetal, posteriormente se adiciona el bloqueante y posteriormente el anticuerpo. De aquí en adelante es igual a la metodología descrita en el apartado 2.2.1 del Capítulo 2. Se consideraron como positivas aquellas muestras cuya lectura media era al menos tres veces superior a la lectura media del control negativo. Las diferencias entre los valores de absorbancia se analizaron mediante el test estadístico t-student ($p < 0.001$).

4.2.7. Condiciones de crecimiento de las plantas

Las plantas se mantuvieron en cámara en las mismas condiciones a las descritas en el apartado 2.2.1 del Capítulo 2. En el caso de las plantas agroinfiltradas con las construcciones basadas en pGR107, se realizó la observación de los síntomas semanalmente, mientras que en el caso de las plantas agroinfiltradas e inoculadas con las construcciones basadas en TCV, la fluorescencia se observó a los 4 d.p.i

4.3. Resultados

4.3.1. Implicación de la CP, 2b y la MP del PMoV en la inducción de síntomas en plantas de *N. benthamiana*

Para determinar si las proteínas CP, MP y 2b de PMoV podían ser inductores de síntomas, se llevó a cabo un estudio de expresión transitoria de estas proteínas en plantas de *N. benthamiana*, empleando el vector pGR107 el cual contiene el PVX como sistema de expresión (Figura 4.1) (Baulcombe y col., 1996). De este modo se analiza si la versión del PVX que expresa el potencial determinante de patogenicidad muestra una mayor severidad de los síntomas que el vector PVX control, que induce síntomas semejantes al del virus del cual proviene (Vance y col. 1995, Saénz y col., 2001). Todas las plantas agroinfiltradas con las diferentes construcciones de pGR107 (20 plantas por cada construcción) resultaron infectadas con PVX, aunque la sintomatología observada difirió dependiendo de la construcción introducida. Las plantas agroinfiltradas con la construcción pGR107:CP desarrollaron a los 11 d.p.i. fuertes síntomas de mosaico, enrollado foliar y deficiencia en el crecimiento, similares a los observados en plantas de

N. benthamiana infectadas con los aislados T32 y CR8 de PMoV. Además aparecían lesiones necróticas tanto en las hojas agroinfiltradas como en las apicales de nueva formación como sucede en plantas de *N. glutinosa* y tomate infectadas con el aislado CR8 o en plantas de *C. quinoa* infectadas con el aislado T32 (Figura 4.3, paneles A, B y C), mientras que las plantas agroinfiltradas con pGR107- Θ usadas como control tenían un crecimiento normal y sólo mostraban un suave mosaico típico de la infección por PVX que desaparecía a los 16-20 d.p.i. (Figura 4.3, paneles J y K). Con respecto a las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGR107:MP y pGR107:2b, todas las plantas mostraron síntomas de mosaico foliar y algunas mostraron enrollado en hojas apicales a 11 d.p.i. (Figura 4.3, paneles D-I), más intensos que los observados en las respectivas plantas control agroinfiltradas con pGR107- Θ . En ningún caso las plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con pGR107:MP y pGR107:2b mostraron lesiones necróticas ni deficiencia en el crecimiento de la planta, como sucedía con las plantas agrionfiltradas con pGR107:CP. La acumulación de las distintos construcciones se confirmó mediante *Northern blot* empleado una sonda diseñada a partir de una región de PVX correspondiente al gen que codifica para la CP del virus (Figura 4.4). Se pudo observar un retraso en la movilidad de los sgrRNAs generados a partir de las construcciones pGR107:CP, pGR107:MP y pGR107:2b con respecto a generado a partir de pGR107- Θ , como consecuencia del mayor tamaño de los sgrRNAs que contenían los genes del PMoV respecto del PVX usado como control (Figura 4.4). En el caso de la construcción pGR107:CP, la expresión de la CP de PMoV se confirmó mediante ELISA empleando un anticuerpo contra esta proteína viral en todas las plantas agroinfiltradas. Para descartar que las diferencias de sintomatología observadas en las plantas agroinfiltradas pudieran ser consecuencia de diferencias en el nivel de multiplicación viral, se estimó la concentración de PVX en todas las plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas mediante la técnica ELISA usando un anticuerpo específico contra la CP del PVX. Los valores de absorbancia obtenidos fueron de 1.7-1.9, similares a los controles (Figura 4.5) no encontrándose diferencias significativas en los análisis realizados empleando el estadístico t-student ($P < 0.001$).

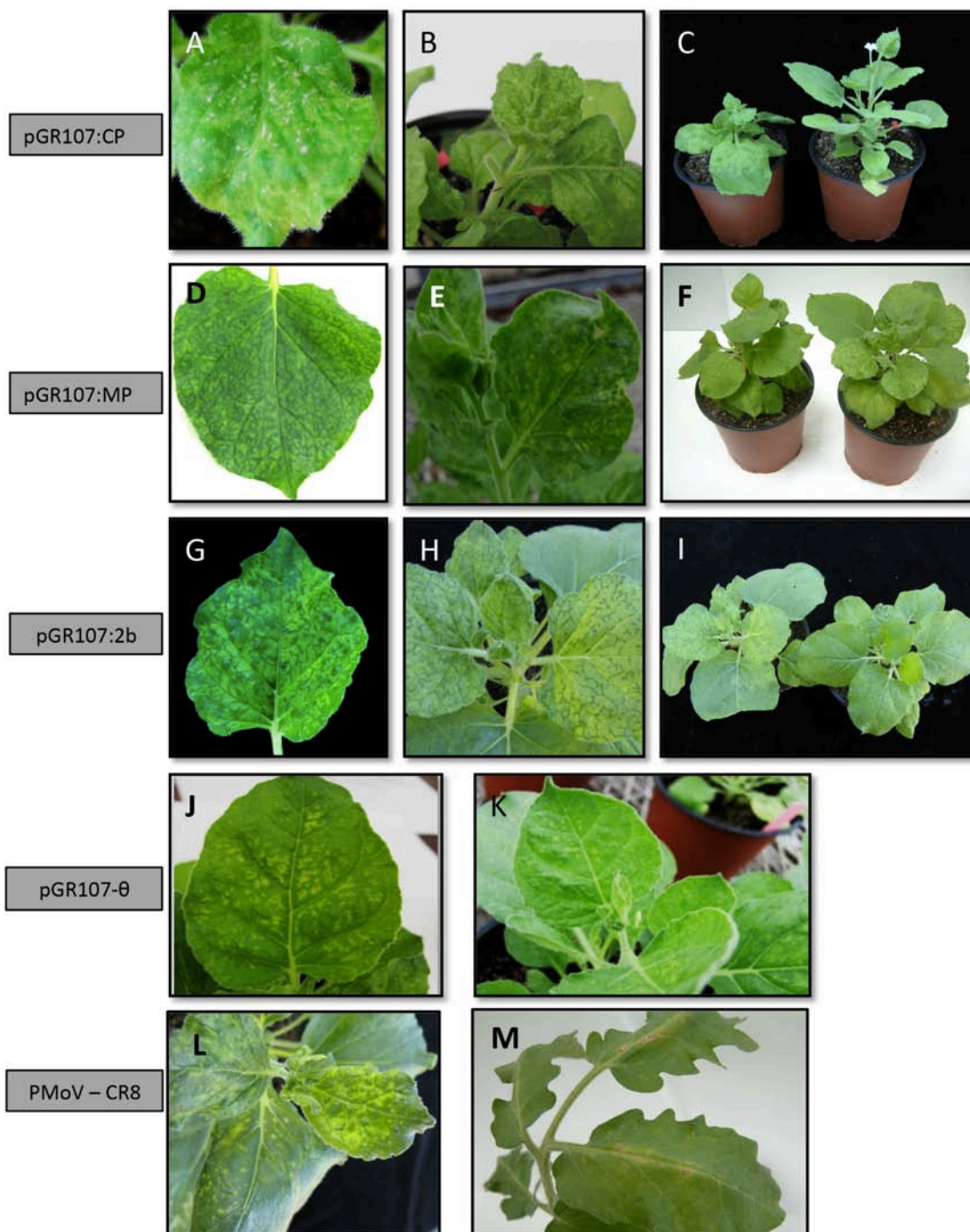


Figura 4.3. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones pGR107:CP (paneles A, B y C), pGR107:MP (paneles D, E y F), pGR107:2b (paneles G, H e I) y pGR107:θ (paneles J y K), correspondientes a la proteína de cubierta (CP), la de movimiento (MP) y 2b del asilado CR8 del virus del moteado de la parietaria (PMoV). Como control de infección por el virus X de la patata (PVX) se utilizó la construcción pGR107-θ (paneles J y K). El panel C muestra la clara diferencia de tamaño de las plantas agroinfiltradas con pGR107:CP (izquierda) y pGR107-θ (derecha).

Los paneles L y M muestran los síntomas que induce el aislado CR8 de PMoV en plantas de *N. benthamiana* y Tomate, respectivamente.

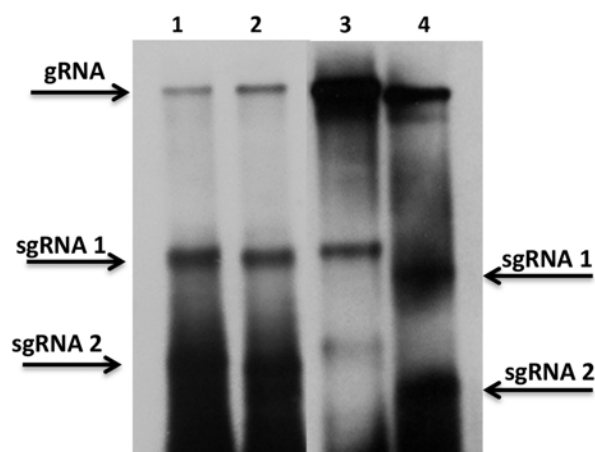


Figura 4.4. Ensayos *Northern blot* de extractos de ácidos nucleicos obtenidos a partir de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con pGR107:CP (carril 1), pGR107:2b (carril 2), pGR107:MP (carril 3) y pGR107- θ (carril 4) empleando una sonda correspondiente a la proteína de cubierta (CP) del virus X de la patata (PVX). Se indican las posiciones del RNA genómico (gRNA) y de los subgenómicos (sgRNA 1 y sgRNA 2).

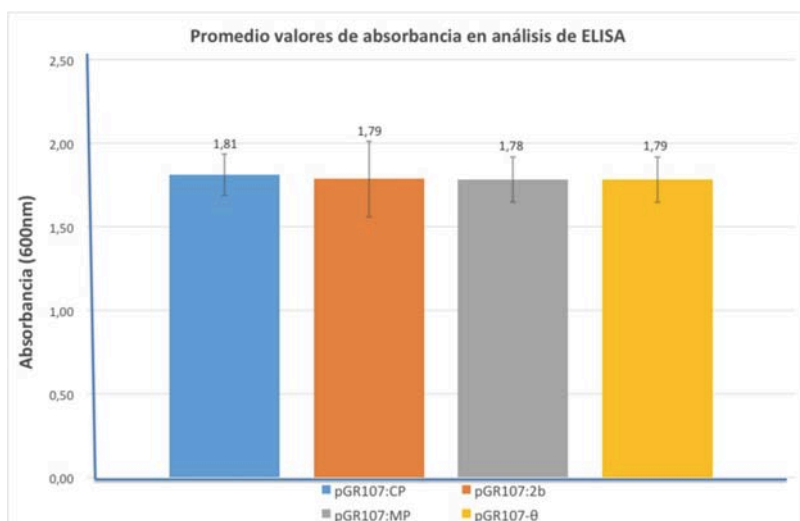


Figura 4.5. Representación gráfica de los niveles de absorbancia medidos obtenidos mediante ELISA empleando un anticuerpo contra la CP del virus X de la patata (PVX) en plantas de *N. benthamiana*

agroinfiltradas con las construcciones pGR107:CP, pGR107:MP, pGR107:2b y pGR107107- Θ (n=20: p<0.001).

4.3.2. Estudio de supresión de silenciamiento génico de las proteínas CP, 2b y MP de PMoV

Considerando que muchas de las proteínas virales que actúan como VSR son también determinantes de patogenicidad decidimos analizar si los síntomas inducidos por las proteínas CP, MP y 2b de PMoV podían estar relacionados con una posible actividad de supresión. Para ello, se llevó a cabo un experimento de complementación mediante una estrategia que utiliza el TCV como sistema experimental (Powers y col., 2008). Estos autores construyeron un clon infectivo del TCV, en el cual se reemplazó la CP, que es un reconocido supresor de silenciamiento génico, por el gen de la GFP. La construcción resultante (pZP-TCV-sGFP) es incapaz de moverse, de modo que, si se suministra en *trans* un VSR de cualquier otro virus, el movimiento se restablece visualizándose mediante la fluorescencia emitida por la GFP. Por tanto, este sistema es válido para analizar la capacidad como supresora de silenciamiento de una proteína determinada (Powers y col., 2008). En un primer ensayo se expresaron mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* las construcciones pMOG:CP, pMOG:MP y pMOG:2b (Figura 4.6). Como controles negativo y positivo del ensayo se utilizaron las construcciones pMOG- Θ y pMOG:HC-Pro, correspondientes al plásmido vacío y al plásmido con la proteína HC-Pro, respectivamente. Tras 24 h, las hojas infiltradas se inocularon mecánicamente con transcritos de RNA viral obtenidos a partir de la construcción de pZP-TCV-sGFP (Figura 4.2, panel A). A los 3 d.p.i. se pudo comprobar mediante microscopía de fluorescencia que, al igual que sucedía con la construcción pMOG- Θ , en ninguna de las plantas agroinfiltradas con las construcciones pMOG:CP, pMOG:MP y pMOG:2b se restablecía el movimiento del TCV-sGFP quedando la fluorescencia confinada a unas pocas células individuales (Figura 4.6, paneles A-H). Contrariamente, en las plantas agroinfiltradas con la construcción pMOG:HC-Pro se observaron grandes zonas de fluorescencia que indicaban que se había restablecido el movimiento intercelular de TCV-sGFP (Figura 4.6, paneles I-J). La medición de 30 focos de infección mostraron que la superficie media de éstos en las plantas agroinfiltradas con pMOG- Θ , pMOG:CP, pMOG:MP y pMOG:2b fue de 12, 16, 4 y 9 μm^2 respectivamente, mientras que en el caso de pMOG:HC-Pro fue casi 30 veces

mayor con una superficie media de $371 \mu\text{m}^2$ (Figura 4.6). Estos resultados sugerían que las proteínas CP, 2b y MP no actuaban como VSRs.

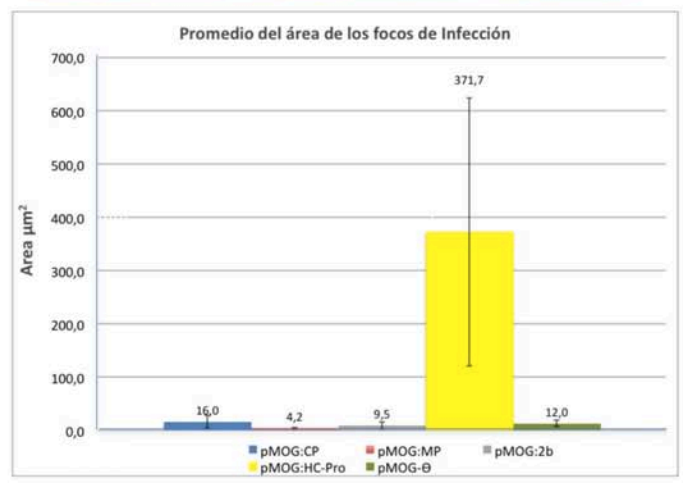
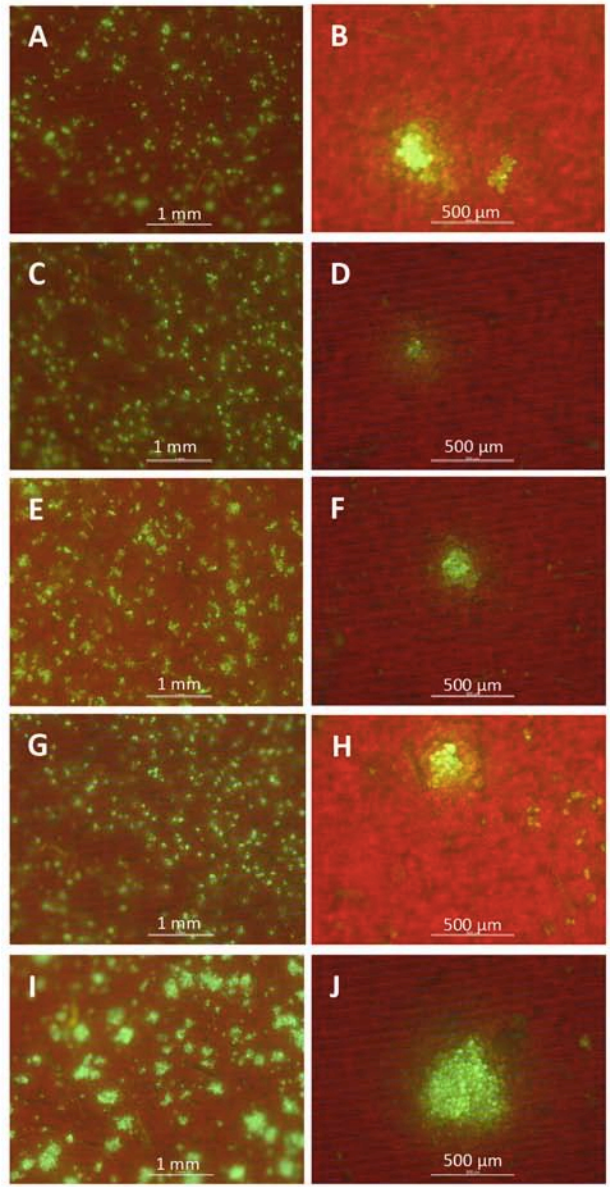


Figura 4.6. Imágenes de fluorescencia de los focos de infección producidos por transcritos de TCV-GFP en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas previamente con las construcciones pMOG:CP (paneles A y

B), pMOG:MP (paneles C y D), pMOG:2b (paneles E y F) y los respectivos controles pMOG- Θ (paneles G y H) y pMOG:HC-Pro (paneles I y J). En la parte inferior de la figura se representa el gráfico del promedio del área de dichos focos de infección (n=30, p<0.001).

Estos resultados se confirmaron mediante un segundo ensayo en el que se agroinfiltró la construcción viral pZP-TCV-sGFP con cada una de las construcciones en pMOG conteniendo secuencias de PMoV (pMOG:CP, pMOG:MP, pMOG:2b) y de los respectivos controles (pMOG: Θ y pMOG:HC-Pro) (Figura 4.2 panel B). A los 4 d.p.i, se pudo observar que el movimiento de la construcción TCV-sGFP solo se restableció en las plantas agroinfiltradas con pMOG-HC-Pro (Figura 4.7). Por tanto, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en el ensayo en el que se utilizaron transcritos de TCV y confirmaron que las proteínas CP, MP y 2b de PMoV no presentaban actividad VSR.

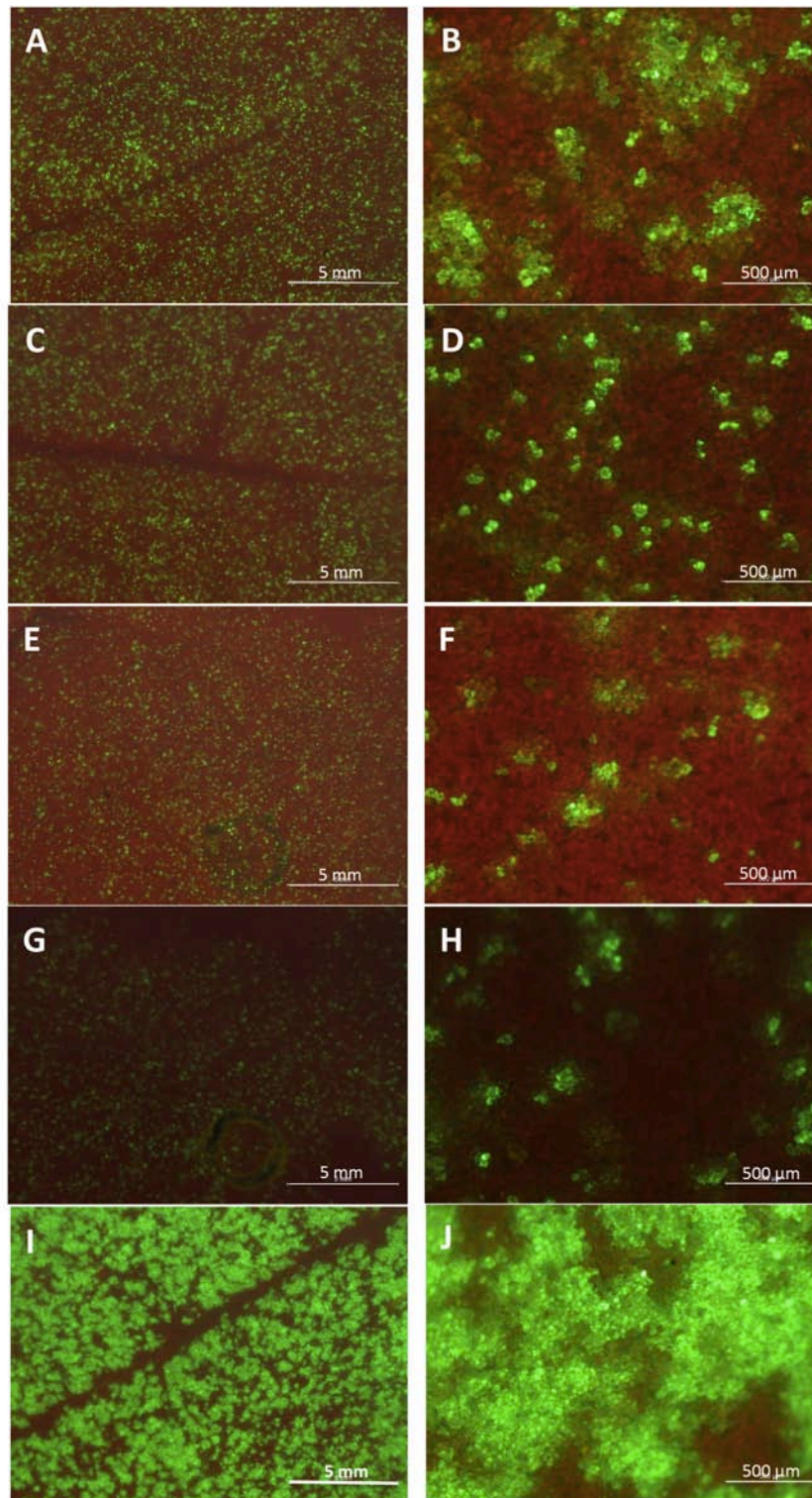


Figura 4.7. Imágenes de fluorescencia de los focos de infección producidos en plantas de *N. benthamiana* co- infiltradas con la construcción PZPTCV-sGFP y las construcciones pMOG:CP (paneles A y B), pMOG:MP (paneles C y D), pMOG:2b (paneles E y F), pMOG- Θ (paneles G y H) y pMOG:HC-Pro (paneles I y J).

4.4. Discusión

La sintomatología inducida por un virus se produce como consecuencia de interferencias producidas por factores del patógeno con diferentes procesos fisiológicos de la planta hospedadora. El sistema de expresión transitoria basado en el PVX ha sido ampliamente utilizado para identificar determinantes virales de patogenicidad (Vance y col. 1995, Saéñz y col., 2001; Amin y Falk, 2009; Amin y col 2011a, 2011b; Tahir y Mansoor, 2011). Así, este trabajo hemos empleado este sistema de expresión para analizar la capacidad de las proteínas CP, MP y 2b para actuar como determinantes de patogenicidad. Los resultados obtenidos muestran que la CP del aislado CR8, induce en plantas de *N. benthamiana* síntomas intensos de enanismo, mosaico, enrollado y necrosis foliar. Estos síntomas son muy similares a los que ocasiona dicho aislado en plantas de tomate (Galipienso y col., 2005), aunque nunca se han podido observar lesiones necróticas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con este aislado (Capítulo 2). Por otra parte, los síntomas inducidos por la MP y la 2b fueron más suaves consistiendo en mosaico y enrollado foliar muy similares a los inducidos por el PVX, pero a diferencia de este, en el que la sintomatología desaparecen a los 7-10 d.p.i., la intensidad de los síntomas se mantenía en el tiempo en las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGR107:MP y pGR107:2b. En el caso de las plantas agroinfiltradas con la construcción pGR107:CP, la expresión de la CP fue detectada mediante ELISA empleando un anticuerpo contra la CP (Aparicio y col., 2009) mientras que en el caso de las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGR107:MP y pGR107:2b, la expresión de ambas proteínas solo se pudo suponer mediante la detección de los respectivos sgrRNAs, ya que hasta la fecha no se dispone de anticuerpos específicos. La inducción de síntomas similares a los producidos por el correspondiente virus mediante la expresión de una de sus proteínas en el sistema PVX ha sido descrita en el caso de la proteína de transporte nuclear del virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) (Hussain y col., 2005), la proteína P23 del virus del CTV (Amin y Falk., 2009) y la proteína Hc-PRO del PPV (González-Jara y col., 2005). Asimismo, se ha demostrado que en algunos begomovirus varias de sus proteínas contribuyen a la inducción de síntomas (Amin y col., 2011b). Por otro lado, nuestros resultados indicaron que los síntomas inducidos por pGR107:CP, pGR107:MP y pGR107:2b, no estarían asociados a un mayor nivel de multiplicación viral, ya que los valores de ELISA obtenidos con el anticuerpo contra la CP de PVX fueron similares en

las plantas agroinfiltradas con todas las construcciones y el control pGR107- Θ . Este resultado es similar al observado con la expresión transitoria con el sistema PVX de varias proteínas del *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) que indujeron la aparición de síntomas sin afectar a los niveles de acumulación del PVX (Amin y col., 2011a).

Numerosos determinantes de patogenicidad actúan como VSRs por lo que resultaba muy importante determinar si CP, MP y 2b presentaban actividad VSR. Con este objetivo se utilizó el sistema de complementación de la construcción TCV-GFP descrito por Powers y colaboradores (2008). Estos autores construyeron un clon infectivo del TCV, en el cual se reemplazó la CP, que es un reconocido VSR, por el gen de la GFP. La construcción resultante (pZP-TCV-sGFP) es incapaz de moverse, pero si se suministra en *trans* un VSR de otro virus, el movimiento se restablece visualizándose gracias a la fluorescencia emitida por la GFP. Por tanto, este sistema es válido para analizar la capacidad supresora de una proteína determinada (Powers y col., 2008). Estos autores también mostraron que este sistema era más sensible que el clásico sistema de co-expresar simultáneamente el hipotético VSR y el gen de la GFP en plantas de *N. benthamiana*. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las tres proteínas de PMoV estudiadas actuaba como VSR, pues ninguna de ellas era capaz de restablecer el movimiento del mutante de TCV. Recientemente se ha demostrado que la co-expresión de los supresores de silenciamiento P19 de TBSV, la proteína HC del virus de la Sharka (Plum Plox Virus) y 2b de CMV junto con el PVX induce una respuesta hipersensible (HR) en *N. benthamiana* relacionada con un aumento del nivel de expresión de P25, que es la proteína supresora de silenciamiento génico del PVX (Aguilar y col., 2015). Por otro lado, la expresión de la MP del BBTV que presenta actividad supresora también causa un incremento de la acumulación de PVX e induce la aparición de necrosis en *N. benthamiana* (Amin y col., 2011b). Aunque no podemos descartar totalmente que en las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGR107:CP, pGR107:MP y pGR107:2b se produzca un efecto sinérgico con PVX, nuestros resultados indican que la inducción de los síntomas causados por MP, 2b y CP incluyendo la necrosis inducida por esta última no estarían relacionados con un incremento de la actividad de P25 debido a una actividad VSR de las proteínas de PMoV y además esta actividad no sería necesaria para la inducción de los síntomas en plantas de *N. benthamiana*. De hecho, se ha descrito factores virales que intervienen en la inducción de síntomas en plantas hospedadoras que no suprimen el mecanismo de

silenciamiento génico. Entre ellas se encuentran las CPs del TMV, CMV y BMV (Dawson y col., 1988; Shintaku y col., 1992; Rao y Grantham., 1996).

La ausencia de actividad VSR de la proteína 2b demostrada en este trabajo coinciden con los obtenidos por door Peters (2009) mediante co-expresión transitoria de la proteína 2b con GFP. Sin embargo, en otros miembros de la Familia *Bromoviridae*, como el CMV, se sabe que 2b actúa como determinante de patogenicidad del virus, presenta actividad VSR y además está implicada en el movimiento local y sistémico del virus (Ding et al., 1995; Brigneti y col., 1998; Du et al., 2007). También la proteína 2b de los ilarvirus TAV y AV2 actúa como VSR (Anandalakshmi y col., 1998; Beclin y col., 1998; Brigneti y col., 1998; Simura y col., 2013).

Discusión general

Hasta la fecha, el PMoV ha sido un virus muy poco estudiado, a pesar de que infecta y causa daños en dos importantes cultivos como tomate y pimiento en zona del mediterráneo. Hasta el momento de la realización de esta tesis doctoral, había muy poca información sobre aspectos tan importantes como la variabilidad genética y biológica de este virus, así como los procesos que se establecen durante la infección sistémica del virus o la inducción de síntomas en las plantas hospedadoras. La generación de variabilidad en los genomas de los virus es un proceso necesario para su evolución, la adaptación a nuevas especies hospedadoras, rotura de los mecanismos de resistencia y para generar cambios en patogenicidad. Esta capacidad de variación genética es esencial y cuenta con varios mecanismos para conseguirlo: *i)* El cambio de secuencia mediante mutación, debida a la copia imperfecta por parte de las enzimas de replicación del material genético del virus parental y *ii)* la recombinación genética o reordenamiento de segmentos genómicos entre distintos virus o aislados virales, que puede jugar un papel significativo en la supervivencia del virus. En esta dirección, la comprensión de los procesos que generan diversidad genética y los procesos ecológicos que determinan la presión selectiva, pueden ayudar a establecer posibles intervenciones o determinar donde y cuando las medidas de control pueden ser más eficaces.

En el Capítulo 1 de esta Tesis hemos estudiado la diversidad genética y la estructura poblacional del PMoV así como las fuerzas implicadas en su evolución. Para ello se analizaron las secuencias nucleotídicas completas de los genes que codifican para la proteína 2b (RNA 2) y la CP (RNA 3) de 24 aislados de campo recolectados en España, Italia y Grecia y procedentes de tomate, pimiento y parietaria. Los árboles filogenéticos generados (ML, NJ y basados en la estadística Bayesiana) mostraban que los aislados se agrupaban en diferentes clados o linajes: uno de los clados (clado I) se componía de aislados italianos y los tres restantes (clados II-IV) agrupaban a los aislados españoles. El aislado griego GrT-1 utilizado en este estudio se incluía en el clado IV en el árbol filogenético de la CP, mientras que en el árbol filogenético del gen 2b, no se incluía en ninguno de los clados definidos, quedando como un aislado individual. El aislado GrT-1 era genéticamente más cercano a los clados que contenían los aislados españoles que para el clado I que contiene aislados italianos. Por tanto, la población española de aislados de PMoV no podía ser considerada como una población homogénea, frente a la población de aislados italianos, que sí lo era. La diversidad genética de toda la población de aislados de PMoV estudiada fue baja ($0,063 \pm 0.006$ y $0,062 \pm 0.006$ para la CP y 2b, respectivamente) pero dentro del rango de la mayor parte

de virus que infectan plantas (García-Arenal y col., 2001; Vives y col., 2002). Con respecto al género *Ilarvirus*, la diversidad genética de PMoV es mayor que la de otros virus con una distribución geográfica más amplia como el APLPV, PNRSV y CVV, mientras que la diversidad genética del PMoV solo es menor que la encontrada en el PDV (Aparicio y col., 1999; Herranz y col., 2008; Barone y col., 2010; Kalinowska y col., 2014). A pesar de que los virus de RNA tienen una tasa de mutación muy elevada, las fuerzas evolutivas, como la selección natural, actúan disminuyendo esta variabilidad notablemente. Por otro lado, la estructura de la población de PMoV no parecía estar correlacionada con el hospedador, puesto que los aislados que infectan tomate, pimiento y pimentaria se localizan en diferentes clados.

Los árboles filogenéticos de la CP y de la 2b mostraban incongruencias en la localización de alguno de sus aislados lo que podrían ser el resultado de intercambios genéticos entre ellos o que los dos genes están sometidos a diferentes presiones de selección. Los análisis realizados mostraron tres eventos de intercambio genético entre los aislados españoles de PMoV. Uno de ellos correspondía al ancestro de los aislados BP-1, TT-1, GT-1, GuiT-1 y ViT-1, que sería el resultado de un intercambio genético entre la CP de un aislado de origen desconocido y de la 2b de un aislado tipo BaT-1. El otro evento de intercambio genético podría haber ocurrido en un ancestro de los aislados BT-1 y TT-3, con la CP de un aislado del tipo TT-1 y la 2b de un aislado del tipo TT-2. Por último, el tercer evento de intercambio genético podría haber ocurrido en el ancestro de los aislados TT-2 y TT-4 con la CP de un aislado del tipo GeT-2 y la 2b de un aislado del tipo CR8. El intercambio genético, producido por fenómenos de recombinación y/o por reordenamientos entre segmentos genómicos en el caso de los virus con genomas segmentados, es una fuente de variabilidad genética común entre los virus de plantas, incluyendo la familia *Bromoviridae* (Lin y col., 2004). Se han encontrado evidencias de reordenamientos en ancestros de APLPV, AMV y PDV así como durante la formación de los géneros *Cucumovirus* y *Bromovirus* (Codoñer y Elena, 2008). Este fenómeno se produce cuando hay infecciones mixtas con diferentes aislados virales, o incluso con virus de especies diferentes. Finalmente, con respecto al estudio de la presión de selección ejercida en los genes de la CP y 2b, los valores del cociente N/S obtenidos (<1) indicaban que ambos genes estaban sometidos a una selección negativa o purificadora. Dichos valores estaban dentro del rango de los obtenidos para otros virus de plantas (García-Arenal y col., 2001). Este resultado se confirmó mediante el estudio del cociente N/S en posiciones individuales revelando que

en la CP había 3 posiciones bajo selección positiva o diversificadora y 44 bajo presión negativa o purificadora y que en la 2b había una posición con selección diversificadora y 34 bajo selección purificadora. Estos resultados mostraron que ambas proteínas estaban sometidas a presiones de selección que limitaban su variabilidad, debido a los importantes papeles que debían desempeñar en el ciclo vital de PMoV. La CP está implicada en la encapsidación del virus, y en el caso del ilarvirus PNRSV se sabe que interviene en el proceso de replicación del mismo (Aparicio y col., 2003). La proteína 2b actúa como supresor de silenciamiento génico en el ilarvirus AV 2 (Shimura y col., 2013) mientras que se desconoce su función en PMoV. Estudios de expresión transitoria de la 2b de PMoV en platas de *N. benthamiana* transgénicas que expresaban la proteína GFP (door Peters, 2009) y mediante complementación con un vector viral basado en la secuencia de TSV mostraron que 2b no actuaba como supresor local de silenciamiento. Sin embargo, este trabajo no fue concluyente puesto que no se pudo detectar la proteína 2b *in vivo* por no haber disponible ningún anticuerpo.

Con respecto a la variabilidad biológica existente entre aislados de PMoV, en esta tesis hemos caracterizado el aislado T32 y lo hemos comparado con el aislado CR8, obtenido a partir de plantas de tomate infectadas en la provincia de Barcelona. El aislado T32 pertenece a la población de aislados italianos que se agrupan en el clado I y que esta claramente separado de la población de aislados españoles que se agrupan en tres clados (II-IV) y del aislado Griego GrT-1, mas próximo filogenéticamente a los aislados españoles. Este aislado fue recogido en 1.979 en plantas de tomate de la localidad italiana de Turín (Italia) con síntomas de necrosis apical (Lisa y col., 1998), y es posiblemente el primer aislado de PMoV referenciado. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que el aislado T32 tenía un comportamiento biológico diferente al del aislado español CR8 (perteneciente al clado II para el árbol filogenético de la 2b y al clado IV para el árbol filogenético de la CP), ya que *i)* no infectó sistémicamente plantas de tomate y pimiento, *ii)* indujo síntomas diferentes a los del aislado CR8 en plantas de *N. glutinosa* y *C. quinoa* y *iii)* se observaron diferencias significativas en el número de plantas infectadas de *N. glutinosa* y *G. globosa* por ambos aislados. Por tanto, estas diferencias indicaban que T32 y CR8 eran biotipos o patotipos diferentes de PMoV. En este sentido, Lisa y col., (1998) mostraron que T32 y Pe1 tenían rangos de especies hospedadoras diferentes, considerándolos razas distintas del mismo virus, a pesar de que no disponían datos de secuencias genéticas. Con el objetivo de estudiar a nivel genético las diferencias del aislados T32 con respecto a los aislados CR8 y Pe1,

cuyas secuencias estaban disponibles en el GenBank en el momento de comenzar esta tesis, se procedió a secuenciar el genoma completo del aislado T32. Como era de esperar tras haber realizado el estudio filogenético de aislados PMoV, las identidades nucleotídicas de los tres RNAs genómicos fueron mayores con los RNAs del aislado Pe1 que con los del aislado CR8, siendo el RNA 2 el que mayor variación mostraba y el RNA 3 el menos variable. En cuanto a las proteínas virales, las diferencias más grandes se encontraron en la proteína 2b, cuyas identidades aminoacídicas oscilaron entre el 88.30% con la 2b de CR8 y el 98.54% con la de Pe1, lo que correspondía a 25 y 3 cambios de residuos, respectivamente. La proteína 2b desempeña funciones importantes relacionadas con la patogenicidad viral, movimiento y supresión de silenciamiento génico en otros miembros de la familia *Bromoviridae* como CMV (género *Cucumovirus*) y en el AV2 (género *Ilarvirus*) (Lewsey y col., 2009 Shimura y col., 2013) y recientemente se ha encontrado ningún varios tripletes de aminoácidos implicados en estos procesos en CMV (Nemes y col, 2014). En PMoV aún no se ha dilucidado el papel que puede jugar esta proteína viral aunque los estudios de expresión transitoria (door Peters, 2009) y complementariedad con el vector TCV llevados a cabo en este trabajo de tesis (Capítulo 4) mostraron que no tenía actividad supresora del silenciamiento génico. Por otra parte, los estudios de expresión en plantas de *N. benthamiana* con un vector viral basado en la secuencia de PVX, también realizados en esta tesis (Capítulo 4) mostraron que la proteína 2b podía ser un inductor de síntomas en esta especie hospedadora. La proteína más conservada fue la proteína P1 con identidades aminoacídicas del 97.08 % con respecto a la P1 del aislado CR8 y del 98.09% con la del aislado Pe1. Se detectaron algunos cambios de aminoácidos tanto en los dominios conservados metiltransferasa y NTPasa/helicasa, como fuera de ellos, aunque ninguno de ellos afectaba a los aminoácidos críticos s descritos en especies del grupo de los Alfavirus (Wang y col., 2005). Se ha descrito en el AMV que la mutación individual de algunos residuos conservados reducía la acumulación de las cadenas negativas y positivas de RNA (Vlot y col., 2002). En el BMV, una mutación en el dominio Metiltransferasa disminuía el nivel de acumulación viral (Ahola y col., 2000) y el cambio de una histidina (H) por una alanina (A) en el dominio NTPasa/helicasa bloquea totalmente la replicación del virus (Wang y col., 2005).

Por otra parte, también se detectaron cambios en el resto de proteínas que podrían estar relacionados con el cambio del comportamiento biológico de los aislados T32 y CR8. La P2 contiene el dominio funcional RNA polimerasa en el que se localiza

el motivo altamente conservado GDD (Koonin, 1991). Los aislados T32, CR8 y Pe1 no mostraron cambios en este motivo, pero sí en algunos aminoácidos de el dominio RNA polimerasa (I409V, F443V, I459V, H488L y L601P). Se ha descrito que mutaciones en el dominio RNA polimerasa de la P2 de CMV afectaba directamente a multiplicación viral y a los síntomas inducidos por CMV (Kim y Palukaitis, 1997; Tao y col., 2003). Mediante estudios con reordenantes de este virus, se ha relacionado el RNA 2 con la especificidad del hospedador (Takeshita y col., 1998). En el caso de la MP, hay descritos cambios de aminoácidos en la MP de diversos virus como CMV, TGMV y TYMV que pueden alterar notablemente la capacidad patogénica de estos (Tsai y Dreher, 1993; Takeshita y col., 2001; Saunders y col., 2001). También se han descrito cambios en la MP de BMV y PNRSV relacionados con la adaptación a hospedadores no permisivos (Mise y Ahlquist 1995; Fujita y col., 1996; Sánchez-Navarro y col., 1997; Sasaki y col., 2001). En la CP se observaron importantes diferencias entre aislados: la CP de los aislados T32 y CR8 tenían 16 aminoácidos menos que la de Pe1, como se había descrito previamente para otros aislados de PMoV (Galipienso y col., 2008). Sin embargo, esta diferencia en el tamaño de la CP no afectaba a la región situada entre los aminoácidos 14-34 de la proteína, implicada en el proceso de activación génica (Aparicio y col., 2003). En esta región se detectaron algunos cambios entre aislados, destacando un cambio (S16R) que suponía una pérdida de un residuo básico en el aislado Pe1 con respecto a CR8 y T32. Algunos estudios sugieren que el responsable de la interacción de esta proteína con las regiones 3'-NTR de los tres RNAs virales es un único residuo de arginina (R) en esta región de la CP (Ansel-McKinney y col., 1996; Swanson y col., 1998; Yusibov y Loesch-Fries, 1998). En PMoV, este residuo podría localizarse en la posición 37 en el aislado Pe1 (Pallás y col., 2013) y en la posición 21 en los aislados T32 y CR8, que está conservada. Dentro de la familia *Bromoviridae*, se ha descrito que cambios en aminoácidos de la CP de CMV está directamente relacionado con la inducción de fuertes síntomas (Mochizuki y col., 2014). También se ha descrito que mutantes en distintas posiciones de la CP pueden alterar la formación de vesículas en el retículo endoplásmico y a la inducción de síntomas en *N. benthamiana* y *C. quinoa* (Bamunusinghe y col., 2013) Fuera de la familia *Bromoviridae* se ha comprobado que mutaciones puntuales en el gen de la proteína de cubierta del TMV pueden desencadenar una respuesta hipersensible de alguna especie de nicotianas (Culver y col., 1994) o inducir necrosis severa en otras (Banerjee y col., 1995).

Con respecto a las regiones no traducidas, la IGR de los aislados T32 y CR8 presentaba un tamaño diferente a la IGR del aislado Pe1 con regiones promotoras distintas, lo cual podría tener implicaciones biológicas importantes (Jaspars, 1998; Galipienso y col., 2008). La región promotora de los aislados T32 y CR8 estaba muy conservada y sólo se detectó un cambio nucleotídico fuera de dicha región (U111C) el cual no afectaba la estructura en bucle del promotor. Los últimos 100 nucleótidos de la región 3'-NTR de los tres RNAs genómicos del aislado T32 presentaron alta homología, como se ha descrito para otros aislados de PMoV (Galipienso y col., 2009). Estas zonas están muy conservadas en otros ilarvirus y al igual que en ellos, se ha predicho estructuras en forma de bucle que podrían intervenir en el proceso de activación génica (Ansel-McKinney y Gehrke, 1998; Aparicio y col., 2003). En esta zona se detectaron muy pocos cambios entre los aislados T32, CR8 y Pe1 sin consecuencias estructurales.

Los resultados de este trabajo mostraron que los aislados T32 y CR8 tenían diferencias genéticas y de comportamiento biológico por lo que podrían ser considerados razas diferentes de PMoV. A su vez, estos dos aislados mostraban diferencias genéticas con el aislado Pe1, que era biológicamente diferente al aislado T32 (Lisa y col., 1998), confirmando la hipótesis inicial de que estos dos aislados también podrían pertenecer a razas diferentes del virus.

Durante una infección viral se establecen una serie de relaciones entre los componentes virales y los factores del huésped que condiciona el éxito de la propagación viral. El movimiento intercelular de los virus es un proceso indispensable para la dispersión del virus por toda la planta y por tanto, para el establecimiento de la infección y desarrollo de la enfermedad. Los virus codifican en sus genomas unas proteínas (MPs) que interviene en el movimiento de éstos entre las células vecinas (Lucas, 2006). La identificación de dominios funcionales dentro de estas proteínas es un requisito necesario para caracterizar el papel que desempeñan en el movimiento intercelular. La MP del PMoV pertenece a la superfamilia 30K (Melcher., 2000), las cuales presentan capacidad de unión a ácidos nucleicos, de interactuar con las membranas del ER y se localizan en los PDs), en los que inducen el aumento de su límite de exclusión molecular. El RBD de estas MPs son ricos en aminoácidos básicos cargados positivamente como argininas (R) y lisinas (K), presentan una alta probabilidad de superficie y adoptan estructuras secundarias en α -hélices (Mushegian y Kooning, 1993). En el Capítulo 3 de la presente Tesis hemos demostrado que la MP del PMoV presenta actividad de unión *in vitro* al RNA viral, con un valor constante de

disociación (Kd) de 5.8 mM, mayor que la calculada para la MP de otro ilarvirus, el PNRSV (Kd=1.4 mM) (Herranz y Pallás, 2004). Asimismo, se identificaron dos regiones hidrofílicas ricas en residuos básicos K y R y con una estructura en α -hélice en los extremos N y C-terminal de la proteína (regiones R1 y R2, respectivamente). Ambas regiones tenían capacidad de unir RNA de forma independiente. Esta es la primera descripción de un virus de la familia *Bromoviridae* que contiene dos RBDs en su MP, ya que los otros miembros de la familia estudiados hasta ahora contienen un único RBD (revisado en Pallás y col., 2013). Concretamente, la MP del AMV y PNRSV presentan el RBD en el extremo N-terminal mientras que en la del BMV y del CMV está situado en el extremo C-terminal (Schoumacher y col., 1994; Li y Palukaitis., 1996; Fujita y col., 1998; Herranz y Pallás., 2004; Kim y col., 2004;). La existencia de dos RBD se ha descrito en las MPs del ACLSV y del TMV aunque se sitúan de manera contigua en la proteína (Citovsky y col., 1992; Isogai y Yoshikawa., 2005).

Por otro lado, tal y como se ha encontrado con las MPs de otros virus (Sánchez-Navarro y col., 2006), la MP del PMoV fue también funcional para el movimiento célula a célula de un RNA 3 quimérico del AMV en el que la MP está intercambiada por la del PMoV. Esta capacidad de movimiento entre células adyacentes no se observó con las versiones de la MP del PMoV mutantes que carecen de las regiones R1 y/o, R2, Con el fin de identificar/mapear los residuos implicados en la interacción con el RNA se construyeron una serie de mutantes de la MP en los que los residuos K y R de las regiones R1 y R2 se intercambiaron de dos en dos por residuos de alanina (A). Todas las mutaciones en la región R1 confinaron a las construcciones en células individuales mientras que las de la región R2 permitieron un limitado movimiento intercelular, excepto la mutación de los cuatro residuos básicos que bloqueó completamente el movimiento viral. Los ensayos de unión al RNA y el análisis de la localización subcelular de las MPs mutantes que son incapaces de moverse entre células vecinas, demostraron que todas mantenían capacidad de unión al RNA pero, contrariamente a lo observado con la MP silvestre (MPwt) que se acumulaba exclusivamente en los PDs, éstas se localizaban de manera difusa en la periferia celular. Por el contrario, los mutantes con un movimiento célula a célula reducido también mantuvieron la capacidad de unión a RNA pero se acumulaban tanto en PDs como en la periferia celular.

En general, nuestros resultados muestran que la MP del PMoV es la primera proteína de movimiento de la familia *Bromoviridae* descrita hasta la fecha que posee dos regiones con capacidad de unión al ARN de manera independiente. Estas regiones

no son necesarias para la replicación viral, pero si para el transporte intercelular del virus. Además, la unión al RNA es una condición necesaria pero no suficiente en el movimiento célula a célula de PMoV, una situación que también se ha observado en las MPs de PNRSV y CMV (Herranz y col., 2005; Vaquero y col., 1997). Asimismo, la presencia de los residuos básicos en las regiones R1 y R2 es necesaria para la localización de la MP en los PDs. De hecho, las cargas positivas en la región R1 serían más importantes para mantener la conformación estructural de la MP que las que están en R2. La eliminación de alguno de estos podría alterar la conformación del plegamiento de la proteína, lo que no afectaría a la actividad de unión al RNA pero si a la capacidad de movimiento. Una posible explicación sería que la alteración de la estructura terciaria de la proteína podría interferir con su capacidad para interactuar con factores del huésped necesarios para su transporte a los PDs. La importancia de la presencia de los residuos básicos en los dominios RBD así como la pérdida del movimiento intercelular como consecuencia una ineficiente localización en los PDs de las MP se ha demostrado anteriormente con las MPs de diversos virus (Berna y col., 1991; Takeda y col., 2004; Canto y Palukaitis, 2005; Herranz y col., 2005; Tremblay y col., 2005; Aparicio y col., 2010). Finalmente y desde un punto de vista evolutivo, la presencia de dos RBDs en la MP podría haber supuesto una ventaja evolutiva frente al resto de ilarvirus que solo tienen un RBD, o por el contrario, podría ser el vestigio de un ancestro común en el grupo, a partir del cual evolucionaron adquiriendo un solo RBD, cada uno en un extremo de la MP.

Los virus, como parásitos obligados que son, deben utilizar los recursos de su hospedador. Por otro lado, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos. Aunque una infección viral no necesariamente causa una patología visible, estas interacciones entre la planta y el virus pueden inducir toda una serie de interferencias en el metabolismo y desarrollo de la planta que se manifiestan en forma de una sintomatología asociada a enfermedad (patogénesis). En muchos casos la patogénesis es inducida por una o más proteínas del virus y entonces estos factores del patógeno se denominan determinantes de patogenicidad. En el Capítulo 4 de esta tesis se ha analizado la capacidad de las proteínas MP, 2b y CP del PMoV para actuar como determinantes de patogenicidad y de actuar como proteínas supresoras del silenciamiento génico. Una de las estrategias más ampliamente utilizada para identificar posibles proteínas determinantes de patogenicidad en un virus determinado consiste en insertar el gen de la proteína de interés en el genoma

modificado del PVX (Baulcome y col., 1996) y analizar posteriormente si la versión del PVX que expresa dicho determinante de patogenicidad muestra una mayor severidad de los síntomas que el vector control PVX (Vance y col. 1995, Saénz y col., 2001). Nuestros resultados mostraron que las construcciones con las tres proteínas analizadas (MP, CP y 2b) procedentes del aislado CR8 inducían en *N. benthamiana* una sintomatología consistente en enrollado y mosaico foliar, similar a la inducida por PVX pero más intensa y que no desaparecía con el tiempo. Además, la construcción que contenía la CP de PMoV causó enanismo y necrosis foliar sistémica, síntomas que no induce PVX en *N. benthamiana*

El silenciamiento génico es un mecanismo complejo y versátil de regulación génica y también es un poderoso mecanismo de defensa frente a patógenos. Como contra-defensa los virus han codificado en sus genomas una o más proteínas que bloquean alguno de los pasos de la ruta de silenciamiento génico denominadas proteínas supresoras de silenciamiento (VSR). Debido a que existen en la bibliografía diversos ejemplos de VSRs que actúan como determinantes de patogenicidad (; Saenz y col., 2001; Tenllado y col., 2003; Chapman y col., 2004; Lin y col., 2007; Aguilar y col., 20015) en este capítulo también se analizó la posible actividad como VSR de las proteínas MP, 2b y CP de PMoV. Para ello se utilizó un sistema basado en la reconstitución del movimiento célula a célula de una versión modificada del TCV (TCV-sGFP) que tiene reemplazada la CP por la GFP y es incapaz de moverse intercelularmente en plantas de *N. benthamiana* (Powers y col., 2008). Estos autores demostraron que toda una serie de proteínas previamente caracterizadas como VSRs, expresadas en *trans*, eran capaces de complementar el movimiento intercelular de la construcción TCV-sGFP. De este modo, cuantificando el tamaño de los focos de infección revelado por la acumulación de GFP en las células infectadas, se podía analizar la actividad VSR de una determinada proteína viral (Powers y col., 2008). Mediante esta aproximación encontramos que ninguna de las proteínas de PMoV estudiada (CP, MP y 2b) era capaz de restablecer el movimiento del TCV-sGFP, lo que sugería que ninguna de ellas tenía actividad VSR. En resumen, nuestros resultados indican que la CP, la MP y la proteína 2b del PMoV carecen de actividad VSR. Aunque no podemos descartar totalmente que en las plantas agroinfiltradas con las construcciones pGR107:CP, pGR107:MP y pGR107:2b se produzca un efecto sinérgico con PVX, nuestros resultados indican que la inducción de los síntomas causados por MP, 2b y CP, incluyendo la necrosis inducida por esta última, no estarían relacionados

con un incremento de la actividad de P25 debido a una función VSR de estas como se ha visto con otros supresores virales (Aguilar y col., 2015). La ausencia de actividad VSR de la proteína 2b del PMoV concuerda con los resultados previamente descritos mediante una aproximación distinta basada en la co-expresión transitoria simultanea de la proteína y la GFP en plantas de *N. benthamiana* (door Peeters, 2009). Sin embargo son distintos a los encontrados en el caso de la proteína 2b del CMV o de los ilarvirus TAV y AV2 que si presentan actividad VSR (Anandalakshmi y col., 1998; Beclin y col., 1998; Brigneti y col., 1998; Simura y col., 2013). Aunque en plantas de *C. quinoa* infectadas con el PMoV se ha identificado la presencia de un sgARN 4A que codificaría la proteína 2b (door Peters, 2009), la falta de un anticuerpo específico contra esta proteína no ha permitido confirmar la acumulación de una proteína 2b en tejido infectado.

Conclusiones

1. Los análisis filogenéticos realizados con las secuencias completas de los genes que codifican para la CP y 2b de aislados del PMoV procedentes de diferentes países muestran que la variabilidad genética del virus es baja, pero dentro del rango de la encontrada para otros virus de plantas.
2. Los árboles filogenéticos inferidos a partir de las secuencias de la CP y 2b muestran que la población de aislados originarios de Italia se agrupan en un clado (clado I) mientras que la población de aislados recogidos en España se agrupan formando tres clados (clados II, III y IV). Sin embargo, la estructura de la población de PMoV no parece estar correlacionada con el hospedador, puesto que los aislados que infectan tomate y parietaria se agrupan en diferentes clados.
3. Las proteínas CP y 2b están sometidas a presiones de selección negativa o purificadora que limitan su variabilidad, debido probablemente a los importantes papeles que desempeñan en el ciclo infeccioso del virus.
4. Se han identificado tres eventos de intercambio genético, probablemente debido a reordenamientos de segmentos genómicos, entre los aislados españoles de PMoV: *i*) en un ancestro de los aislados BP-1, TT-1, GT-1, GuiT-1 y ViT-1, que sería el resultado del intercambio genético entre la CP de un aislado de origen desconocido y de la 2b de un aislado tipo BaT-1; *ii*) en un ancestro de los aislados BT-1 y TT-3, con la CP de un aislado del tipo TT-1 y la 2b de un aislado del tipo TT-2; *iii*) finalmente, en el ancestro de los aislados TT-2 y TT-4 con la CP de un aislado del tipo GeT-2 y la 2b de un aislado del tipo CR8

5. Los resultados de los ensayos de infectividad realizados con diferentes especies hortícolas sugieren que el aislado T32 es un patotipo diferente a CR8, a pesar de que ambas variantes virales se aislaron de plantas de tomate. El análisis de la secuencia del genoma del aislado italiano T32 muestra que éste presenta más similitudes con el aislado italiano Pe1 que con el aislado español CR8.
6. Los resultados de este trabajo indican que la proteína 3a (MP) de PMoV interviene directamente en el movimiento intercelular del virus.
7. Se han identificado dos regiones (R1 y R2) de unión al RNA (RBD) en la MP del PMoV, localizados en la parte amino y carboxilo terminal, respectivamente. Ambas regiones tienen capacidad de unión al RNA de forma independiente y presentan un alto nivel de residuos básicos de arginina (R) y lisina (K) así como estructuras en α -hélice. La presencia de dos RBD en la MP del PMoV contrasta con los otros cuatro miembros de la familia *Bromoviridae* estudiados hasta ahora, los cuales contienen una única región de unión a RNA.
8. Mediante análisis mutacional de los RBDs y la expresión transitoria de la MP fusionada con GFP hemos demostrado que los residuos básicos en ambas regiones son necesarios para una correcta localización de la proteína en los plasmodesmos, lo que afecta finalmente el movimiento viral entre células vecinas. Las mutaciones de la región R1 son más determinantes que las de R2, con la excepción de la eliminación completa de este último dominio. .
9. Mediante ensayos de expresión en el PVX hemos demostrado que de la CP de PMoV induce enanismo, enrollado, mosaico y necrosis foliar sistémica mientras que las proteínas 2b y MP inducen fuertes síntomas de mosaico y enrollado foliar en plantas de *N. benthamiana*.
10. Ensayos de complementación con una versión modificada del TCV (TCV-GFP) han demostrado que las proteínas MP, 2b y CP de PMoV no presentan actividad

VSR, lo que indica que esta actividad no es necesaria para la inducción de los síntomas ocasionado por estas proteínas virales en plantas de *N. benthamiana*.

Bibliografía

- Acosta-Leal R, Duffy S, Xiong Z, Hammond RW, Elena SF (2011). Advances in plant virus evolution, Translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopatology* 101, 1136-1148.
- Adkins S, Kao, CC (1998). Subgenomic RNA promoters dictate the mode of recognition by bromoviral RNA-dependent RNA polymerases. *Virology* 252, 1-8.
- Adkins S, Siegel RW, Sun JH, Kao CC (1997). Minimal templates directing accurate initiation of subgenomic RNA synthesis in vitro by the Brome mosaic RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* 3 634-647.
- Aguilar E, Almendral D, Allende L, Pacheco R, Chung BN, Canto T, Tenllado F (2015). The P25 protein of Potato virus X (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *Journal of Virology*. 89 2090-2103.
- Ahlquist P (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. 2961270–1273.
- Ahola, T, Den Boon, J. A, Ahlquist, P (2000). Helicase and Capping Enzyme Active Site Mutations in Brome Mosaic Virus Protein 1a Cause Defects in Template Recruitment, Negative-Strand RNA Synthesis, and Viral RNA Capping. *Journal of Virology*. 74 8803-8811.
- Amin HA, Falk BW (2009). Citrus Tristeza Virus–p23 Gene Correlated with the Pathogenicity in Non Citrus Hosts. *Egyptian Journal of Phytopathology* 37, 83-98.
- Amin, I, Ilyas, M, Qazi, J, Bashir, R, Yadav, J.S, Mansoor, S, Fauquet, C.M, Briddon, R.W (2011) (a). Identification of a major pathogenicity determinant and suppressors of RNA silencing encoded by a South Pacific isolate of Banana bunchy top virus originating from Pakistan. *Virus Genes*, 42, 272–281,
- Amin I, Patil BL, Briddon RW, Mansoor S, Fauquet CM (2011) (b). Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Virology Journal* 19, 8-238.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *PNAS* 95, 13079-84.
- Ansel-McKinney P, Gehrke L (1998). RNA determinants of a specific RNA-coat protein peptide interaction in alfalfa mosaic virus, Conservation of homologous features in Ilarvirus RNAs. *Journal of Molecular Biology* 278, 767-785.
- Ansel-McKinney P, Scott SW, Swanson M, Ge X, Gehrke L (1996). A plant viral coat

- protein RNA binding consensus sequence contains a crucial arginine. The EMBO Journal 15, 5077-5084.
- Aparicio F, Myrta A, Di Terlizzi B, Pallás V (1999). Molecular variability among isolates of Prunus necrotic ringspot virus from different *Prunus* spp. Phytopathology 89, 991-999.
- Aparicio F, Pallás V (2002). Molecular variability analysis of the RNA3 of fifteen isolates of Prunus necrotic ringspot virus sheds light on the minimal requirements for the synthesis of the subgenomic RNA. Virus Genes 25, 75-84.
- Aparicio F, Vilar M, Perez-Paya E, Pallás V (2003). The coat protein of Prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. Virology 313, 213-223.
- Aparicio F, Aramburu J, Soler S, Galipienso L, Nuez F, Pallás V, López C (2009). Immunodiagnosis of Parietaria mottle virus in tomato crops using a polyclonal antiserum against its coat protein expressed in a bacterial system. Journal of Phytopathology 157, 511–513.
- Aparicio F, Pallás V, Sánchez-Navarro JA (2010). Implication of the C terminus of the Prunus necrotic ringspot virus movement protein in cell to cell transport and its interaction with the coat protein. Journal of General Virology 91, 1865-1870.
- Aramburu J (2001). First report of Parietaria mottle virus on tomato in Spain. Plant Disease 85, 1210.
- Aramburu J, Galipienso L, Aparicio F, Soler S, López C (2010). Mode of transmission of Parietaria mottle virus. Journal of Plant Pathology 92, 679-684.
- Baer M, Houser F, Loesch-Fries LS, Gehrke L (1994). Specific RNA binding by amino terminal peptides of alfalfa mosaic virus coat protein. The EMBO Journal 13, 727-735.
- Bamunusinghe D, Chaturvedi S, Seo JK, Rao AL. (2013). Mutations in the Capsid Protein of Brome Mosaic Virus Affecting Encapsidation Eliminate Vesicle Induction In Plant, Implications for Virus Cell-to-Cell Spread. Journal of Virology 87, 8982–8992
- Banerjee, N, Guang, J.Y, Zaitlin, M (1995). A single nucleotide change in the coat protein gene of *Tobacco mosaic virus* is involved in the induction of severe chlorosis. Virology 207, 234-239.

- Barone M, Malfitano M, Duran-Vila N, Alioto D (2010). Genetic variability of the coat protein gene of isolates of Citrus variegation virus from Campania (southern Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 48, 469-474.
- Baulcombe D, Chapman S, Santa-Cruz S, (1996). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infection. *Plant Journal*. 7, 1045–1053.
- Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-63.
- Berg JM (1986). Potential metal binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 232, 485-486.
- Berna A, Gafny R, Wolf S, Lucas WJ, Holt CA, Beachy RN (1991). The TMV movement protein, role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182, 682-689.
- Blackman LM, Boevink P, Santa Cruz S, Palukaitis P, Oparka KJ (1998). The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieves elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell*. 10, 525-537.
- Boevink P, Oparka KJ (2005). Virus–host interactions during movement processes. *Plant Physiology* 138, 1815-1821.
- Bol JF (1999). Alfalfa mosaic virus and ilarviruses, Involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology* 80, 1089–1102.
- Boyko V, Ferralli J, Heinlein M (2000). Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant Journal* 22, 315-325.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-54.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ding SW, Baulcombe DC (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739-6746.
- Brill LM, Nunn RS, Kahn TW, Yeager M, Beachy RN (2000). Recombinant Tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, alpha-helical membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 97, 7112-7117.

- Bujarski J, Figlerowicz M, Gallitelli D, Roossinck MJ, Scott SW (2012). Family *Bromoviridae*. In, Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego, CA, Elsevier Academic Press. pp. 965-976.
- Caciagli P, Bocardo G, Lovisolo O (1989). Parietaria mottle virus, a possible new Ilarvirus from *Parietaria officinalis* (*Urticaceae*). Plant Pathology 38, 577-584.
- Canto T, Palukaitis P (2005). Subcellular distribution of mutant movement proteins of Cucumber mosaic virus fused to green fluorescent proteins. Journal of General Virology 86, 1223-1228.
- Caplan J, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar SP (2008). Plant NB-LRR immune receptors, from recognition to transcriptional reprogramming. Cell Host Microbe 3, 126-35.
- Carey, J (1991). Gel retardation. In, Sauer, R.T (Ed.), Methods in Enzymology, Protein-DNA Interactions. Academic Press, San Diego, CA, pp. 103-117.
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, Schaad MC (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. Plant Cell 8, 1669-1681.
- Chapman EJ, Carrington JC (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. Nature Reviews Genetics 8, 884-96.
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. Genes and Development 18, 1179-1186.
- Chare E, Holmes E (2004). Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. Journal of General Virology 85, 3149-3157.
- Chare E, Holmes E (2006). A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. Archives of Virology 151, 933-46.
- Chen SC, Olsthoorn RCL (2010). *In vitro* and *in vivo* studies of the RNA conformational switch in Alfalfa mosaic virus. Journal of Virology 84, 1423-1429.
- Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV, Zambryski P (1992). Visualization and Characterization of *Tobacco mosaic virus* movement protein binding to single stranded nucleic acids. Plant Cell 4, 397-411.
- Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses Journal of General Virology 34, 475-83.

- Codoñer FM, Elena SF (2008) The promiscuous evolutionary history of the family Bromoviridae. *Journal of General Virology* 89, 1739-47.
- Culver JN, Stubbs G, Dawson WO (1994). Structure-function relationship between tobacco mosaic virus coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Journal of Molecular Biology* 242,130-138.
- Dawson WO, Bubrick P, Grantham GL (1988). Modification of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication movement and symptomatology. *Phytopathology* 78,783-789.
- De Jong W, Ahlquist P (1995). Host-specific alterations in viral RNA accumulation and infection spread in a brome mosaic virus isolate with an expanded host range. *Journal of Virology* 69, 1485-92.
- Deom CM, Oliver MJ, Beachy RN (1987). The 30-kilodalton gene product of Tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 337, 389-394.
- Díez J, Ishikawa M, Kaido M, Ahlquist P (2000). Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97, 3913-3918.
- Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH (1994). New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198, 593-601.
- Ding SW, Li, WX, Symons RH (1995). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal* 14, 5762-5772.
- Ding SW, Voinnet O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-26.
- door Peeters A, (2009). Characterisation of a potential suppressor of RNA silencing of *Parietaria mottle virus* (PMoV). Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Drake JW, Holland JJ (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13910-13913.
- Drummond A, Rambaut A (2007). BEAST, Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- Du ZY, Chen FF, Liao QS, Zhang HR, Chen YF, Chen JS (2007). 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of cucumber mosaic virus induce differential virulence on *Nicotiana* species. *Journal of General Virology* 88, 2596-2604.

- Duffy S, Holmes EC (2008). Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Journal of Virology* 82, 957-965.
- Dunoyer P, Lecellier, CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235-1250.
- Dunoyer P, Voinnet O (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNA silencing pathways. *Current Opinion of Plant Biology* 8, 415-423.
- Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, Wang Y, Jay F, Alioua A, Himber C, Voinnet O (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO Journal* 29, 1699-1712.
- Durrant, W.E, Dong, X (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.
- Edwards MC, Gonsalves D, Provvidenti R (1983). Genetic analysis of cucumber mosaic virus in relation to host resistance, location of determinants for pathogenicity to certain legumes and *Lactuca saligna*. *Phytopathology* 73, 269–273.
- Faccioli G, Marani F (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. Breeding for resistance to plant viruses. In, Hadidi, A, Khetarpal, R. K, Koganezawa, H (Eds.), *Plant Virus Disease Control*, APS Press, St. Paul, MN, pp. 346-3380.
- Fajardo TV, Peiró A, Pallás V, Sánchez-Navarro JA (2013). Systemic transport of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of several viruses assigned to five genera of the 30K family. *Journal of General Virology* 94, 677-81.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005). *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds.) Elsevier-Academic Press, London.
- Fernández-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule A (2011). Arabidopsis plasmodesmal proteome. *Plos One* 6(4), e18880
- French R, Alquist P, (1988). Characterization and engineering of sequences controlling in vivo synthesis of Brome mosaic virus subgenomic RNA. *Journal of Virology* 62, 2411-2420.

- Fu ZQ, Dong X (2013). Systemic Acquired Resistance, Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* 64, 839-63.
- Fuchs M, Gonsalves D (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction, Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology* 45, 173-202.
- Fujita M, Mise K, Kajiura Y, Dohi K, Furusawa I (1998). Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of *Brome mosaic bromovirus*. *Journal of General Virology*. 79 1273-1280.
- Fujita Y, Mise K, Okuno T, Ahlquist P, Furusawa I (1996). A single codon change in a conserved motif of a bromovirus movement protein gene confers compatibility with a new host. *Virology* 223, 283-91.
- Galipienso L, Herranz MC, López C, Pallás V, Aramburu J (2008). Sequence analysis within the RNA 3 of seven Spanish tomato isolates of Parietaria mottle virus (PMoV-T) reveals important structural differences with the parietaria isolates. *European Journal of Plant Pathology* 120, 125-135.
- Galipienso L, Herranz MC, Pallás V, Aramburu J (2005). Detection of a tomato strain of Parietaria mottle virus (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology* 54, 29-35.
- Galipienso L, Rubio L, López C, Soler S, Aramburu J (2009). Complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Parietaria mottle virus infecting tomato. *Virus Genes* 39, 256-260.
- García JA, Pallás V (2015). Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 11, 21-30.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39, 157-186.
- Ge X, Scott S (1996). The nucleotide sequence of Hydrangea mosaic virus RNA 3 exhibits similarity with the RNA 3 of Tobacco streak virus. *Virus Research* 40, 57-63.
- Genovés, A (2008). Análisis funcional y localización subcelular de las proteínas implicadas en el movimiento intra e intercelular del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia.
- González-Jara P, Atencio FA, Martínez-García B, Barajas D, Tenllado F, Díaz-Ruiz JR (2005). A Single Amino Acid Mutation in the Plum pox virus Helper Component-

- Proteinase Gene Abolishes Both Synergistic and RNA Silencing Suppression Activities. *Phytopathology* 95, 894-901.
- Gorbalenya AE, Koonin EV (1993). Helicase, Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* 3, 419-429.
- Gramstat A, Courtpozanis A, Rohde W (1990). The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *FEBS Letters* 276, 34-38.
- Guo H S, Ding SW (2002). A viral protein inhibits the long range signalling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal* 21, 398-407.
- Haas G, Azevedo J, Moissiard G, Geldreich A, Himber C, Bureau M, Fukuhara T, Keller M, Voinnet O (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO Journal* 27, 2102-2112.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond RW, Crosslin JM (1998). Virulence and molecular polymorphism of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates. *Journal of General Virology* 79, 1815-1823.
- Hammond RW, Crosslin JM, Pasini R, Howell WE, Mink GI (1999). Differentiation of closely related but biologically distinct cherry isolates of *Prunus* necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 80, 203-212.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Havelda Z, Hornyik C, Valoczi A, Burgyan J. (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *Journal of Virology* 2005 79, 450-7.
- He XF, Fang YY, Feng L, Guo HS (2008). Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR–NBS–LRR class R gene-derived novel miRNA in *Brassica*. *Febs Letters* 582, 2445-2452.
- Herranz MC, Pallas V (2004). RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Journal of General Virology* 85, 761-768.

- Herranz, M. C, Sánchez-Navarro, J. A, Saurí, A, Mingarro, I, Pallás, V (2005). Mutational analysis of the RNA-binding domain of the *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) movement protein reveals its requirement for cell-to-cell movement. *Virology* 339, 31-41.
- Herranz M, Al Rwahnih M, Sánchez-Navarro J, Elena S, Choueiri E, Myrta A, Pallás V (2008). Low genetic variability in the coat and movement proteins of American plum line pattern virus isolates from different geographic origins. *Archives of Virology* 153, 367-373.
- Houwing C, Jaspars E (1980). Preferential binding of 3'-terminal fragments of alfalfa mosaic virus RNA 4 to virions. *Biochemistry* 19, 5261-5264
- Hull, R (2002). *Mathew's Plant Virology*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. ISBN, 0-12-361160-1.
- Hussain M, Mansoor S, Iram S, Fatima AN, Zafar Y (2005). The Nuclear Shuttle Protein of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus Is a Pathogenicity Determinant. *Journal of Virology* 79, 4434.
- ICVT (2014). [On line]. International Committee on Taxonomy of Viruses. [consultado, 03 July 2013]. Disponible en, <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>.
- Incarbone M, Dunoyer P (2013). RNA silencing and its suppression, novel insights from *in planta* analyses. *Trends in Plant* 18, 382-392.
- Isogai M, Yoshikawa N (2005). Mapping the RNA-binding domain on the Apple chlorotic leaf spot virus movement protein. *Journal of General Virology* 86, 225-229.
- James D, Varga A, Leippi L, Godkin S, Masters C (2010). Sequence analysis of RNA 2 and RNA 3 of lilac leaf chlorosis virus, A putative new member of the genus *Iilarvirus*. *Archives of Virology* 155, 993-998.
- Janssen D, Sáez E, Segundo E, Martín E, Gil F, Cuadrado IM (2005). *Capsicum annum*- a new host of Parietaria mottle virus in Spain. *New Disease Reports* 10, 38.
- Jaspars EMJ (1998). A core promoter hairpin is essential for subgenomic RNA synthesis in Alfalfa mosaic alfamovirus and is conserved on other *Bromoviridae*. *Virus Genes* 17, 233-242.
- Jaspars EMJ (1999). Genome activation in alfamo- and ilarviruses. *Archives of Virology* 144, 843-863

- Joshi R, Ravel J, Haenni A (1986). Interaction of turnip yellow mosaic virus Val-RNA with eukaryotic elongation factor EF-1 [alpha]. Search for a function. *EMBO Journal* 6,1143-8.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* 324, 89-91.
- Kalinowska E, Mroczkowska K, Paduch-Cichal E, Chodorska M (2014). Genetic variability among coat protein of Prune dwarf virus variants from different countries and different *Prunus* species. *European Journal of Plant Pathology* 140, 863-868.
- Kim CH, Palukaitis P (1997) The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO Journal* 16, 4060-8.
- Kim, S. H, Kalinina, N. O, Andreev, I, Ryabov, E. V, Fitzgerald, A. G, Taliansky, M. E, Palukaitis, P (2004). The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *Journal of General Virology* 85, 221-230.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Koonin E (1991). The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 72, 2197-2206.
- Kuc J (1987). Translocated signals for plant immunization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 494, 221-23.
- Lai MM (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes, a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 244, 1-12.
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, Burgyan J (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal* 23, 876-884.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007). Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lazarowitz SG, Beachy RN (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11, 535-548.

- Lee R, Lehman PS, Navarro L (1999) Nursery practices and certification programs for budwood and rootstocks. Citrus health management, APS Press, Minnesota, USA. 46pp
- Walkey D (1991). Applied Plant Virology. 2da edición. Chapman and Hall, London. 338pp
- Leonard DA, Zaitlin M (1982). A temperature-sensitive strain of Tobacco mosaic virus defective in cell-to-cell movement generates an altered viral coded protein. Virology 117, 416-424.
- Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell H, Choi SH, Ryu KH, Canto T, Palukaitis P, Payne T, Walsh JA, Carr JP (2009). The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. Molecular Plant-Microbe Interactions 22, 642-54.
- Li F, Ding SW (2006). Virus counterdefense, diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. Annual Review of Microbiology 60, 503-531.
- Li Q, Palukaitis P (1996). Comparison of the nucleic acid-and NTP-binding properties of the movement protein of Cucumber mosaic cucumovirus and Tobacco mosaic tobamovirus. Virology 216, 71-79.
- Lin HX, Rubio L, Smythe AB, Falk BW (2004). Molecular population genetics of cucumber mosaic virus in California, evidence for founder effects and reassortment. Journal of Virology 78, 6666- 6675.
- Lin SS, Wu HW, Jan FJ, Hou RF, Yeh SD (2007). Modifications of the helper component-protease of Zucchini yellow mosaic virus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. Phytopathology 97, 287-296.
- Lisa V, Ramasso E, Ciuffo M, Roggero P (1998). Tomato apical necrosis caused by a strain of *Prietaria mottle* Ilarvirus. Proc. 9th Conference of the international Society for Horticultural Science. VVWG, Recent Advances in Vegetable Virus Research, Turin, pp. 290-291.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell 14, 1605-19.
- Llave C (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. Trends Plant Science 15, 701-707.
- Loesch-Fries, L. S, Halk, E. L, Nelson, S. E, Krahn, K. (1985). Human leukocyte interferon does not inhibit alfalfa mosaic virus in protoplast or tobacco tissue. Virology 143, 626-229.

- López C, Aramburu J, Galipienso L, Soler S, Nuez F, Rubio L (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 92, 210-5.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-Kb viral RNA genome. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A* 101, 15742-15747.
- Lucas W (2006). Plant viral movement proteins, Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344, 169-184.
- Marchoux G, Parella G, Gebre-Selassie K, Gamglon P (1999). Identification de deux ilarvirus sur tomate dans le sud de la France. *Phytoma* 522, 53-55.
- Marsh L, Dreher T, Hall T (1988)adkins. Mutational analysis of the core and modulator sequences of BMV RNA 3 subgenomic promoter. *Nucleic Acids* 16, 981–995.
- Martin D, Murrell Ben, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*,,1,vev003
- Martínez-Gil L, Sánchez-Navarro JA, Cruz A, Pallás V, Pérez-Gil J, Mingarro I (2009). Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. *Journal of Virology* 83, 5535-5543.
- Mayers CN, Palukaitis P, Carr JP (2000). Subcellular distribution analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Journal of General Virology* 81, 219–226.
- Melcher U (2000). The 30k superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology* 81, 257-266.
- Merai Z, Kerényi Z, Molnar A, Barta E, Valoczi A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyan J, Shihavy D (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* 79, 7217-7226.
- Merai Z, Kerényi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Shihavy D (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80, 5747-5756.
- Meshi T, Watanabe Y, Saito T, Sugimoto A, Maeda T, Okada Y (1987). Function of the 30 kd protein of Tobacco mosaic virus, involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO Journal* 6, 2557-2563.
- Mise K, Allison RF, Janda M, Ahlquisti P (1993). Bromovirus Movement Protein Genes Play a Crucial Role in Host Specificity. *Journal of Virology* 67, 2815-2823.

- Mise K, Ahlquist, P (1995). Host-specificity restriction by bromovirus cell-to-cell movement protein occurs after initial cell-to-cell spread of infection in nonhost plants. *Virology* 206, 276-286.
- Mochizuki T, Yamazaki R, Wada T2, Ohki ST (2014). Coat protein mutations in an attenuated Cucumber mosaic virus encoding mutant 2b protein that lacks RNA silencing suppressor activity induces chlorosis with photosynthesis gene repression and chloroplast abnormalities in infected tobacco plants. *Virology* 456, 292-299.
- Moreno IM, Thompson JR, García-Arenal F (2004). Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of General Virology* 85, 749-759..
- Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí M, Guerri J, Peña L (2008). Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Plant Pathology* 9, 2251–268.
- Moya A, Holmes EC, González-Candelas F (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology* 2, 279-288.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15, 473-497.
- Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Pond SLK, Scheffler K (2013). FUBAR, a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1196-1205.
- Mushegian AR, Kooning EV (1993). Cell to cell movement of plant viruses, insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Archives of Virology* 133, 239-257.
- Nagy PD (2008). Recombination in plant RNA viruses. *Plant virus evolution*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 133-164.
- Naqvi R, Choudhury NR, Haq QM, Mukherjee SK (2008). MicroRNAs as biomarkers in tomato leaf curl virus (ToLCV) disease. *Nucleic Acids Symposium Series* 52, 507-8.
- Navarro L (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs:383- 391
- Nelson RS, van Bel AJE (1998). The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular tissue. *Progress in botany* 59, 476-533.

- Nemes K, Gellért Á, Balázs E, Salánki . (2014). Alanine Scanning of Cucumber Mosaic Virus (CMV) 2B Protein Identifies Different Positions for Cell-To-Cell Movement and Gene Silencing Suppressor Activity. PLoS One 9 (11), e112095
- Novak JE, Kirkegaard K (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. Genes & Development 8, 1726-1737.
- Nugent T, Jones D (2012). Accurate de novo structure prediction of large transmembrane protein domains using fragment-assembly and correlated mutation analysis. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 109, 1540-1547.
- Olsthoorn RCL, Mertens S, Brederode TB, Bol JF (1999). A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication. The EMBO Journal 18, 4856-4864.
- Oparka KJ, Turgeon R (1999). Sieve elements and companion cells - Traffic control centers of the phloem. Plant Cell 11, 739-750.
- Osman T, Buck K (1997). The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. J. Virology 71, 6075-6082.
- Pallás V, García JA (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. Journal of General Virology. 92, 2691-2705.
- Pallás V, Aparicio F, Herranz MC, Amari K, Sánchez-Pina MA, Myrta A (2012). Iarviruses of Prunus spp, A continued concern for fruit trees. Phytopathology 102, 1108-1120
- Pallás V, Aparicio F, Herranz MC, Sánchez-Navarro JA, Scott SW (2013). The molecular biology of *Iarviruses*. In, Maramorosch, K, Murphy, F.A (Eds). Advances in Virus Research. Vol. 87, Academic Press, Burlington, pp. 139-181.
- Pamilo P, Bianchi NO (1993). Evolution of the *Zfx* and *Zfy* genes, rates and interdependence between the genes. Molecular Biology and Evolution 10, 271-281.
- Peiró A, Martínez-Gil L, Tamborero S, Pallás V, Sánchez-Navarro JA, Mingarro I (2014). The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. Journal of Virology 88,3016-3026.
- Petrillo JE, Rocheleau G, Kelley-Clarke B, Gehrke L (2005). Evaluation of the conformational switch model for Alfalfa mosaic virus RNA replication. Journal of Virology 79, 5743-5751.

- Pond SL, Frost SD (2005). Datamonkey, rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21, 2531-2533.
- Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD (2006). GARD, a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096-3098.
- Powers JG, Sit TL, Qu F, Morris TJ, Kim KH, Lommel, SA (2008). A Versatile Assay for the Identification of RNA Silencing Suppressors Based on Complementation of Viral Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 879-90.
- Prins M, Goldbach R (1998). The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6, 31-5.
- Prins M, Laimer M, Noris E, Schubert J, Wassenegger M, Tepfer M (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* 9, 73-83.
- Qu J, Ye J, Fang R (2007) Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology* 81, 6690-6699
- Quadt RC, Kao CC, Browning KS, Hershberger RP, Ahlquist P (1993). Characterization of a host protein associated with Brome mosaic virus RNA dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90, 1498-1502.
- Rao AL, Grantham GL (1994). Amplification in vivo of brome mosaic virus RNAs bearing 3' noncoding region from cucumber mosaic virus. *Virology* 204, 478-81.
- Rao AL, Grantham GL (1996). Molecular studies on Bromovirus capsid protein. 2. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology* 226, 294-305.
- Reusken CBEM, Neeleman L, Bol JF (1994). The 3'-untranslated region of Alfalfa mosaic virus RNA3 contains at least two independent binding sites for viral coat protein. *Nucleic Acids Research* 22, 1346-1353.
- Reusken CBEM, Bol JF (1996). Structural elements of the 3'-terminal coat protein binding site in alfalfa mosaic virus RNAs. *Nucleic Acids Research* 24, 2660-2665.
- Ritzenthaler C, Hofmann C (2007). Tubule-guided movement of plant viruses. In, Waigmann, E, Heinlein, M, (eds.) *Plant Cell Monogr*. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag. pp 63-83.
- Rodríguez-Campos A, Azorín F (2007). RNA is an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS One* 14, 2-11

- Roggero P, Ciuffo M, Katis N, Alioto D, Crescenzi A, Parrella G, Gallitelli D (2000). Necrotic disease in tomatoes in Greece and southern Italy caused by the tomato strain of Parietaria mottle virus. *Journal of Plant Pathology* 82, 159.
- Rose JK, Whitt MA (2001). *Rhabdoviridae*. In, Knipe DM, Howley PM (eds.), *Fields Virology*, 4th ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1221-1244.
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review Plant Biology* 60, 485-510.
- Sacristan S, Malpica J, Fraile A, García-Arenal F (2003). Estimation of population bottlenecks during systemic movement of Tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Journal of virology* 77, 9906-11.
- Sáenz P, Quiot L, Quiot JB, Candresse T, García JA (2001) Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 278-87.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Navarro JA, Reusken CEM, Bol JF, Pallás V (1997). Replication of Alfalfa mosaic virus RNA 3 with movement and coat protein genes replaced by corresponding genes of Prunus necrotic ringspot ilarvirus. *Journal of General Virology* 78, 3171-3176.
- Sánchez-Navarro JA, Bol JF (2001). Role of the Alfalfa mosaic virus movement protein and coat protein in virus transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 14, 1051-1062.
- Sánchez-Navarro JA, Herranz MC, Pallás V (2006). Cell-to-cell movement of Alfalfa mosaic virus can be mediated by the movement proteins of Ilas-, bromo-, tobamo- and comoviruses, and does not require virion formation. *Virology* 346, 66-73.
- Sasaki N, Fujita Y, Mise K, Furusawa I (2001). Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid bromovirus are required for adaptation to a nonhost. *Virology* 279, 47-57.
- Saunders K, Wege C, Veluthambi K, Jeske H, Stanley J (2001). The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of Tomato golden mosaic

- virus are determined by nucleotide differences in the 3'-terminal region of the gene encoding the movement protein. *Journal of General Virology* 82, 45-51.
- Schneider W, Roossinck M (2001). Genetic diversity in RNA virus quasi species is controlled by host-virus interactions. *Journal of virology* 75, 6566.
- Schoumacher, F, Giovane, C, Maira, M, Poirson, A, Godefroy-Colburn, T, Berna, A (1994). Mapping of the RNA-binding domain of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein. *Journal of General Virology* 75, 3199-3202.
- Scott SW, Zimmerman MT, Rankin D (2006). Complete sequence of the RNA 1 and RNA 2 of *Parietaria mottle virus*. *Archives of Virology* 151, 1895-1898.
- Sekine KT, Ishihara T, Hase S, Kusano T, Shah J, Takahashi H (2006). Single amino acid alterations in *Arabidopsis thaliana* RCY1 compromise resistance to Cucumber mosaic virus, but differentially suppress hypersensitive response-like cell death. *Plant Molecular Biology* 62, 669-682.
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burgyán J, Masuta C (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLOS Pathogens* 7, e1002021.
- Shimura H, Masuta C, Yoshida N, Sueda K, Suzuki M (2013). The 2b protein of asparagus virus functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442, 180-188.
- Shintaku, M.H, Zhang, L, Palukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* 4, 751-757.
- Siegel RW, Adkins S, Kao CC (1997). Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promoter by a viral RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* 94, 11238-11243.
- Slatkin M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural. *Science* 3576, 198-236.
- Smith C, Roosien J, van Vloten-Doting L, Jaspars E (1981). Evidence that alfalfa mosaic virus infection starts with three RNA-protein complexes. *Virology* 112, 169-173
- Smith NA, Eamens AL, Wang MB (2011). Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLOS Pathogens* 7, e1002022.

- Stange C (2006). Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. *Ciencia e Investigación Agraria* 33, 3-21.
- Strange RN, Scott PR (2005). Plant disease, a threat to global food security. *Annual Reviews Phytopathology* 43,83-116.
- Swanson MM, Ansel-McKinney P, Houser-Scott F, Yusibov V, Loesch-Fries LS, Gehrke L (1998). Viral coat protein peptides with limited sequence homology bind similar domains of alfalfa mosaic virus and tobacco streak virus RNAs. *Journal of Virology* 72, 3227-3234.
- Tahir, M, Mansoor, S (2011). bC1 of chili leaf curl betasatellite is a pathogenicity determinant. *Virology Journal* 8, 509
- Takeda A, Kaido M, Okuno T, Mise K (2004). The C terminus of the movement protein of *Brome mosaic virus* controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *Journal of General Virology* 85, 1751–1761.
- Takeda A, Nakamura W, Sasaki N, Goto K, Kaido M, Okuno T, Mise M (2005). Natural isolates of Brome mosaic virus with the ability to move from cell to cell independently of coat protein. *Journal of General Virology* 86, 1201-1211.
- Takeshita M, Suzuki M, Kuwata S, Takanami Y (1998). Involvement of cucumber mosaic cucumovirus RNA 2 and RNA 3 in viral systemic spread in radish plant. *Archives of Virology* 143, 1109–1117.
- Takeshita, M, Suzuki, M. & Takanami, Y (2001). Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of Cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Archives of Virology* 146, 697–711.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013). MEGA6, Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tao X, Zhou X, Li G, Yu J (2003). Two amino acids on 2a polymerase of Cucumber mosaic virus co-determine hypersensitive response on legumes. *Science China Life Sciences* 46,40-8.
- Taschner PE, Van der Kuyl AC, Neeleman L, Bol JF (1991). Replication of an incomplete alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology* 181, 445-450.
- Tenllado F, Barajas D, Vargas M, Atencio FA, González-Jara P, Díaz-Ruiz JR (2003). Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant

- virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 16, 149-58.
- Thompson GA, Schulz A (1999). Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends in Plant Science* 4, 354-360.
- Toussaint A, Kummert J, Maroquin C, Lebrun A, Roggemans J (1993). Use of virazole to eradicate odontoglossu, ringspot virus from *in vitro* cultures of *Cymbidium Sw.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32, 303-309.
- Tremblay D, Vaewhongs AA, Turner KA, Sit TL, Lommel SA (2005). Cell wall localization of Red clover necrotic mosaic virus movement protein is required for cell-to-cell movement. *Virology* 333, 10-21.
- Tsai CH, Dreher TW (1993). Increased viral yield and symptom severity result from a single amino acid substitution in the Turnip yellow mosaic virus movement protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 6, 268-273.
- Tzanetakis IE, Martin RR (2005). New features in the genus *Ilarvirus* revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus. *Virus Research* 112, 32-37.
- Ueki S, Citovsky V (2007). Spread throughout the plant, Systemic transport of viruses. In E. Waigmann & M. Heinlein (Eds.), *Viral transport in plants* (pp. 85–118). Berlin, Springer
- van der Vossen EA, Neeleman L, Bol JF (1994). Early and late functions of Alfalfa mosaic virus coat protein can be mutated separately. *Virology* 202, 891-903.
- van der Wel NN, Goldbach RW, van Lent JW (1998). The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology* 244, 322–329.
- van Lent J, Wellink J, Goldbach R (1990). Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic-virus. *Journal of General Virology* 71, 219-223.
- van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36, 453-83.
- Vance, VB, Berger, PH, Carrington, JC, Hunt, AG, Shi, XM (1995). 5 Proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590.

- Vaquero C, Liao YC, Nähring J, Fisher R (1997). Mapping of the RNA-binding domain of the *Cucumber mosaic virus* movement protein. *Journal of General Virology* 78, 2095-2099.
- Vives MC, Rubio L, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2002). Low genetic variation between isolates of Citrus leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins. *Journal of General Virology* 83, 2587-2591.
- Vlot A, Menard A, Bol J (2002). Role of the Alfalfa mosaic virus Methyltransferase-Like Domain in negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology* 76, 11321-11328.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe BC (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 103, 157-167.
- Voinnet O (2005). Induction and suppression of RNA silencing, insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
- Walkey D (1991). *Applied Plant Virology*. 2da edición. Chapman and Hall, London. 338pp.
- Wang X, Lee W, Watanabe T, Schwartz M, Janda M, Ahlquist P (2005). Brome mosaic virus 1a nucleoside triphosphatase/helicase domain plays crucial roles in recruiting RNA replication templates. *Journal of Virology* 79, 13747-58.
- Wieczorek A, Sanfaçon H (1993). Characterization and subcellular localization of tomato ringspot nepovirus putative movement protein. *Virology* 194, 734-742.
- Xin HW, Ji LH, Scott SW, Symons RH, Ding SW (1998). Ilarviruses encode a cucumovirus-like 2b gene that is absent in other genera within the *Bromoviridae*. *Journal of Virology* 72, 6956-6959.
- Yusibov V, Loesch-Fries LS (1998). Functional significance of three basic N-terminal amino acids of Alfalfa mosaic virus coat protein. *Virology* 242, 1-5.
- Zheng, X, Zhu, J, Kapoor, A, Zhu, J.K (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO Journal* 26, 1691-701.
- Zuidema D, Bierhuizen MFA, Jaspars EMJ (1983). Removal of the N-terminal part of Alfalfa mosaic virus coat protein interferes with the specific binding to RNA 1 and genome activation. *Virology* 129, 255-260.
- Zuker, M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415.

Agradecimientos

Durante los años de realización de este trabajo y a pesar de las dificultades he conocido y compartido momentos con muchas personas que me han hecho crecer profesionalmente y sin duda, me han dejado lo mejor de ellas para hacerme mejor ser humano. Primero quiero agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Luis Galipienso darme la oportunidad de iniciar con esta experiencia investigativa en su laboratorio, por tener la paciencia necesaria para sacar este proyecto adelante, por cada minuto de su tiempo, por el arduo trabajo que dedicó y por toda su ayuda y colaboración; al Dr. Frederic Aparicio, gracias por toda esa paciencia, dedicación, empeño e interés con que hace cada cosa, por enseñarme de la mejor manera y por dedicar su tiempo y trabajo para conseguir bonitos resultados. Creo que el poder trabajar hoy en la investigación, se lo debo a ustedes, a su tiempo, consejos, riñas, palabras de aliento y mensajes de ánimo que me han motivado a seguir adelante. Quiero agradecer al Dr, Vicente Pallás el hacerme un hueco en su laboratorio para mis estancias, permitiéndome realizar parte de este trabajo. Siempre tuvo una palabra y una actitud amable que hacían del lugar de trabajo un espacio agradable y motivador. Me siento privilegiada por haber podido trabajar con investigadores de primera categoría. A todas las personas de su laboratorio, Tony, M^a Carmen, Martha, Ana y Lorena, de quienes recibí siempre colaboración, consejos, enseñanzas y buena energía.

Iniciar el doctorado no hubiera sido posible sin Jose Aramburu, textualmente me “enchufó” en el grupo y fue un gran compañero de equipo. Gracias por todas las charlas, consejos y enseñanzas. Igualmente, a mucha de la gente del departamento de Patología Vegetal del IRTA de Cabrils, me llevo lindos recuerdos, en especial a Montse y Sofía, gracias por su amistad, por la compañía compartiendo pequeñas meriendas y por echarme mil manos fuera y dentro del labo. Caseteros, me han hecho pasar una temporada genial, debo decir que me topé con gente exageradamente linda y buena: Pris, Lore, Manu, George, Martha, Mire, Amaia, Hermi, Vane y Celia, como los echo de menos, gracias siempre!.

Es imposible no dejar de nombrar a alguien, pues recibí tanta colaboración y apoyo de tanta gente, que no terminaría de escribir a todas esas personas que formaron parte de esta etapa. A Clara, una verdadera amiga, por todo lo que compartimos y todo lo que viene. A toda la gente del master en el IBMCP, que fue fundamental para iniciarme y continuar en los pasos de la ciencia. A Ana Cristina, mi “compi” de piso y de café, gracias por cuidar de mi, por acogerme y enseñarme a mover en un mundo tan desconocido para mi al otro lado del charco. A Ricardo, Javi, Miryam, Pili, gracias por su amistad y por hacerme reír a carcajadas. Al Dr Ricardo Flores, por indicarme como ver de la manera más adecuada un experimento, por hacerme sentir en casa y por preocuparse por mi. Trato de seguir todos los consejos que en el corto tiempo que compartimos, tuve el privilegio de escuchar. Al Dr. Luis Rubio por todo el tiempo, disposición

y aportes a nuestro trabajo y a la Dra. Charlotte Poschenrieder, quien fue mi tutora académica y me brindó su apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo. Al Dr. Marino Rodríguez por toda su ayuda en el análisis estadístico y por sus interesantes charlas amenizadas con un gran requinto.

Agradecer a mi familia, sin duda, la pieza fundamental de esta tesis, mi apoyo moral y físico durante estos años de trabajo. A mi esposo, por soportar mis trasnochos y el poco tiempo para compartir juntos, por sus consejos y soluciones técnicas, por darme paz en mis momentos de angustia. A mi hija Gabriela, por ser mi motivación y la razón para no abandonar esta causa. A mis padres y mi hermano, porque toda su energía, buenos deseos y voz de aliento, siempre estuvieron presentes. A mi abuelita por estar pendiente de mí y quererme locamente. Todos estos años de distancia, lágrimas, abrazos perdidos, llamadas, Skype, E-mails y encomiendas, son el resultado que ven en este momento. A mis suegros y cuñada, Gracias por cuidar de mi pequeña, por quererla sin límites y por apoyarme en esta etapa.

Finalmente quiero recalcar mi agradecimiento a aquellas personas que han estado “ahí” a pesar de las dificultades, inconvenientes y adversidades acontecidas durante el transcurso de este trabajo, y sin las cuales no hubiera sido posible poder finalizarlo. Sin duda, ello es un triunfo de la “buena gente” que como digo, ha “estado ahí, arrimando el hombro”, en los momentos difíciles.

A todos ustedes, “GRACIAS TOTALES”!!