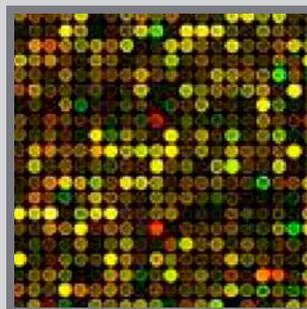
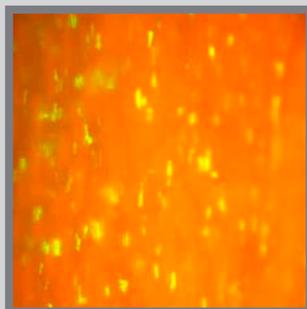




## Estudio de la interacción entre naranja amargo y el virus de la tristeza de los cítricos



**Marta Comellas Serra**

Valencia, 2009





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Departamento Biotecnología



# **ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE NARANJO AMARGO Y EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por  
**MARTA COMELLAS SERRA**

para optar al grado de  
**DOCTORA**

Directores  
Pedro Moreno Gómez  
José Guerri Sirera  
M<sup>a</sup> del Remedio Albiach Martí

Valencia, 2009





GENERALITAT VALENCIANA  
Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació

-----  
**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES  
AGRARIAS**

Carretera Moncada a Náquera km 4,5 , 46113  
MONCADA VALENCIA, SPAIN

Dña. M<sup>a</sup> del Remedio Albiach Martí, Doctora en Ciencias Químicas, Colaboradora Científica Adjunta, D. José Guerri Sirera, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación y D. Pedro Moreno Gómez, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor de Investigación, pertenecientes al Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA),

CERTIFICAN:

que la presente Tesis Doctoral “Estudio de la interacción entre naranjo amargo y el virus de la tristeza de los cítricos” presentada por Marta Comellas Serra, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Centro de Protección vegetal y Biotecnología del IVIA, para optar al grado de Doctora.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 20 de noviembre de 2009

Fdo. M<sup>a</sup> del Remei Albiach Martí

Fdo. José Guerri Sirera

Fdo. Pedro Moreno Gómez



*A mi familia*  
*A Santiago*



Primero quiero agradecer a mis directores de tesis: Pedro, Pepe y Reme por la ayuda que me han dado durante todo estos años, sobre todo a Pedro por la paciencia que ha tendido durante la redacción de este manuscrito.

A todos los compañeros del laboratorio: Susana, Patricia y Josep. A Manolo, que menos mal que había un hombre en el laboratorio que sino, tantas mujeres..... A Silvia que siempre me ha ayudado con las dudas y problemas técnicos del laboratorio, y ha tendido la paciencia de enseñarme la cuantitativa y siempre ha estado allí cuando la he necesitado. De verdad, muchas gracias. Y muy especialmente quiero agradecer a Mari que siempre me ha apoyado en todo, me ha ayudado en mis miles de extracciones, ELISAs y demás, pero sobre todo, por todos los buenos consejos que siempre me ha brindado. No sabes lo que te voy a echar de menos!!

A todos los becarios y postdoctorales del IVIA, los que ya han pasado y los que aún están: las Leandras: Elsa, Ana, Nuria y Álida; Jesús, Lorena, Karelia, Andrés, M<sup>a</sup> Cruz, Mati, Inma, Ester, Mehdi, Nubia, Edson, Vero, Jorge, Gio, Maria,... que buenos momentos hemos pasado juntos. La verdad es que gracias a vosotros la tesis se ha hecho menos dura!! A Gema y Moni, gracias por ayudarme en mi aventura con los chips!!! Y como no a mis niñas: Rosita, Luci y Ague.... que os voy a decir..... mil gracias por todo, por ser mis amigas, confidentes y buenas consejeras!!!!

A mi familia. Pares, sense la vostra ajuda i suport no ho hagués aconseguit mai. Al Martí i a l' Eli, i com no, al Guillem que ens ha portat l' alegria a la família; a la Susana i el Toni, gràcies per tot!!!! A la resta de la familia, tiets, tietes i cosins, i a l' Emi i el Carlos, ja ho veus Emi el trèvol em va portar sort!!! A tots els amics de Berga, els d' Holanda, les nenes de farmàcia i de la Resi, que, encara que a la distància sempre heu estat amb mi. A Manolo, Teresa y el resto de la familia que me han hecho sentir como en casa. A los amigos de Burri y de La Casa.

A Santiago, por estar a mi lado día a día y haber soportado, en silencio, mis días buenos y mis días malos. Por haberme apoyado y ayudado siempre. Esta tesis también es tuya.

A todos y cada uno que de alguna manera o otra me han ayudado durante estos cinco años.



## **Estudio de la interacción entre naranjo amargo y el virus de la Tristeza de los Cítricos**

La tristeza de los cítricos es una de las enfermedades de mayor importancia, tanto por los daños económicos que ha causado, como por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo. Está causada por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), un closterovirus transmitido por pulgones y por injerto, que infecta el floema de plantas de la familia *Rutaceae*. Los síndromes causados por CTV incluyen i) decaimiento y muerte de plantas propagadas sobre patrón naranjo amargo, ii) acanaladuras en la madera, enanismo y mermas de producción en algunas variedades con independencia del patrón, y iii) amarilleo y enanismo de plantas francas de naranjo amargo, pomelo o limonero (“seedling yellows”). El genoma de CTV está formado por una cadena simple de RNA de polaridad positiva con 12 marcos abiertos de lectura que potencialmente codifican 17 proteínas y dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3'. Tres de las proteínas codificadas (p25, p20 y p23) actúan como supresores del silenciamiento en *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* y al menos p23 parece estar implicada en la producción de síntomas, aunque los determinantes específicos de cada uno de los síndromes son aún desconocidos.

Para ver si las diferencias de síntomas entre aislados en un mismo huésped o entre distintos huéspedes infectados con el mismo aislado estaban asociadas con la acumulación viral, se inocularon cuatro aislados con distintas características patogénicas en lima Mexicana (LM), *Citrus macrophylla* (CM), naranjo dulce (ND) y naranjo amargo (NA) y se estimó la carga viral mediante ELISA y RT-PCR cuantitativa a tiempo real en la primera brotación y 9 meses p.i. Las diferencias de carga viral observadas entre aislados y entre huéspedes, no estaban relacionadas con la virulencia, lo que sugiere que la intensidad de los síntomas inducidos por CTV no es una consecuencia directa de la acumulación viral. Asimismo, para todos los aislados se observó una pauta de acumulación distinta en NA y en los demás huéspedes que indica que NA ofrece una resistencia inicial a la invasión por CTV.

Con el fin de dilucidar si las diferencias en las pautas de acumulación viral de los aislados de CTV estaban relacionadas con variaciones en la actividad replicativa del virus o con diferencias en el silenciamiento génico mediado por RNA se estudió

en las mismas combinaciones aislado/huésped la acumulación de los RNAs subgenómicos que expresan los genes *p20* y *p23* y de siRNAs específicos de CTV durante la infección viral. Se observó una cinética de acumulación viral paralela a la actividad replicativa. En las especies más susceptibles (LM, CM y ND) la mayor actividad replicativa y la máxima carga viral se detectaron en la primera brotación, mientras que en NA ambas aumentaron con el transcurso de la infección. Por otro lado, mientras en los huéspedes susceptibles se detectaron siRNAs en la primera brotación, la activación de el silenciamiento en NA fue mucho más tardía indicando que la resistencia inicial a la acumulación viral en este huésped no era consecuencia del silenciamiento sino probablemente de una interacción menos eficiente entre factores virales y del NA necesarios para la replicación/movimiento de CTV. Tampoco las diferencias entre las pautas de acumulación o de silenciamiento de los aislados en los distintos huéspedes pudieron asociarse con una capacidad supresora diferente de sus proteínas *p23*, ya que el ensayo mediante expresión transitoria en *N. benthamiana* no mostró diferencias apreciables entre las mismas.

Posteriormente, se analizó en más detalle el tipo de limitaciones que ofrecía NA a la invasión sistémica de CTV examinando la distribución de distintos aislados del virus en plantas de semilla y las pautas de acumulación del virus y de siRNAs de CTV en la raíz y la copa de plantas propagadas sobre NA, citrange Carrizo (resistente) o ND (susceptible). Se observó que el NA presentaba una limitación al movimiento viral, tanto célula a célula como a larga distancia, que retrasaba la invasión sistémica y la acumulación viral en la copa de forma diferencial según los aislados del virus y el patrón utilizado. El virus se detectó inicialmente en la raíz y el nivel de acumulación del mismo afectaba la posterior carga viral en la copa, de forma variable según los aislados. La acumulación del aislado T385 estaba asociada a la carga viral alcanzada inicialmente en la raíz, lo que sugiere que la raíz actuaría como reservorio.

Finalmente, el empleo de la tecnología de las micromatrices de cDNA permitió analizar a nivel transcriptómico la respuesta del naranjo amargo al inicio de la infección por CTV. Los datos obtenidos fueron congruentes con las hipótesis formuladas anteriormente: i) que en el NA parece haber un retraso en la activación de los mecanismos de defensa, probablemente como consecuencia del retraso en la acumulación viral, y ii) que este retraso parece debido a una limitación del movimiento célula a célula.

### **Study of the interaction between sour orange and *Citrus tristeza virus***

*Citrus tristeza virus* (CTV) is the causal agent of tristeza, a major disease of citrus that forced to rebuild many citrus industries using tristeza tolerant rootstock. This closterovirus, transmitted by propagation of infected buds and by aphids, is adapted to replicate in the phloem cells of some species within the *Rutaceae* family. CTV induces three distinct syndromes i) decline and death of citrus varieties propagated on sour orange rootstock , ii) stem pitting, stunting and low bearing of some citrus varieties independently of the rootsock, and iii) seedling yellows of sour orange, grapefruit and lemon plants. CTV has a single-stranded, positive sense genomic RNA containing 12 open reading frames, potentially encoding at least 17 proteins, and two untranslated 3´ and 5´ terminal regions. Three of these proteins (p25, p20 and p23) act as suppressors of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* plants. Although the pathogenicity determinants are presently unknown, experiments with transgenic plants expressing p23 indicated that this protein is involved in symptom expression. It is also unknown if symptom intensity is related to viral accumulation or to other factors.

To assess if symptom differences between CTV isolates or between hosts infected with the same isolate were related with viral accumulation Mexican lime (ML), *Citrus macrophylla* (CM), sweet orange (SwO) and sour orange (SO) plants were inoculated with four isolates, inducing different symptom intensity in these hosts. Viral accumulation was estimated by ELISA and quantitative real time RT-PCR at 3 and 9 months post inoculation. Differences in viral load between hosts and isolates were not related with virulence, suggesting that the CTV symptom intensity is not a direct result of viral accumulation. Moreover, the four isolates showed an accumulation pattern in SO different from that observed in the other hosts, suggesting that SO displays an initial resistance to CTV invasion.

To examine if differences in the accumulation patterns shown by CTV isolates were related to variations in viral replication or in RNA-mediated gene silencing, the accumulation of subgenomic RNAs expressing the p20 and p23 proteins, and of CTV-derived siRNAs during the viral infection were analyzed using the same host/isolate combinations. Kinetics of CTV replication paralleled that of viral accumulation. In CTV susceptible hosts (ML, CM and SwO) the highest viral replication and the maximum

viral accumulation were detected in the first flush after inoculation, whereas in SO both viral replication and viral accumulation increased during the course of the infection. Likewise, while in ML, CM and SwO the CTV-derived siRNAs were detected in first flush after inoculation, activation of silencing in SO occurred at a later stage. These results indicated that the initial resistance of SO to CTV accumulation was not related to RNA silencing, but rather it probably resulted from an inefficient interaction between viral and host factors needed for CTV movement in the plant. Differences in viral accumulation or silencing patterns shown by CTV isolates in distinct hosts, were neither associated with the suppressor activity of their p23 proteins, as revealed by transitory expression experiments in *N. benthamiana* plants.

The limitation to CTV systemic invasion in SO was analyzed by examining the viral distribution of CTV isolates in SO plants, and the development of viral and CTV-derived siRNA accumulation patterns in the roots and canopy of SO seedlings or plants propagated on Carrizo citrange (resistant to CTV) or SwO (susceptible to CTV) rootstocks. SO exhibited a limitation of cell to cell and long distance movement, which delayed systemic invasion and viral accumulation at the canopy, with variable patterns depending on the isolate and the rootstock. The virus was initially detected in the roots and its accumulation level affected the viral load in the canopy depending on the CTV isolate. Accumulation of the isolate T385 in the canopy was associated to the viral accumulation in roots, suggesting that these were acting as a viral reservoir for this genotype.

Finally, cDNA microarray technology was used to analyze at the transcriptomic level the response of SO to CTV at the early stages of infection. The results confirmed our previous hypothesis that i) in SO there was a delay in the activation of plant defense mechanisms probably due to delayed viral accumulation, and ii) this delay likely results from a limitation in the cell to cell movement.

## Estudi de la interacció entre el taronger amarg i el virus de la tristesa dels cítrics

La tristesa dels cítrics és una de les malalties de més importància, tant pels danys econòmics que ha causat, com pels canvis que ha obligat a introduir en els sistemes de cultiu. Està causada pel virus de la tristesa dels cítrics (CTV), un closterovirus que es transmet per pugons i per empelt, i que infecta el floema de les plantes de la família *Rutaceae*. Els síndromes induïts per CTV inclouen i) decaïment i mort de les plantes propagades sobre el patró taronger amarg, ii) picadures a la fusta, enanisme i disminució de la producció d'algunes varietats amb independència del patró utilitzat, i iii) engrogiment i enanisme de plantes de llavor de taronger amarg, aranger i llimoner ("*seedling yellows*"). El genoma de CTV està format per una cadena simple de RNA de polaritat positiva amb 12 marcs oberts de lectura que potencialment codifiquen 17 proteïnes i dues regions no codificants en els extrems 5' i 3'. Tres de les proteïnes codificades (p25, p20 y p23) actuen com supressors del silenciament en *Nicotiana benthamiana* i *N. tabaccum*, i almenys p23 sembla que està implicada en la producció de símptomes, encara que els determinants específics de cada un dels síndromes encara són desconeguts. Tampoc es coneix si la intensitat dels símptomes està relacionada amb l'acumulació viral o amb altres factors.

Amb l'objectiu d'observar si les diferències de símptomes entre aïllats en un mateix hoste o entre diferents hostes infectats per un mateix aïllat estaven associades amb l'acumulació viral, es van inocular quatre aïllats amb diferents característiques patogèniques en llima Mexicana (LM), *Citrus macrophylla* (CM), taronger dolç (ND) i taronger amarg (NA) i es va estimar la càrrega viral mitjançant ELISA i RT-PCR quantitativa a temps real en el primer brot i passats 9 mesos post inoculació. Les diferències de càrrega viral observades entre aïllats i entre hostes no estaven relacionades amb la virulència, el que suggereix que la intensitat dels símptomes induïts per CTV no es una conseqüència directa de l'acumulació viral. De la mateixa manera, en tots els aïllats es va observar una pauta d'acumulació diferent en l'hoste NA en comparació amb els altres hostes, indicant que NA ofereix una resistència a la invasió de CTV.

Per determinar si les diferències en les pautes d'acumulació viral dels aïllats de CTV estaven relacionades amb variacions en l'activitat replicativa del virus o amb

diferències en el silenciament gènic mitjançat per RNA es va estudiar en les mateixes combinacions aïllat/hoste l'acumulació dels RNAs subgenòmics que expressen els gens *p20* i *p23* i l'acumulació de siRNAs específics de CTV durant la infecció viral. La cinètica d'acumulació viral era paral·lela a l'activitat replicativa, així en les espècies més susceptibles (LM, CM y ND) la major activitat replicativa i la màxima càrrega viral es van detectar a la primera brotació, en canvi, en NA ambdues van augmentar amb el pas de la infecció. Per altre banda, mentre que en els hostes susceptibles es van detectar siRNAs en la primera brotació, l'activació del silenciament en NA es molt més tardana, indicant que la resistència inicial a l'acumulació viral en aquest hoste no era conseqüència del silenciament sinó probablement d'una interacció menys eficient entre els factors virals i del NA necessaris per la replicació/moviment de CTV. Tampoc les diferències entre les pautes d'acumulació o de silenciament dels aïllats en els diferents hostes es van poder associar amb una capacitat supressora diferent de les seves proteïnes p23, ja que l'assaig mitjançant l'expressió transitòria de GFP en *N. benthamiana* no va mostrar diferències apreciables entre elles mateixes.

Posteriorment, es va analitzar amb més detall el tipus de limitació que ofereix NA a la invasió sistèmica de CTV examinant la distribució de diferents aïllats del virus en plantes de llavor i les pautes d'acumulació del virus i de siRNAs de CTV en l'arrel i la copa de plantes propagades sobre NA, citrange Carrizo (resistent a CTV) o ND (susceptible). Es va observar que el NA presentava una limitació al moviment viral, tant cèl·lula a cèl·lula com a llarga distància, que retardava la invasió sistèmica i l'acumulació viral en la copa de forma diferencial segons els aïllats del virus i del patró utilitzat. El virus es va detectar inicialment en l'arrel i el seu nivell d'acumulació afectava la posterior càrrega viral en la copa de forma variable segons els aïllats. L'acumulació de l'aïllat T385 estava associada a la càrrega viral obtinguda inicialment en l'arrel, indicant que l'arrel actuaria com a reservori viral per aquest aïllat.

Finalment, la utilització de la tecnologia de les micromatrius de cDNA va permetre analitzar a nivell transcriptòmic la resposta del taronger amarg a l'inici de l'infecció per CTV. Les dades obtingudes van ser congruents amb les hipòtesis formulades anteriorment: i) en el NA hi ha un retràs en l'activació dels mecanismes de defensa, probablement com a conseqüència del retràs en l'acumulació viral, i ii) que aquest retràs sembla ser degut a una limitació al moviment cèl·lula a cèl·lula.





## **ÍNDICE**

---



**INTRODUCCIÓN GENERAL**

1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS.....	3
2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS.....	4
3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.....	5
3.1 Gama de huéspedes y síntomas.....	6
3.2 Diagnóstico.....	8
3.3 Transmisión.....	9
3.4 Control de la enfermedad.....	10
3.5 El virus de la tristeza de los cítricos.....	11
3.5.1 Organización genómica de CTV.....	12
3.5.2 Variabilidad.....	13
3.5.3 Expresión del genoma viral.....	14
3.5.4 Movimiento viral.....	17
3.5.5 Interacción virus-planta.....	19
3.5.5.1 Genes de resistencia.....	20
3.5.5.2 Silenciamiento .....	21
3.2.5.2.1 Supresores del silenciamiento.....	23
3.2.6 Análisis de las interacciones virus-planta: micromatrices.....	25
<b>OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>29</b>

**CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS**

1. INTRODUCCIÓN.....	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	38
2.2 Inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA indirecto).....	38
2.3 Cuantificación de RNA genómico.....	39
2.3.1 Extracción de RNA total.....	39
2.3.2 RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	40
2.4 Inmuno-microscopía electrónica.....	41

3. RESULTADOS.....	42
3.1 Estimación de la concentración viral en planta mediante ELISA indirecto.	43
3.2 Estimación de la concentración viral en planta mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	45
3.3 Comparación ELISA vs. RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	53
4. DISCUSIÓN.....	55

**CAPÍTULO II. ACTIVIDAD REPLICATIVA Y SILENCIAMIENTO VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS**

1. INTRODUCCIÓN.....	63
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	64
2.2 Detección y cuantificación de sgRNAs de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	65
2.2.1 Extracción de RNA total.....	65
2.2.2 Síntesis de ribosondas específicas para cada aislado.....	65
2.2.3 Hibridación molecular tipo Northern blot.....	66
2.3 Detección y cuantificación de los siRNAs mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	67
2.3.1 Extracción de siRNAs.....	67
2.3.2 Hibridación molecular tipo Northern blot.....	68
2.4 RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	68
2.5 Ensayo de la capacidad supresora de la proteína p23 de distintos aislados de CTV.....	68
2.5.1 Clonación del gen <i>p23</i> en un plásmido binario.....	68
2.5.2 Ensayo de supresión de la expresión transitoria de GFP mediante agroinfiltración de <i>p23</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> 16c.....	70
2.5.3 Detección de la expresión del transgén <i>gfp</i> mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	71
2.5.4 Detección de los siRNAs específicos de <i>gfp</i> mediante hibridación molecular tipo Northern blot.....	72

<b>3. RESULTADOS</b> .....	72
<b>3.1</b> Detección y cuantificación de los sgRNAs de los genes <i>p20</i> y <i>p23</i> en distintas especies infectadas.....	72
<b>3.2</b> Detección y cuantificación de siRNAs derivados de CTV en plantas infectadas .....	77
<b>3.3</b> Evaluación de la capacidad supresora de la proteína p23 de los distintos aislados de CTV.....	82
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	84

### **CAPÍTULO III. DISTRIBUCIÓN DE CTV EN EL HUÉSPED NARANJO AMARGO**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	97
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	98
<b>2.1</b> Huéspedes cítricos y aislados de CTV.....	98
<b>2.2</b> Inmunoimpresión-ELISA.....	98
<b>2.3</b> Estimación de la acumulación viral mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	99
<b>2.4</b> Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV mediante hibridación molecular en formato Northern blot.....	100
<b>2.5</b> Determinación de la frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones .....	100
<b>3. RESULTADOS</b> .....	100
<b>3.1</b> Análisis de la distribución de CTV en naranjo amargo de semilla mediante inmuno-impresión-ELISA.....	100
<b>3.2</b> Acumulación de CTV en los distintos tejidos de naranjo amargo de semilla.....	103
<b>3.3</b> Acumulación de CTV en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	104
<b>3.4</b> Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en distintos tejidos de naranjo amargo de semilla.....	110
<b>3.5</b> Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en corteza de naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	112

3.6 Frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones.....	115
4. DISCUSIÓN.....	119

**CAPÍTULO IV. CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE NARANJO AMARGO TRAS LA INFECCIÓN CON DOS AISLADOS DE CTV INDUCTORES DE DISTINTA SINTOMATOLOGÍA**

1. INTRODUCCIÓN.....	129
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	130
2.1 Material vegetal y aislados de CTV.....	130
2.2 Diseño experimental.....	131
2.3 Preparación de las muestras de CdnA marcadas.....	132
2.3.1 Extracción de RNA total.....	132
2.3.2 Marcaje del cDNA.....	132
2.4 Hibridación con las micromatrices.....	133
2.5 Obtención de los datos de las micromatrices.....	133
2.6 Validación de los datos de expresión de las micromatrices mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	135
2.7 Tinción histológica.....	135
3. RESULTADOS.....	136
3.1 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado asintomático T385.....	137
3.2 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado sintomático T318A.....	140
3.2.1 Antes de la expresión del síndrome de SY (pre-SY).....	140
3.2.2 Tras la expresión del síndrome de SY (4 meses p.i.).....	141
3.2.3 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo inoculado con el aislado T318A asociados a la expresión del síndrome de SY.....	142
3.3 Validación de los resultados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	143

<b>3.4</b> Histopatología de naranjo amargo infectado con el aislado sintomático.....	145
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	146
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	155
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	165
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	171



## PRINCIPALES ABREVIATURAS UTILIZADAS

- aa-dUTP: 5-(3-aminoalil)-2' -deoxi-UTP  
 AFT: agua fisiológica tamponada  
 AGO: proteínas de la familia argonautas  
 BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato  
 BSA: seroalbúmina bovina  
 BYV: *Beet yellows virus* (virus del amarilleo de la remolacha)  
 CC: citrange Carrizo  
 cDNA: DNA complementario  
 CFGP: Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos  
 CLBV: *Citrus leaf blotch virus* (virus del manchado foliar de los cítricos)  
 CM: *Citrus macrophylla*  
 CMV: *Cucumber mosaic virus* (virus del mosaico del pepino)  
 CP: proteína mayoritaria de la cápsida  
 CPm: proteína minoritaria de la cápsida  
 Ct: *threshold cycle* (ciclo umbral)  
 CTV: *Citrus tristeza virus* (virus de la tristeza de los cítricos)  
 DAS-ELISA: *Double antibody sandwich* ELISA (ELISA con dos anticuerpos)  
 DNA: ácido desoxirribonucleico  
 DNasa: desoxirribonucleasa  
 DO: densidad óptica  
 DRB: proteína de unión a dsRNA  
 dRNA: RNA defectivo  
 dsRNA: RNA de doble cadena  
 DTT: ditioneitol  
 dTTP: desoxitimina trifosfato  
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
 ELISA: *Enzyme-linked immuno sorbent assay* (Inmunoensayo enzimático)  
 EST: *Expressed sequence tag* (indicador de secuencia expresada)  
 FAA: solución de formol, ácido acético glacial, alcohol  
 GFP: *Green Fluorescent Protein* (Proteína fluorescente verde)  
 gRNA: RNA genómico  
 HEL: helicasa  
 HR: respuesta hipersensible  
 HSP: *heat shock protein* (proteína de choque térmico)  
 IEM: inmuno microscopía electrónica  
 LB: medio de cultivo Luria-Bertani  
 LMT: *low molecular-weight tristeza* (RNAs subgenómicos 5' co-terminales de bajo peso molecular de CTV)  
 L-Pro: proteasa tipo papaina  
 MACPF: proteína componente del complejo de ataque a membrana  
 MES: ácido N-morfolino etano sulfónico  
 MET: metiltransferasa  
 miRNAs: microRNAs  
 MNSV: *Melon necrotic spot virus* (virus del cribado del melón)  
 MOPS: ácido N-morfolino propano sulfónico  
 MP: *movement protein* (proteína de movimiento)  
 mRNA: RNA mensajero  
 MT: metalotioninas  
 NBT: nitroazul de tetrazolio  
 NOS: nopalina sintasa  
 NTR: *non-translated terminal region* (región terminal no codificante)  
 ORF: *open reading frame* (pauta de lectura abierta)  
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
 PEG: propilenglicol

## ABREVIATURAS

---

PVP: polivinilpirrolidona

q-RT-PCR: RT-PCR cuantitativa a tiempo real

QTLs: *quantitative trait loci* (regiones del genoma responsables de caracteres cuantitativos)

RDR / RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA

RISC: *RNA-induced silencing complex* (complejo ribonucleoproteico que efectúa el silenciamiento guiado por RNA)

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: ribonucleasa

ROS: formas reactivas de oxígeno

RT: retrotranscripción

SDS: dodecil sulfato sódico

sgRNA: RNA subgenómico

siRNAs: *small interfering RNAs* (RNA interferentes de pequeño tamaño)

SSC: citrato sódico salino

ssRNA: RNA de cadena sencilla

SY: *seedling yellows*

TBA: alcohol ter-butílico

TBE: Tris-borato-EDTA

TBSV: *Tomato bushy stunt virus* (virus del enanismo arbustivo del tomate)

TMV: *Tobacco mosaic virus* (virus del mosaico del tabaco)

Tris: Trihidroximetilaminometano

TuMV: *Turnip mosaic virus* (virus del mosaico del nabo)

UV: radiación ultravioleta





## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS

El término “cítricos” engloba al conjunto de especies e híbridos que pertenecen a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, incluidos en la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioideae*. Estas especies son originarias del sudeste asiático y su cultivo probablemente se inició en China y posteriormente se dispersó a otras zonas del mundo. En la actualidad el cultivo de los cítricos se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En España se cultivan principalmente en las zonas costeras del Este y del Sur de la Península Ibérica. Las especies cítricas cultivadas se pueden englobar en cuatro grandes grupos: las naranjas, que incluye naranjas dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y amargas (*C. aurantium* L.); las mandarinas, incluyendo satsumas (*C. unshiu* (Mak.) Marc.) y clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.); los limones (*C. limon* (L.) Burm. f.) y limas (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.); las zamboas (*C. grandis* (L.) Osb.) y pomelos (*C. paradisi* Macf.). Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) indican que en 2005 se dedicaban más de 7 millones de hectáreas (Ha) al cultivo de los cítricos, con una producción aproximada de 10<sup>7</sup> millones de toneladas constituyendo así el cultivo frutal de mayor importancia en el mundo. España dedica unas 300.000 Ha a este cultivo y produce anualmente más de 6 millones de toneladas, ocupando el quinto puesto entre los países productores y el primer lugar como país exportador de fruta fresca.

En la mayor parte del mundo, el cultivo de los cítricos se efectúa injertando yemas de una variedad seleccionada sobre un patrón obtenido de semilla. Esta práctica, que tiene gran importancia comercial y productiva, tiene dos graves inconvenientes desde el punto de vista patológico: i) reduce la diversidad genética del cultivo, lo que globalmente hace a éste más vulnerable al ataque de patógenos y ii) el proceso de multiplicación vegetativa tiende a acumular y perpetuar patógenos transmisibles por injerto que han entrado en la variedad en algún momento.

La utilización de patrones para el cultivo de los cítricos se remonta a la segunda mitad del siglo XVII y los patrones utilizados eran el cidro (*C. medica* L.) y el limonero, si bien se cultivaban también naranjos de semilla sin injertar. La aparición de las podredumbres causadas por los oomicetos del género *Phytophthora* durante la

segunda mitad del siglo XIX obligó a los agricultores a utilizar el patrón naranja amargo (NA) con el fin de evitar las enormes pérdidas producidas por este patógeno. El patrón NA presenta excelentes cualidades agronómicas: induce buena productividad y calidad de fruto, es resistente a la asfixia radical, salinidad, clorosis férrica, sequía, *Phytophthora spp* y *Armillaria mellea* y tolerante a diversas enfermedades transmisibles por injerto como exocortis, psoriasis o caquexia. El uso del patrón NA se extendió a la mayoría de las zonas citrícolas y fue la base de la expansión de la citricultura a comienzos del siglo XX. Sin embargo la dispersión del virus de la tristeza de los cítricos y el decaimiento y muerte que este ocasionó en los árboles injertados sobre NA, obligó a reconvertir la citricultura de los países afectados utilizando otros patrones tolerantes o resistentes al virus. Además de las elevadas pérdidas económicas, este proceso causó dos tipos de daños indirectos: i) ninguno de los patrones tolerantes empleados poseía la rusticidad y adaptabilidad del NA a todo tipo de condiciones, lo que dio lugar a nuevos problemas agronómicos (Moreno *et al.*, 2008) y ii) los nuevos patrones utilizados eran sensibles a distintos patógenos transmisibles por injerto, principalmente viroides, a los que el NA era tolerante (Duran-Vila *et al.*, 1988; Van-Vuuren *et al.*, 1993). Este segundo grupo de problemas se evitó en buena parte mediante programas de saneamiento, cuarentena y certificación (Navarro, 1993; Navarro *et al.*, 2002).

En la actualidad, el citrange Carrizo es el patrón más utilizado en España por su tolerancia al decaimiento causado por el virus de la tristeza y a la buena calidad de fruta que induce en las variedades, sin embargo, presenta problemas de tolerancia a la salinidad y a la caliza que no se observaban con el uso del patrón NA.

## 2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos son susceptibles a numerosos microorganismos que causan enfermedades y mermas apreciables en su capacidad productiva, o incluso la muerte. Entre ellas, las enfermedades transmisibles por injerto (Tabla 1) tienen especial importancia en este cultivo. Aunque algunas de ellas se pueden controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal propagado (Navarro, 1993; Navarro *et al.*, 2002), mientras que otras se transmiten mecánicamente con herramientas de corte o son dispersadas por insectos vectores y resultan más difíciles

de controlar. Trece de estas enfermedades han sido detectadas en España, siendo la tristeza la de mayor impacto económico (Duran-Vila y Moreno, 2000).

**Tabla 1.** Enfermedades transmisibles por injerto más importantes de los cítricos agrupadas por tipo de agentes causales.

Enfermedad	Agente causal	Género	Transmisión por vectores	Detección en España
<b>Viroides</b>				
Caquexia	Hop stunt viroid (HSVd)	Hostuviroid	-	+
Exocortis	Citrus exocortis viroid (CEVd)	Pospiviroid	-	+
Bolsas de goma	Probablemente un viroide	?	-	-
Corteza gomosa	Probablemente un viroide	?	-	-
<b>Virus</b>				
Enanismo del mandarino satsuma	Satsuma dwarf virus (SDV)	Sadwavirus	?	-
Manchado foliar de los cítricos	Citrus leaf blotch virus (CLBV)	Citriivirus	?	+
Hoja rasgada	Citrus tatter leaf virus (CTLV)	Capilovirus	-	-
Hoja rugosa	Citrus leaf rugose virus (CiLRV)	Ilarvirus	-	-
Leprosis	Citrus leprosis virus (CiLV)	Cilervirus	+	-
Mosaico amarillo	Citrus yellow mosaic virus (CyMV)	Badnavirus	?	-
Protuberancias nerviales-agallas en la madera	Probablemente un luteovirus	?	+	+
Psoriasis	Citrus psorosis virus (CPsV)	Ophiovirus	?	+
Tristeza	Citrus tristeza virus (CTV)	Closterovirus	+	+
Muerte súbita	Etiología desconocida / Citrus suden death-associated virus + CTV?	?	+	-
Variegación infecciosa	Citrus variegation virus (CVV)	Ilarvirus	-	+
Concavidades gomosas	Etiología desconocida/posiblemente virus	?	-	+
Cristacortis	Posiblemente virus	?	-	+
Enanismo clorótico	Posiblemente virus	?	+	-
Impietratura	Posiblemente virus	?	-	+
Incompatibilidad sobre limonero rugoso	Posiblemente virus	?	?	+
Manchas anulares amarillas	Posiblemente virus	?	-	+
<b>Bacterias</b>				
Clorosis variegada	Xylella fastidiosa	Xylella	+	-
Huanglongbing	<i>Candidatus</i> Liberibacter sp.	c. Liberibacter	+	-
<b>Micoplasmas</b>				
Stubborn	Spiroplasma citri	Spiroplasma	+	+
Escobas de bruja de la lima	<i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia	c. Phytoplasma	+	-
<b>Otros</b>				
Blight	Etiología desconocida		-	-

### 3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

La tristeza es una de las enfermedades que ha tenido mayor importancia para los cítricos, tanto por los daños económicos que ha causado, como por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo de las zonas afectadas. La

tristeza está causada por un closterovirus (*Citrus tristeza virus*, CTV) (Fawcett y Wallace, 1946; Kitajima y Costa, 1963; Bar-Joseph *et al.*, 1970, 1972; Flores *et al.*, 1975; Garnsey *et al.*, 1977) que, al igual que los cítricos, procede probablemente de regiones de Asia donde estaría bien adaptado a las variedades cítricas locales. CTV fue dispersado en nuevas áreas citrícolas mediante el movimiento de material vegetal infectado durante los siglos XIX y XX, un periodo en el cual la mejora de los sistemas de transporte coincidió en muchos países con un aumento del interés económico y botánico por los cítricos.

Actualmente CTV se encuentra presente con incidencia desigual en casi todas las zonas citrícolas del mundo. Es prácticamente endémico en todas las zonas de Asia, Australia, África del Sur y Sudamérica, mientras que tiene una incidencia mínima en varios países del Mediterráneo (Cambra y Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2008). Se estima que en España ha causado la muerte de más de 50 millones de árboles de naranjo dulce, mandarino y pomelo injertados sobre NA (Moreno *et al.*, 2008).

### 3.1 Gama de huéspedes y síntomas

CTV infecta de forma natural plantas de la familia *Rutaceae*, aunque se ha transmitido experimentalmente a algunas especies del género *Passiflora* (Müller *et al.*, 1974; Cambra y Moreno, 2000). Dentro de la familia *Rutaceae* se ha detectado en la mayoría de las especies y variedades de los géneros *Citrus* y *Fortunella*, y ha podido transmitirse a algunas especies de los géneros *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* y *Swinglea* (Bar-Joseph y Lee, 1989; Bar-Joseph *et al.*, 1989, Moreno *et al.*, 2008). Por otra parte, existen especies resistentes que impiden la acumulación del virus, como *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. y algunos híbridos de éste con naranjo dulce o pomelo, *Severina buxifolia* y *Swinglea glutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987). No se han encontrado huéspedes herbáceos que pudieran ser utilizados como modelo experimental, lo que ha dificultado mucho la caracterización genética y molecular de CTV.

El tipo e intensidad de los daños provocados por CTV en campo depende de las especies infectadas, del patrón sobre el que están injertadas, del aislado del virus y de las condiciones ambientales (Grant y Costa, 1951; Aubert y Bové, 1984;

Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993). En general los síntomas producidos por CTV pertenecen a tres categorías: 1) Decaimiento (D) de plantas propagadas sobre NA, 2) Acanaladuras en la madera (AM) de distintas variedades y 3) Amarilleo de las plantas de semilla de algunas especies (*seedling yellows*, SY).

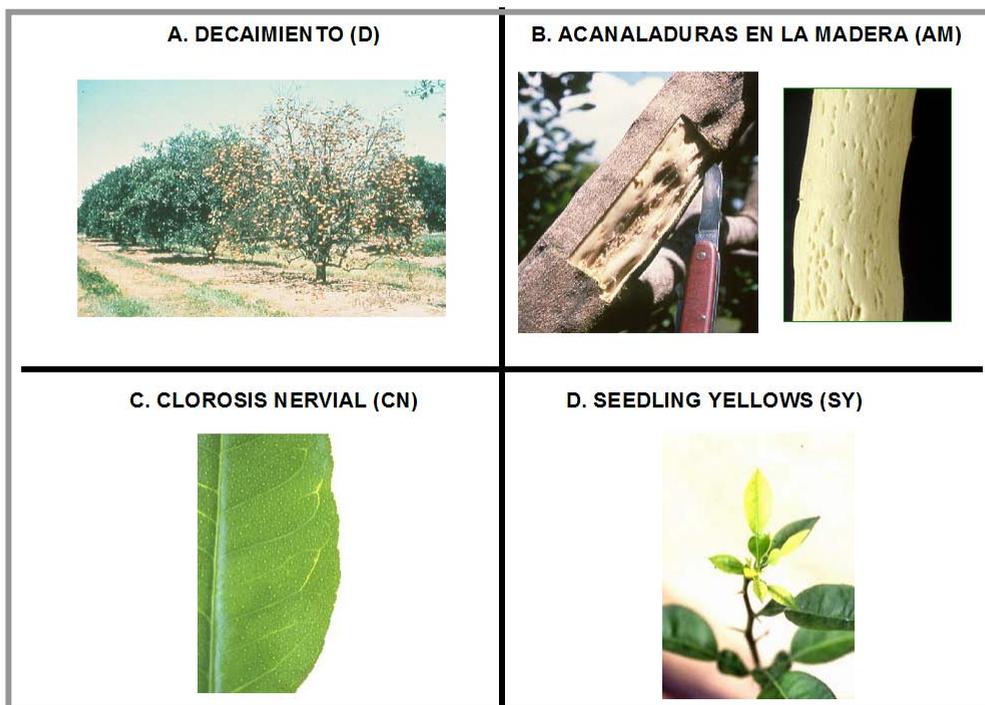
El decaimiento y muerte de plantas propagadas sobre NA fue el primer síndrome que se describió y es consecuencia de la muerte del floema del NA por debajo de la línea de injerto causada por el virus (Schneider, 1959), lo que da lugar a la desnutrición y muerte de las raicillas y, en consecuencia, al amarilleo y progresiva defoliación de la copa (Fig. 1A). Las combinaciones sensibles al síndrome D incluyen los naranjos dulces, mandarinos y pomelos, pero no el limonero, propagados sobre NA. El proceso de decaimiento puede durar varios años, sin embargo, en ocasiones se observa un síndrome de colapso que acaba con la vida del árbol en pocas semanas (Ben Ze'ev *et al.*, 1989). La mayoría de los aislados de tristeza causan decaimiento de las combinaciones sobre NA, si bien se han descrito algunos que son asintomáticos sobre esta combinación (Bové *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1991, Albiach-Martí, *et al.*, 2000b).

La segunda categoría de síntomas producidos por el virus de la tristeza es la formación de AM en algunas especies, sean cultivadas como plantas francas o injertadas sobre cualquier patrón (Figura 1B). Este síntoma, que da lugar a enanismo y mermas en la producción y calidad de la fruta, suele ir acompañado de clorosis nervial (CN) discontinua en las hojas jóvenes (Figura 1C).

Finalmente, el síndrome de SY de las plántulas de pomelo, NA o limonero es una reacción que producen algunos aislados de tristeza en invernadero, y se caracteriza por la presencia de hojas amarillas y una detención del crecimiento (Figura 1D) (Fraser, 1952, 1959; Wallace, 1978).

Algunas especies como la lima Mexicana, el cidro Etrog o *C. macrophylla* son muy sensibles al virus y muestran síntomas con casi todos los aislados (Grant, 1959; McClean, 1974) por lo que frecuentemente han sido utilizadas como plantas indicadoras para el diagnóstico de tristeza, mientras que otras, como los mandarinos son extraordinariamente tolerantes (Bitters, 1972). No obstante, se han descrito aislados asintomáticos en lima Mexicana (Bové *et al.*, 1988; Albertini *et al.*, 1988), y otros que producen AM en mandarinos (Muharam y Whitte, 1991; Koizumi, 1991). Otras especies como los pomelos, naranjos dulces, kumquats, etc, tienen una

sensibilidad intermedia y muestran síntomas con algunos aislados, pero no con otros (Bitters, 1972). Mientras que en algunos sistemas planta-patógeno la virulencia está relacionada con la multiplicación del patógeno en otros parecen sucesos independientes (Sacristán y García-Arenal, 2008). En este trabajo se aborda un análisis de las pautas de acumulación viral de cepas de CTV con distinta virulencia en huéspedes con distinta sensibilidad al virus.



**Fig. 1** Síntomas inducidos por la infección de CTV: A. Decaimiento de plantas propagadas sobre NA; B. Acanaladuras en la madera; C. Clorosis nervial; D. Amarilleo y detención del crecimiento en plántulas de NA (SY).

### 3.2 Diagnóstico

Durante años el diagnóstico de CTV se realizó utilizando plantas indicadoras, principalmente lima Mexicana y *C. macrophylla*, que tras la infección de CTV mostraban CN en hojas jóvenes, acopamiento de hojas, entrenudos cortos y AM (Roistacher, 1991). Con la purificación del virus y la producción de anticuerpos contra la proteína de la cápsida, se empezaron a utilizar para el diagnóstico rutinario inmunoensayos tipo ELISA (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra

*et al.*, 1979, 1991; Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990; Garnsey *et al.*, 1993; Nikolaeva *et al.*, 1998). Posteriormente, tras la obtención de secuencias del genoma de CTV se desarrollaron diversas técnicas de diagnóstico basadas en la detección específica del RNA viral, como son las técnicas de hibridación molecular con sondas de DNA o RNA (Rosner y Bar-Joseph, 1984; Narváez *et al.*, 2000; Barbarossa y Savino, 2006) y RT-PCR (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Recientemente se han desarrollado protocolos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para la detección sensible y cuantificación del virus en tejidos infectados y pulgones virulíferos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Saponari *et al.*, 2008) y para la detección y cuantificación de diferentes variantes de secuencia en aislados con distinta virulencia (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009).

### 3.3 Transmisión

La dispersión de CTV a nuevas áreas es consecuencia de la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión local la efectúan diversas especies de pulgones. La transmisión por pulgones se produce de forma semi-persistente con distinta eficacia dependiendo de la especie transmisora, de los aislados de CTV, de las especies donante y receptora y de las condiciones ambientales (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Raccach *et al.*, 1980; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984, 1988a,b; Roistacher y Bar-Joseph, 1987; Yokomi y Garnsey, 1987). El vector más eficiente es *Toxoptera citricida* (Yokomi *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1968; McClean, 1975; Lastra *et al.*, 1991; Grisoni y Riviéri, 1993), que se halla en Asia, América del Sur y parte de América Central, islas del Caribe, Florida (EEUU), África Central y del Sur. En los últimos años este áfido ha sido detectado en el Norte de España y Portugal (Ilharco *et al.*, 2005), lo que supone una amenaza para la citricultura de la cuenca del Mediterráneo. El segundo vector más eficiente es *Aphis gossypii* (Norman *et al.*, 1968; Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher *et al.*, 1984; Raccach y Singer, 1987; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a, b; Yokomi *et al.*, 1989), que es el más importante en Norteamérica y la cuenca del Mediterráneo. Otras especies de pulgones como *A. spiraecola* y *T. aurantii* son menos eficientes (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Yokomi y Garnsey, 1987), pero al tener poblaciones más numerosas que *A. gossypii*, pueden tener un papel en la dispersión de CTV en algunas zonas (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984).

### 3.4 Control de la enfermedad

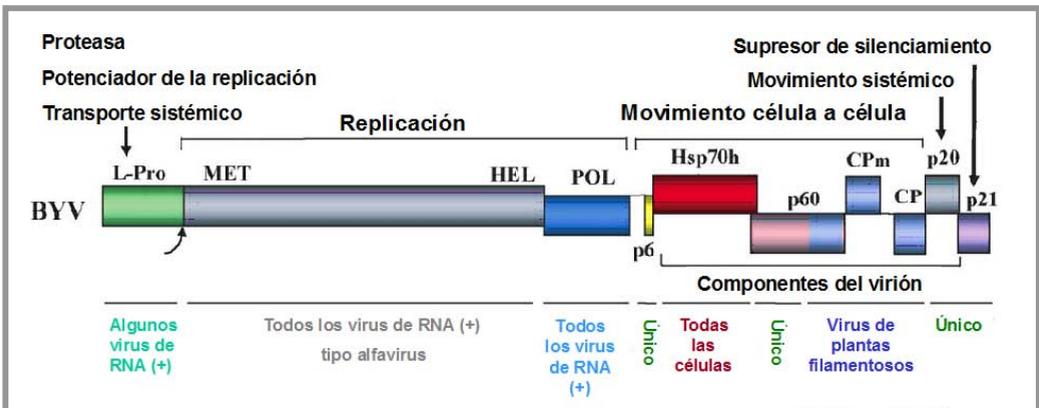
No existen métodos curativos contra los virus y sólo pueden utilizarse medidas de tipo preventivo o que ayuden a disminuir los daños causados. Las medidas preventivas tienen como objetivo evitar la infección y reducir la difusión del patógeno. En países o zonas cítricas libres de CTV las mejores medidas de control son los programas de cuarentena y certificación del material propagativo (Navarro *et al.*, 2002). Cuando el virus se ha introducido en una zona cítrica en la que el patrón predominante es el NA, pero su incidencia es aún muy baja, se puede establecer un programa de erradicación de árboles infectados (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Kyriakou *et al.*, 1996; Gottwald *et al.*, 2002). Cuando la erradicación es inviable debido a la eficiente dispersión de CTV por los vectores, la propagación de los cítricos sobre patrones tolerantes es la única opción viable para evitar el decaimiento por tristeza. En zonas donde son endémicas cepas virulentas de CTV, se pueden evitar los daños de éstas mediante un programa de protección cruzada que consiste en preinocular las plantas con un aislado avirulento que evita la acumulación y los efectos de la cepa virulenta (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987).

Otras opciones para controlar los daños serían la obtención de plantas resistentes por mejora genética con selección asistida por marcadores ligados al gen de la resistencia (Mestre *et al.*, 1997b), o la generación de plantas con resistencia mediada por genes del virus mediante transformación genética (Beachy *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 1995a; Peña y Séguin, 2001; Ghorbel *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2005). Sin embargo, la incorporación de genes de resistencia a CTV (Mestre *et al.*, 1997a, b, c; Fang y Roose, 1999; Yang *et al.*, 2001, 2003; Rai, 2006) en variedades comerciales mediante cruzamientos convencionales no ha sido posible debido a la compleja biología reproductiva de los cítricos, su elevada heterocigosis, los largos periodos juveniles de las plantas de semilla y el gran tamaño que tienen en su fase adulta. En cuanto a la incorporación de resistencia derivada del patógeno mediante la transformación genética, hasta ahora no se han obtenido resultados consistentes, debido a factores desconocidos que afectan el fenotipo de resistencia de las distintas propagaciones obtenidas (Moreno *et al.*, 2008).

### 3.5 El virus de la tristeza de los cítricos

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), es un miembro del género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph y Lee, 1989a; Martelli *et al.*, 2000). Los viriones de los miembros de esta familia son de morfología filamentosa (11-12 x 800-2000 nm), presentan genomas formados por una, dos o tres moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que encapsidan separadamente, y al menos dos proteínas de cápsida (CP y CPm), cuyas subunidades se ensamblan separadamente en cada extremo del virión formando una estructura helicoidal que le da una morfología similar a una serpiente de cascabel (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996). Todos los miembros de esta familia tienen conservados un bloque de cinco genes que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje y movimiento de los viriones y que incluye una pequeña proteína transmembrana, otra homóloga de las proteínas de choque térmico de la familia HSP70, una proteína de cápsida mayoritaria (CP) y una versión minoritaria de la misma (CPm), y una última proteína de mayor tamaño considerada también divergente de CP (Dolja *et al.*, 2006) (Fig. 2).

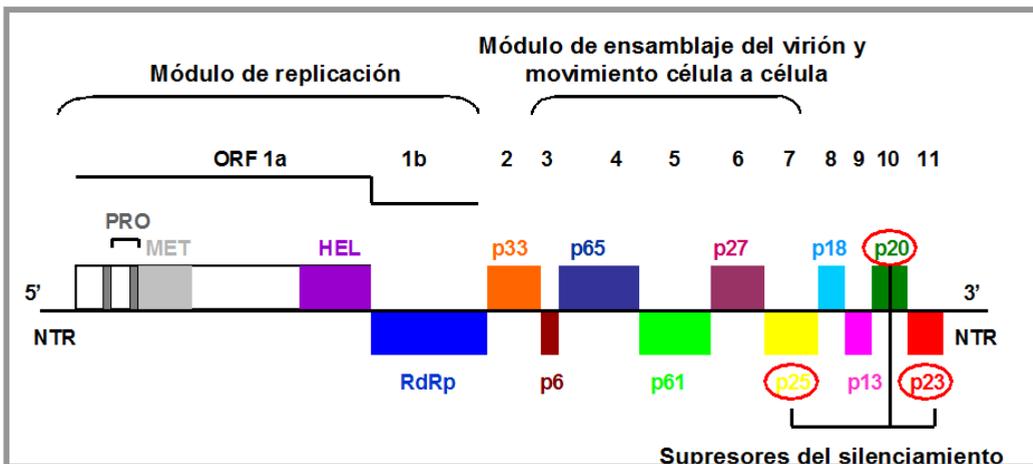
En el caso de CTV, los viriones filamentosos tienen unos 11 x 2000 nm de tamaño y están compuestos por una molécula de RNA genómico (gRNA) de aproximadamente 20 Kb y dos proteínas de cubierta de 25 y 27 kDa, que aproximadamente recubren el 97 y el 3 % de la longitud del virión, respectivamente.



**Fig. 2** Organización genómica de *Beet yellows virus* (BYV), miembro tipo del género *Closterovirus*. Se indican las funciones virales de las distintas regiones génicas y las conexiones evolutivas de algunas de ellas con virus de plantas de otros géneros (tomado de Dolja *et al.*, 2006).

### 3.5.1 Organización genómica de CTV

El gRNA de CTV está organizado en 12 pautas de lectura abierta (*open reading frames*, ORFs) que potencialmente codifican al menos 17 proteínas, y dos regiones no codificantes (*non-translated terminal regions*, NTRs) en los extremos 5' y 3' (Sekiya *et al.*, 1991; Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). La mitad 5' del genoma codifica el módulo de replicación formado por las ORFs 1a y 1b. La primera codifica una poliproteína de 349 kDa, que incluye dos regiones que tienen homología con proteasas tipo papaina (L-Pro) y regiones con dominios característicos de helicasa (HEL) y metiltransferasa (MET). La segunda codifica una proteína con los dominios típicos de las RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp) (Karasev *et al.*, 1995) (Fig. 3). La mitad 3' del genoma contiene: i) el módulo de cinco genes (*p6*, *p65*, *p61*, *p27* y *p25*) característico de los closterovirus, que codifican proteínas potencialmente implicadas en el ensamblaje del virión y el movimiento célula a célula; ii) el gen *p20* (homólogo al gen *p21* del BYV) y iii) cuatro genes que codifican las proteínas p33, p18, p13 y p23, que no tienen homología con proteínas descritas en otros closterovirus (Dolja *et al.*, 2006) (Fig. 3).



**Fig. 3** Representación gráfica de la organización genómica de CTV. Las cajas representan las ORFs con su respectivo número y en la parte superior o inferior se indica el nombre de la proteína que codifican. Se indican los dominios homólogos de metiltransferasa (MET), helicasa (HEL) y proteasa (PRO) presentes en la ORF 1a y las regiones no traducibles (NTR) de los extremos 5' y 3'.

La proteína p27 (CPm) recubre los primeros 627 nt del extremo 5' del gRNA y la proteína p25 (CP) los nucleótidos restantes; las proteínas p65 y p61 ayudan en esta

función actuando como “chaperonas moleculares” (Satyanarayana *et al.*, 2000, 2004). Las secuencias localizadas en el extremo 5' NTR están relacionadas con la unión de p27 a este extremo (Satyanarayana *et al.*, 2004). La proteína p20 se acumula en los cuerpos de inclusión amorfos en células infectadas (Gowda *et al.*, 2000), mientras que p23, una proteína de unión a RNA (López *et al.*, 2000), controla la acumulación asimétrica de RNAs de ambas polaridades durante la replicación y transcripción del gRNA (Satyanarayana *et al.*, 2002). p20, p23 y p25 actúan como proteínas supresoras de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*: p23 suprime el silenciamiento a nivel intracelular, p25 a nivel intercelular y p20 a los dos niveles (Lu *et al.*, 2004). Además, p23 podría actuar como un determinante de patogenicidad (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005), ya que plantas transgénicas de lima Mexicana que expresaban p23 mostraron los síntomas foliares característicos de CTV y recientemente se ha localizado en la región p23-3'-NTR el determinante de SY en NA (Albiach-Martí *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Variabilidad genética

Actualmente se conoce la secuencia completa de 16 aislados con diferentes características biológicas y orígenes geográficos, que incluyen los aislados T36 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995) y T30 (Albiach-Martí *et al.*, 2000b) de Florida, VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 (Vives *et al.*, 1999) y T318A (Ruiz-Ruiz, *et al.*, 2006) de España, SY568 de California (Yang *et al.*, 1999), NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001), Qaha de Egipto (AY340974), B165 de India (EU076703), un aislado de México (DQ272579) y seis de Nueva Zelanda: NZB18 y NZM16 (Harper *et al.*, 2009), NZTH30, NZTH28, NZM12 y NZG90 (FJ525431 a FJ525436), más secuencias parciales de otros aislados. Las secuencias de T30 y T385 por un lado, y las de T36, Qaha y el aislados mejicano por otro, son casi idénticas. T30 y T385 son esencialmente asintomáticos, T36 produce síntomas en lima, D en naranjo dulce sobre NA y SY; VT produce además AM suave en pomelo, mientras que los aislados NuagA, SY568R y T318A son más virulentos y, al menos, los dos últimos, producen AM en pomelo, naranjo dulce y otras especies. Los aislados NZB18 y B165 pertenecen a un nuevo genotipo virulento (Roy y Brlansky, 2008; Harper *et al.*, 2009), mientras que NZM16 presenta un fenotipo asintomático (Harper

*et al.*, 2008). NZTH30, NZTH28, NZM12 y NZG90 rompen la resistencia de gen Ctv e infectan *P. trifoliata* (Harper *et al.*, 2008).

La variación genética está irregularmente distribuida a lo largo del genoma de CTV, siendo el extremo 3' NTR la región más conservada, con una identidad entre aislados superior al 95% y el extremo 5' NTR la más variable, con valores de identidad, en algunos casos, inferior al 50% (López *et al.*, 1998). De la misma manera, se ha observado una distribución desigual de la variación genética entre regiones codificantes e incluso dentro de un mismo gen, que probablemente reflejan diferentes presiones de selección a lo largo del genoma (Rubio *et al.*, 2001, Martín *et al.*, 2009).

Comparaciones de secuencia entre aislados de CTV con orígenes geográficos y características patológicas diferentes mostraron: i) un elevado grado de conservación entre los genomas de CTV separados en el tiempo y en el espacio (Vives *et al.*, 1999; Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009), ii) una estructura poblacional variable entre aislados, con algunos de ellos formados por una variante de secuencia mayoritaria y algunas minoritarias estrechamente relacionadas (Albiach-Martí *et al.*, 2000b), mientras que otros muestran una estructura compleja con variantes de secuencia altamente divergentes (Vives *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009) y iii) frecuentes eventos de recombinación entre secuencias divergentes (Sambade *et al.*, 2003; Vives *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2009).

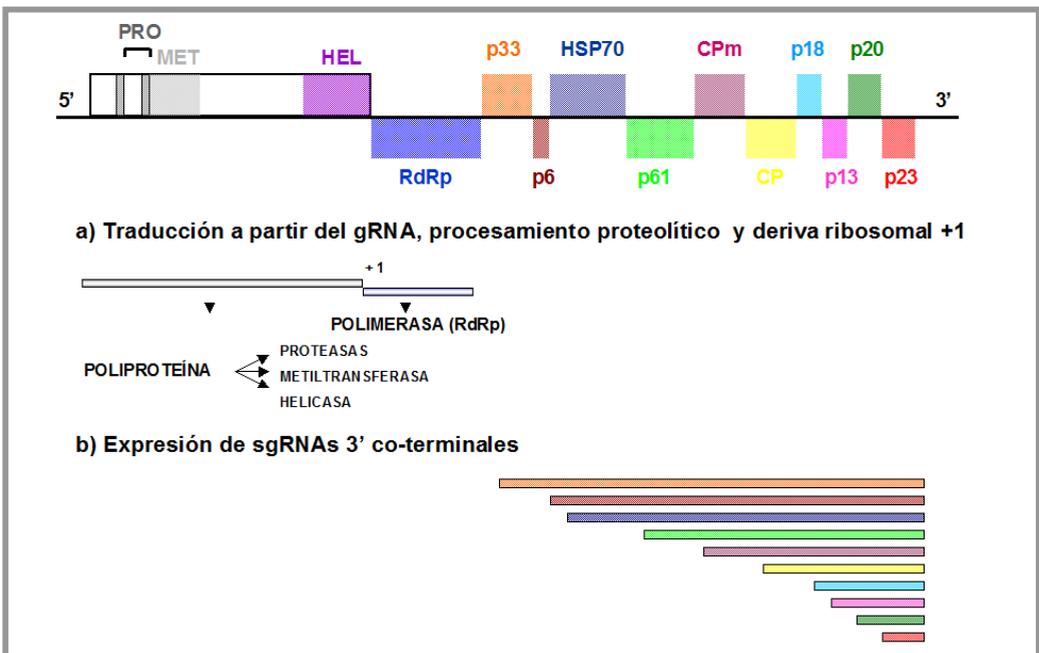
### 3.5.3 Expresión del genoma viral

La expresión del genoma de CTV incluye tres estrategias ampliamente utilizadas por los virus con RNA de polaridad positiva: i) procesamiento proteolítico, ii) deriva ribosomal del tipo +1 y iii) producción de sgRNAs 3' co-terminales (Fig. 5) (Hilf *et al.*, 1995; Karasev *et al.*, 1995, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2002 a, b; Gowda *et al.*, 2001, 2003 a, b; Ayllón *et al.*, 2003, 2004).

La replicación de CTV implica la síntesis de una cadena de RNA complementaria de polaridad negativa que sirve como molde para generar nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva que constituyen el genoma del virus. Las ORF 1a y 1b se traducen directamente a partir del gRNA. La primera codifica una poliproteína de aproximadamente 349 KDa, mientras que la traducción ocasional de

la ORF 1b ocurre por un mecanismo de deriva ribosomal tipo +1 y produce una poliproteína de unos 402 KDa que es procesada proteolíticamente (Fig. 5a) (Karasev *et al.*, 1995).

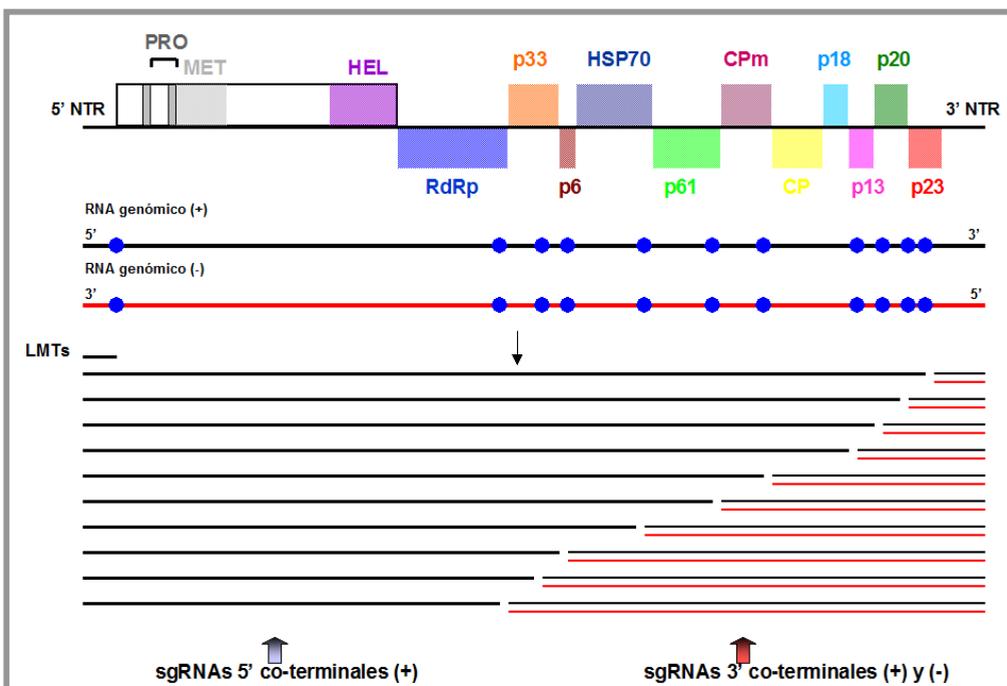
Los 10 genes de la mitad 3' del genoma se expresan mediante la síntesis de sgRNAs 3' co-terminales que actúan como mensajeros (mRNA), a partir de los cuales se traduce el gen que ocupa la posición 5' terminal (Hilf *et al.*, 1995) (Fig. 5b). La producción de sgRNAs le permite al virus regular la expresión de cada gen independientemente de los otros en tiempo y en cantidad (Navas-Castillo *et al.*, 1997). El sgRNA de la ORF 11, que codifica la proteína p23, es el primero que se detecta al inicio de la infección y las ORFs 10 y 7, que codifican las proteínas p20 y p25 son los más abundantes (Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004).



**Fig. 5** Representación gráfica del genoma de CTV y las estrategias utilizadas para la expresión de las distintas ORFs del extremo 5' y 3'.

Se han localizado en el gRNA las secuencias reguladoras (elementos controladores) de la expresión de cada sgRNA, en posición 5' con respecto a su inicio de transcripción (Gowda *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2003) (Fig. 6). Cada elemento controlador induce la formación de tres RNAs diferentes: (1) un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva utilizado como mensajero para la expresión del gen

adyacente a dicho elemento controlador, (2) un RNA de polaridad negativa complementario a este último y (3) un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que se extiende desde el extremo 5' del gRNA al extremo 5' del elemento controlador (Fig. 6) (Gowda *et al.*, 2001), originado probablemente por la terminación prematura de la síntesis de nuevas copias del gRNA en las proximidades de cada elemento controlador.



**Fig. 6** Modelo propuesto para la replicación y formación de las diferentes especies de RNAs de CTV en células infectadas. Las líneas negras indican las cadenas positivas y las rojas las negativas del gRNA, los sgRNAs y los LMTs. Con círculos azules se indican las posiciones relativas de los elementos controladores que inducen la formación de los sgRNAs.

Las células infectadas contienen además dos RNAs 5' co-terminales de cadena simple y polaridad positiva denominados LMTs (*low molecular-weight tristeza*) (Fig. 6), con unos tamaños que oscilan entre 842-854 nt (LMT1) y 744-746 nt (LMT2), cuya función biológica es desconocida (Che *et al.*, 2001). LMT1 se produce durante la replicación por la presencia de un elemento controlador próximo al extremo 5', de naturaleza distinta a los demás (Gowda *et al.*, 2003a), mientras que la producción de LMT2 está asociada con el proceso de ensamblaje del virión (Gowda *et al.*, 2009).

Frecuentemente, en los tejidos infectados por CTV también se acumulan grandes cantidades de RNAs defectivos (dRNAs) de ambas polaridades que contienen los extremos 3' y 5' pero carecen de una porción variable de la región central (Mawassi *et al.*, 1995, Ayllón *et al.*, 1999, Albiach-Martí *et al.*, 2000a).

#### **3.5.4 Movimiento viral**

Para establecer una infección sistémica es necesario que el virus sea capaz de moverse desde las células inicialmente infectadas a toda la planta. Para ello es indispensable una interacción entre los factores del huésped y del virus (Gilberston y Lucas, 1996; Folimonova *et al.*, 2008). La infección sistémica ocurre en dos etapas sucesivas: la primera es el movimiento local, que incluye el desplazamiento del virus por el citoplasma de la célula infectada hacia la periferia y su transporte a las células vecinas, y la segunda es el movimiento a larga distancia que ocurre a través de los tubos cribosos del floema (Waimann *et al.*, 2004).

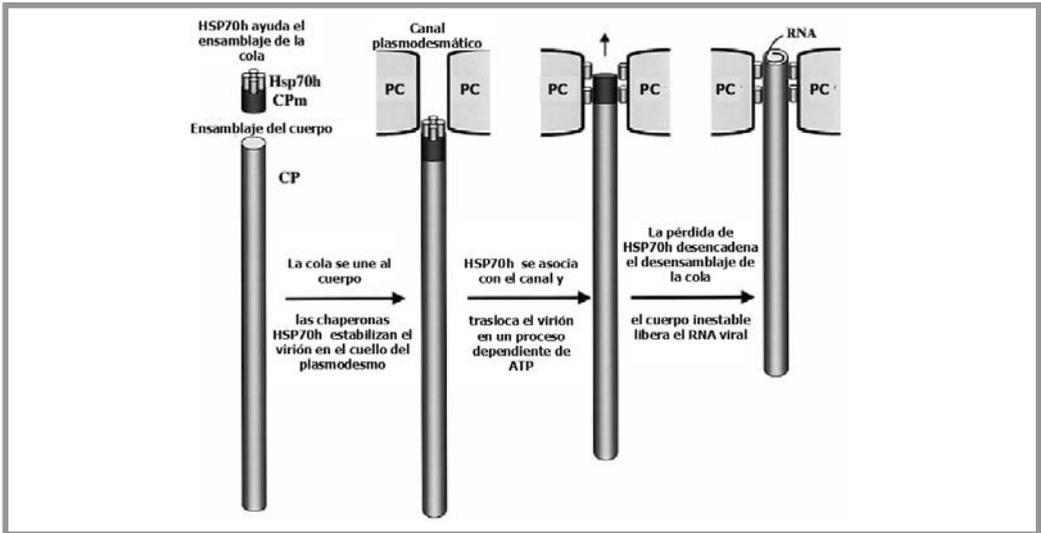
La colonización de las células vecinas (movimiento célula a célula) se realiza a través de los plasmodesmos que consisten en complejos puentes citoplasmáticos que interconectan las células de las plantas (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Ruiz-Medrano *et al.*, 2004; Scholthof, 2005). Para esta dispersión local, la mayoría de virus codifican proteínas de movimiento (MP), que forman complejos ribonucleoproteicos con el RNA viral y facilitan el paso del virus a través de los plasmodesmos aumentando el límite de exclusión molecular de los mismos (Hull, 1991; Gilberston y Lucas, 1996; Herranz y Pallás, 2004; Haupt *et al.*, 2005; Herranz *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007; Boevink y Oparka, 2005). Aunque todos los virus codifican MPs, el número de éstas, su estructura e interacción con factores de la célula huésped y su modo de acción varían dependiendo del tipo viral. Algunas evidencias involucran el citoesqueleto y sus componentes en el movimiento viral. Muchas MP van a los plasmodesmos vía retículo endoplásmico y los filamentos de actina/miosina regulan el flujo de estas proteínas virales (Boevink y Oparka, 2005; Liu *et al.*, 2005).

Algunos virus infectan las células de las hojas inoculadas pero no pueden establecer una infección sistémica, indicando que los dos procesos utilizan mecanismos distintos. El virus llega al sistema vascular desde las células acompañantes de los tubos cribosos y se mueve con el flujo de nutrientes a lo largo

de éstos (Carrington *et al.*, 1996). Distintos estudios indican que la proteína de la cápsida mayoritaria (CP) es esencial para atravesar los elementos cribosos y desarrollar una infección sistémica (Gilberston y Lucas, 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999; Lazarowitz, 2002).

El movimiento de los closterovirus parece más complejo que el de otros virus de plantas, ya que al menos en el caso de BYV el movimiento célula a célula requiere la ayuda de cinco proteínas distintas: CP, CPm, p6, HSP70h y p64 (Peremyslov *et al.*, 1999; Alzhanova *et al.*, 2000). A su vez, la proteasa y la proteína p20 (sin homología con las de otros closterovirus) participan en el transporte a larga distancia (Peng *et al.*, 2003; Prokhnevsky, *et al.*, 2002). HSP70h participa en diversas funciones como la unión a microtúbulos (Karasev *et al.*, 1992), el ensamblaje de los viriones (Satyanarayana *et al.*, 2000), unión a canales intercelulares (Alzhanova *et al.*, 2000) y movimiento célula a célula (Medina *et al.*, 1999; Peremyslov *et al.*, 1999; Napuli *et al.*, 2000). Esta proteína ha sido localizada en plasmodesmos de células infectadas (Medina *et al.*, 1999). Alzhanova *et al.*, 2001 propusieron un modelo para el ensamblaje y el movimiento de los closterovirus en el que la proteína HSP70h permitiría la unión de la CPm al extremo 5' terminal del RNA viral y formaría parte de una estructura que, mediante la unión de HSP70h al plasmodesmo permitiría la translocación del virus (Fig. 7).

Las proteínas de CTV implicadas en el movimiento viral no han sido aún identificadas debido a que los cítricos sólo han podido infectarse con viriones completos producidos en células o en protoplastos de *N. benthamiana* (Satyanarayana *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2005) y los viriones no se producen en ausencia de las proteínas CP, CPm, HSP70 y p61 (Satyanarayana *et al.*, 2000). Por similitud con BYV cabe presumir que al menos estas proteínas y p6 serían necesarias para el movimiento sistémico de CTV. Recientemente, Tatineni *et al.*, (2008) han demostrado que p6 y p20, pero no p33, p18 y p13, son necesarias para establecer una infección sistémica en *C. macrophylla*. Sin embargo, p33, p18 y p13 serían necesarias para el movimiento en NA y pomelo (Tatineni y Dawson, comunicación personal), lo que pondría de manifiesto el papel de factores específicos del huésped en la invasión sistémica de CTV. En este trabajo se aborda el estudio de las pautas temporal y espacial de la acumulación de varias cepas de CTV en huéspedes con distinta susceptibilidad a la infección.



**Fig. 7** Modelo propuesto para el ensamblaje y movimiento célula a célula de BYV. CP: proteína mayoritaria de la cápsida, CPm: proteína minoritaria de la cápsida, PC: pared celular que separa las células adyacentes. Tomado de Alzhanova *et al.*, (2001).

### 3.5.5 Interacción virus-planta

Durante todas las etapas del ciclo viral se generan distintas interacciones entre la planta huésped y el virus. Si no se produce un reconocimiento del virus por parte de la planta se establece una interacción compatible entre ambos que es favorable para la infección viral. Por el contrario, si la planta reconoce al virus se establece una interacción incompatible que desencadena una respuesta de defensa por parte de la planta con el fin de limitar la replicación y el movimiento del virus (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Las plantas han desarrollado mecanismos de reconocimiento y defensa frente a patógenos (virus, viroides, bacterias, fitoplasmas, hongos y nemátodos) que pueden ser pasivos o activos. Entre los primeros se incluyen la presencia de paredes celulares, ceras y otras barreras químicas que constituyen una primera muralla defensiva (Osbourn, 1996). Los segundos comprenden toda una batería de proteínas codificadas por los genes de resistencia (R) y el mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA.

### 3.5.5.1 Genes de resistencia (R)

Los productos codificados por los genes de resistencia (R) pueden actuar inactivando una toxina producida por el patógeno, codificando dianas de patogénesis en ausencia de las cuales la planta se muestra resistente, preparando los mecanismos generales de defensa de la planta o mediante la interacción gen a gen (Takken y Joosten, 2000). En esta última modalidad los productos codificados por los genes R detectan moléculas inductoras sintetizadas por el propio patógeno denominadas factores de avirulencia (Flor, 1942 y 1971; Bent, 1996; Ellis *et al.*, 2000b), que incluyen desde toxinas bacterianas hasta proteínas de la cápsida viral o enzimas hidrolíticos fúngicos. Las proteínas R actúan como receptores y las proteínas inductoras como ligando (Keen, 1990; Gabriel y Rolfe 1990; Ellis *et al.*, 2000b) y su interacción inicia una cascada de señales que desencadenan la respuesta hipersensible (HR), caracterizada por una muerte celular programada que induce lesiones necróticas en el sitio de la infección (Staskawicz *et al.*, 1995; Heath, 2000; Shirasu y Schulze-Lefert, 2003, Soosaar *et al.*, 2005). La HR va acompañada por una respuesta sistémica adquirida (Soosaar *et al.*, 2005) en tejidos lejanos de la zona de infección, caracterizada por i) la producción de especies químicas oxidantes (Lamb y Dixon, 1997), ii) síntesis de callosa (Shimomura y Dijkstra, 1975) y lignina, iii) aumento de los niveles de ácido salicílico (Malamy *et al.*, 1990; Naylor *et al.*, 1998) y iv) producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Yalpani *et al.*, 1991). De este modo la planta limita el movimiento a corta y larga distancia del patógeno. Los genes R que se han caracterizado frente a distintos patógenos codifican cinco clases de proteínas (Dangl y Jones, 2001; Lehmann, 2002) y la mayoría de los que proporcionan resistencia a virus poseen sitios de unión a nucleótidos (NBS) y regiones ricas en leucinas (LRR) (Maule *et al.*, 2007). Pequeñas variaciones en el dominio LRR permiten variar la especificidad frente al patógeno (Farnham y Baulcombe, 2006). Generalmente los genes R son monogénicos dominantes (Kang *et al.*, 2005).

Algunas especies del género *Citrus* muestran resistencia a ciertas cepas de CTV, (Garnsey *et al.*, 1987; Fang y Roose, 1999; Asíns *et al.*, 2004), pero la resistencia a CTV es más común en otros géneros relacionados dentro de la subfamilia *Aurantioideae*, incluyendo algunas especies de *Fortunella*, *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia* y *Swinglea glutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987; Yoshida,

1996; Mestre *et al.*, 1997a,b). Albiach-Martí *et al.*, (2004) observaron que los protoplastos de huéspedes resistentes a CTV como *S. buxifolia*, *Sw. glutinosa* y *P. trifoliata* replicaban y acumulaban CTV a niveles similares a los de huéspedes tolerantes como el naranjo dulce, indicando que la resistencia de estos huéspedes no era a nivel celular. *P. trifoliata* es resistente a la mayoría de los aislados de CTV, y esta resistencia, que se transfiere a muchos de sus híbridos (citranges y citrumelos), está asociada a un gen dominante (*Ctv*), que se ha localizado en una región restringida a 121-kb que incluye 10 genes (Yoshida, 1985, 1993; Gmitter *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997a; Fang *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Rai, 2006). Asimismo, se ha identificado otro gen (*Ctv-m*), que es esencial para limitar la dispersión de CTV en *P. trifoliata* heterocigóticos para *Ctv*, pero no en los homocigóticos (Mestre *et al.*, 1997b).

Asins *et al.*, (2004) y Bernet *et al.*, (2004) estudiaron rasgos cuantitativos asociados a la resistencia temporal del NA Verna Afin a CTV (QTLs), aunque la naturaleza del mecanismo de esta resistencia es desconocido. En este trabajo se analiza la resistencia inicial del NA a la invasión sistémica por distintas cepas de CTV.

### 3.5.5.2 Silenciamiento génico mediado por RNA

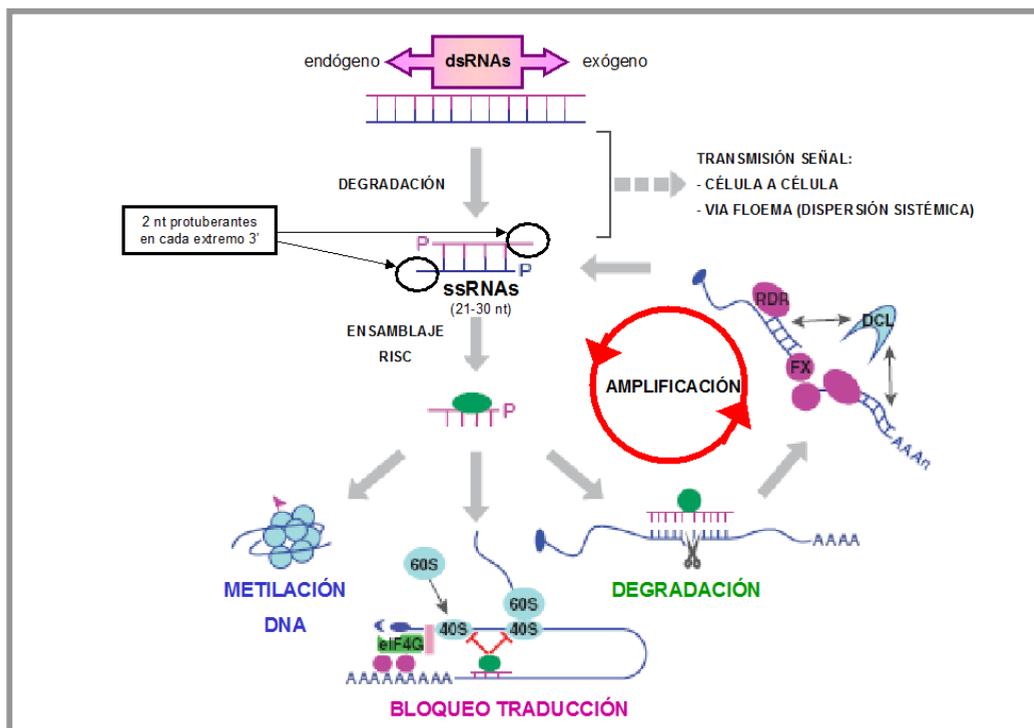
El término silenciamiento génico mediado por RNA engloba un conjunto de procesos que regulan la estabilidad del genoma (Baulcombe, 2004; Chan *et al.*, 2004; Ekwall, 2004; Wassenegger, 2005; Vaucheret, 2006), la expresión de genes relacionados con el desarrollo (Carrington y Ambros, 2003; Bartel, 2004; Baulcombe, 2004; Dugas y Bartel, 2004; Chen, 2005; Carthew, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007) y la defensa antiviral (Voinnet, 2001, 2005; Waterhouse *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Lecellier y Voinnet, 2004; Dunoyer y Voinnet, 2005; Li y Ding, 2005; Ding y Voinnet, 2007). Estos procesos, estudiados en un amplio grupo de organismos eucariotas, incluyen la producción de pequeños RNAs de dos tipos, miRNAs (microRNAs) o siRNAs (*small interfering RNAs*), a partir de RNA de doble cadena (dsRNA) derivado de transcritos endógenos o exógenos, respectivamente (Krulko *et al.*, 2009).

A diferencia de los genes R, la defensa antiviral mediada por el silenciamiento génico se caracteriza por su capacidad para adaptarse a cualquier potencial patógeno, ya que su especificidad no está genéticamente codificada por el huésped,

sino que es dictada por la secuencia del genoma viral (Voinnet, 2001). La activación del silenciamiento viral se produce con el reconocimiento del dsRNA, generado durante la replicación o formado por la unión de regiones complementarias del gRNA, y su posterior degradación por una ribonucleasa tipo III (RNase III) denominada DICER (Bernstein *et al.*, 2001), que produce fragmentos de 21-30 nt con dos nucleótidos protuberantes en el extremo 3' (siRNAs) (Xie *et al.*, 2004) (Fig. 9). Los siRNAs generados son reclutados por el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que dirige la degradación del RNA homólogo (Qu y Morris, 2005 y Li y Ding, 2006). La unión de los siRNAs al complejo RISC requiere una proteína de unión a dsRNAs (DRB) que forma heterodímeros con DICER (Hiraguri, *et al.*, 2005; Adenot *et al.*, 2006; Nakazawa *et al.*, 2007). El principal componente del complejo RISC pertenece a la familia de las proteínas Argonautas (AGO) que presentan una estructura similar a la RNasa I (Bartel, 2004; Tomari y Zamore, 2005; Song y Joshua-Tor, 2006).

La activación del silenciamiento se produce, inicialmente, a nivel de una célula, pero posteriormente se extiende a células vecinas a través de los plasmodesmos mediante los siRNAs de 21 nt (Hamilton *et al.*, 2002; Humber *et al.*, 2003; Dunoyer *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005). Esta respuesta puede amplificarse mediante la síntesis de nuevos dsRNAs a partir de fragmentos generados por el complejo RISC, por la acción de una RNA polimerasa celular dependiente de RNA (RDR) (Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002). Los dsRNAs resultantes son a su vez digeridos por DICER, generando los siRNAs secundarios (Sijen *et al.*, 2007) (Fig. 8), que transportados por el floema son la señal móvil encargada de extender el silenciamiento al resto de la planta (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002; Voinnet, 2005; Kalantidis *et al.*, 2008).

El número de genes que codifican proteínas participantes en las distintas etapas del silenciamiento varían en función del organismo. *A. thaliana* codifica 4 proteínas DICER, 10 genes AGO, 5 DRBs y 6 RDRs.



**Fig. 8** Principales pasos en el silenciamiento génico mediado por RNA. El silenciamiento se inicia con la degradación del dsRNA. Los pequeños RNAs resultantes se incorporan al complejo RISC como ssRNAs y dirigen la metilación del DNA, el bloqueo traduccional y la degradación de RNAs homólogos. En los organismos que presentan RDR, se sintetizan siRNAs secundarios que amplifican la señal de silenciamiento. FX indica factores del huésped; DCL, Dicer-like protein; RDR, RNA polimerasa dependiente de RNA. Tomado de Li y Ding (2006).

### 3.5.5.2.1 Supresores del silenciamiento viral

El silenciamiento génico mediado por RNA es un eficaz mecanismo de defensa antiviral de la planta que induce la destrucción del genoma viral, reduciendo la acumulación viral y restringiendo el movimiento del virus. Como contradefensa, los virus codifican proteínas supresoras del silenciamiento. Algunas de éstas afectan al metabolismo de los siRNAs, bloqueando el procesamiento de dsRNAs por DICER o secuestrando los siRNAs, para evitar la acción de éstos, mientras que otras suprimen el silenciamiento sistémico evitando que la señal se transmita por toda la planta (Roth *et al.*, 2004).

Se han desarrollado distintos ensayos para identificar las proteínas virales supresoras del silenciamiento. Entre ellos: i) Ensayos de reversión del silenciamiento, en los que se examina el fenotipo de una planta con un gen indicador silenciado

cuando se expresa en ella la proteína candidata o se replica el virus correspondiente; ii) Ensayos de expresión estable en los que una planta transgénica que expresa el gen candidato se cruza con otra portadora de un gen indicador silenciado y se examina la expresión del gen indicador en la progenie; y iii) Ensayos de expresión transitoria en los que hojas de *N. benthamiana* 16c, que expresan un gen indicador (normalmente el de la proteína fluorescente verde GFP), se coinfiltran con dos cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transfectados con plásmidos binarios portadores del gen indicador *gfp* y del que codifica la proteína candidata, respectivamente (Moissiard y Voinnet, 2004, Roth *et al.*, 2004, Qu y Morris, 2005 y Li y Ding, 2006). Este último método es el más ampliamente utilizado por su facilidad de ejecución, bajo coste y elevada eficacia en la expresión de cualquier gen de interés en las células de la planta (Voinnet *et al.*, 2000; Johansen y Carrington, 2001).

Se han identificado alrededor de 30 proteínas supresoras, tanto en virus con genoma de RNA como de DNA, muchas de las cuales son a la vez determinantes de patogenicidad del virus y/o proteínas de movimiento viral (Li y Ding, 2006). Estas proteínas no presentan similitud de secuencia ni de estructuras superiores, indicando que su origen evolutivo es distinto (Carrington *et al.*, 2001). Recientemente, las proteínas supresoras del silenciamiento se han agrupado en tres familias bien diferenciadas (Díaz-Pendón y Ding, 2008). Las proteínas de la primera familia, que incluye la proteína HcPro de los potyvirus y la p26 de los tobamovirus, actúan en los pasos iniciales del silenciamiento intracelular en las células infectadas, antes del movimiento célula a célula, por lo que la expresión de estas proteínas incrementa la acumulación viral en protoplastos. Las de la segunda familia, a la que pertenece la proteína p25 de los potexvirus, son necesarias para el movimiento célula a célula del virus pero aparentemente no afectan la acumulación viral en protoplastos. Las de la tercera, que engloba las proteínas 2b de cucumovirus, p19 de tombusvirus y p38 de carmovirus, facilitan el movimiento a larga distancia o intensifican la sintomatología en tejidos infectados sistémicamente, pero no son necesarias para la replicación viral y el movimiento célula a célula.

En CTV se han identificado 3 proteínas (CP, p20 y p23) que actúan como supresoras del silenciamiento en *N. benthamiana* y *N. tabacum*, de las que p23 actuaría a nivel intracelular, CP a nivel intercelular y p20 a ambos niveles (Lu *et al.*, 2004). Lu *et al.*, (2004) sugirieron que p23 podía tener un mecanismo de acción

similar al de HcPro, ya que las dos son potentes supresoras a nivel intracelular, pero ninguna de ellas actúa a nivel intercelular o en la metilación del DNA. La proteína p20 comparte características con la proteína 2b de CMV (*Cucumber mosaic virus*): las dos son supresoras a nivel intercelular, pero a nivel intracelular su supresión es más débil. Sin embargo, al contrario que 2b, la supresión del silenciamiento intercelular de p20 no se asocia con una reducción de la metilación del DNA. Finalmente, CP presenta un mecanismo de acción distinto y suprime el silenciamiento a nivel intercelular sin afectar a nivel intracelular. Curiosamente, el primer sgRNA que se detecta en protoplastos de *N. benthamiana* inoculados con CTV es el que expresa p23, y los sgRNAs que más se acumulan en las células infectadas por CTV son los que expresan las tres proteínas supresoras (Hilf *et al.*, 1995; Navas-Castillo *et al.*, 1997; Albiach-Martí *et al.*, 2004).

### 3.5.6 Análisis de las interacciones virus planta: micromatrices

Existen distintas técnicas para la identificación de los cambios en la expresión de los genes del huésped que tienen lugar durante la infección viral. Estas técnicas comprenden desde la hibridación *in situ* con sondas de genes individuales hasta el análisis de los perfiles de expresión global utilizando micromatrices. La hibridación *in situ* se ha empleado en tejidos embrionarios y cotiledones infectados, ya que proporciona una buena relación espacial entre el avance de la infección viral y la expresión de genes seleccionados del huésped, pero no es útil para examinar los cambios de expresión de todo el genoma (Whitham *et al.*, 2006). El empleo de la genómica funcional utilizando micromatrices de cDNA supone una nueva alternativa para el estudio de los procesos biológicos que ocurren en la interacción entre la planta y el patógeno durante la infección (Ramonell y Somerville, 2002; Koltai y Volpin, 2003; Gandía *et al.*, 2007) y ha permitido avances en la identificación de genes de plantas implicados en la respuesta de defensa (Bulow *et al.*, 2007).

Una micromatriz de DNA consiste en un conjunto de secuencias de DNA inmovilizado sobre una superficie sólida y organizadas en cuadrículas microscópicas mediante un sistema robotizado (Alba *et al.*, 2004). Los datos de expresión génica se obtienen mediante la hibridación de la micromatriz con una población de cDNAs procedentes de la muestra problema marcados con fluorescencia, de modo que se obtiene una señal de fluorescencia para cada sonda cuya intensidad representa el

nivel de expresión de dicho gen en la muestra problema (Busch y Lohmann, 2007). Actualmente se pueden distinguir tres tipos de micromatrices de DNA según la naturaleza de las sondas y las técnicas de hibridación utilizadas. En dos de ellas las sondas inmovilizadas consisten en productos de PCR o en oligonucleótidos largos (50-70 bases), que se hibridan con dos poblaciones de cDNA, una correspondiente a la muestra problema y otra a la muestra control, marcadas con dos fluoróforos diferentes, mientras que en la tercera se utilizan oligonucleótidos cortos (25 bases) sintetizados *in situ* que se hibridan con una única población de cDNA (Busch y Lohmann, 2007).

El Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) tiene como objetivo general el desarrollo de herramientas genómicas para el estudio de procesos biológicos relevantes para la citricultura incluyendo la biología del desarrollo, la respuesta al estrés de origen biótico o abiótico o los procesos de post-cosecha. Para tener ampliamente representado el transcriptoma del género *Citrus*, se generó una colección de indicadores de secuencias expresadas (*expressed sequence tags*, ESTs) a partir de clones procedentes de 52 genotecas de cDNA (30 genotecas estándar, 6 de sustracción, 11 enriquecidas en clones de longitud completa y 5 enriquecidas en clones de longitud completa normalizados), utilizando diferentes tejidos procedentes de varias especies de cítricos en diferentes estados de desarrollo y bajo diversas condiciones de estrés biótico y abiótico. Los tejidos y tratamientos aplicados a los mismos, se seleccionaron por su importancia dentro del cultivo de cítricos. La primera micromatriz de cDNA desarrollada en el CFGP contenía 12.672 clones que correspondían a 6.875 unigenes a partir de una colección de 22.000 ESTs (Forment, 2005), mientras que la versión actual consiste en una micromatriz de elevada densidad compuesta por 85.965 clones que representan 21.081 unigenes de cítricos y se generó a partir de las 52 librerías de cDNA indicadas (Martínez-Godoy, *et al.*, 2008).





## **OBJETIVOS GENERALES**



## OBJETIVOS GENERALES

CTV es uno de los virus que mayores daños ha causado en el cultivo de cítricos. Actualmente es endémico en la mayoría de las zonas cítricas del mundo, con centenares de millones de árboles infectados y otros muchos en peligro de infección inmediata. Sin embargo, su nicho ecológico es extremadamente reducido ya que sólo infecta especies de unos cuantos géneros de la familia *Rutaceae*, y en las plantas infectadas sólo invade células floemáticas, lo que sugiere una interacción muy específica con los cítricos y posiblemente la co-evolución de patógeno y huésped (Moreno *et al.*, 2008). La diversidad de síntomas que CTV es capaz de inducir en función de las especies infectadas y la intensidad variable de los mismos en función de los aislados virales indican que probablemente hay muchos factores implicados en la interacción CTV-cítricos y que éstos podrían variar entre aislados y especies huésped. Sin embargo, la naturaleza de estos factores y su modo de acción son actualmente desconocidos debido en gran medida a la complejidad del genoma de CTV, al difícil manejo del sistema CTV-cítricos y a la ausencia de huéspedes herbáceos que pudieran servir como sistema modelo al menos en una primera aproximación.

Dada la imposibilidad práctica de contener la dispersión de CTV o evitar su evolución hacia formas más virulentas, el control de los daños mediante protección cruzada o mediante resistencia mediada por genes del patógeno utilizando plantas transgénicas requeriría un conocimiento detallado de las interacciones CTV-cítricos que permitiese una manipulación apropiada de las mismas para reducir los efectos indeseados. Especial interés tendría el conocimiento de las interacciones de CTV con el naranjo amargo, como base para una hipotética recuperación de su uso como patrón, ya que ninguno de los patrones tolerantes al decaimiento iguala las cualidades agronómicas del naranjo amargo.

Como primera etapa para el estudio de dichas interacciones en este trabajo se intentó responder a cuestiones preliminares básicas tales como: ¿está relacionada la intensidad de los síntomas que muestran distintas especies de cítricos con la acumulación de CTV en sus tejidos? ¿existe una correlación entre la virulencia de distintos aislados en un mismo huésped y la carga viral que alcanza cada uno de ellos? ¿son similares las pautas temporales (o espaciales) de invasión de distintos

huéspedes por distintos aislados de CTV? ¿se relacionan estas pautas con una distinta actividad replicativa del virus o con distinta intensidad del silenciamiento? ¿la resistencia de naranjo amargo a algunos aislados de CTV, tiene que ver con una mayor intensidad del silenciamiento o con otros factores de la interacción virus-huésped? ¿qué genes se expresan diferencialmente en el naranjo amargo tras la infección con un aislado asintomático o con uno inductor del síndrome de SY?

Para responder a las preguntas formuladas se establecieron los siguientes objetivos:

1. Analizar la acumulación viral de aislados de CTV de distinta virulencia en huéspedes con diferente sensibilidad a este virus y establecer si la intensidad de los síntomas inducidos está asociada con la concentración viral. Examinar las pautas de acumulación temporal de los aislados de CTV en los distintos huéspedes cítricos.
2. Examinar la actividad replicativa de los distintos aislados en los huéspedes cítricos estudiados y evaluar la intensidad del silenciamiento inducido por aislados de distinta virulencia en los diferentes huéspedes cítricos. Comparar la capacidad supresora de la proteína p23 de aislados de CTV de distinta virulencia.
3. Estudiar la acumulación viral y la intensidad del silenciamiento en distintos tejidos de naranjo amargo. Evaluar la influencia del patrón en la acumulación viral e intensidad del silenciamiento de plantas de naranjo amargo injertadas sobre patrones con distinta susceptibilidad a CTV.
4. Analizar los cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección por un aislado asintomático de CTV o por uno inductor de SY, antes y después de la aparición de síntomas.





## **CAPÍTULO I**

---



## CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS

### 1. INTRODUCCIÓN

Una de las características más destacadas de CTV es la variabilidad en el tipo e intensidad de síntomas que induce en distintos huéspedes. Como se ha señalado en la introducción éstos pertenecen a tres categorías: 1) Decaimiento (D) de plantas propagadas sobre patrón naranjo amargo (NA), 2) Acanaladuras en la madera (AM) y 3) enanismo y amarilleo de plantas de semilla de NA pomelo o limonero (*seedling yellows*, SY). Casi todos los aislados de CTV ocasionan algún síntoma en las especies más sensibles a CTV como lima Mexicana (LM) o *Citrus macrophylla* (CM), mientras que sólo los aislados más virulentos inducen AM en plantas de naranjo dulce (ND). Por otra parte, la intensidad de los síntomas en un mismo huésped varía con los aislados.

La multiplicación viral en las células huéspedes va acompañada de alteraciones en la expresión génica de la planta, lo que desencadena el proceso de la enfermedad y la expresión de síntomas. Las diferencias de patogenicidad entre los aislados de CTV probablemente son debidas al tipo de interacción virus/huésped que se establece (Gandía *et al.*, 2007). A su vez, esta interacción podría verse afectada por i) diferencias de secuencia entre aislados en determinadas regiones del genoma viral, ii) los niveles de acumulación viral en el huésped, iii) variaciones en la capacidad para inducir el silenciamiento en la planta o para limitar los efectos de éste por parte de las proteínas supresoras de silenciamiento del virus, iv) la presencia en el huésped de genes de resistencia al virus, o v) otros factores.

Como primera aproximación para comprender las diferencias en la expresión de síntomas entre aislados y huéspedes de CTV, en este capítulo se abordaron los siguientes objetivos:

- Determinar si un aislado de CTV se acumula por igual en distintos huéspedes.
- Estudiar si la acumulación viral de distintos aislados de CTV en un mismo huésped está relacionada con la intensidad de los síntomas inducidos.
- Establecer la pauta de acumulación temporal de los aislados de CTV en distintos huéspedes cítricos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV

En los experimentos realizados se utilizaron grupos de 25 plantas de ND, LM, CM y NA. Se inocularon por injerto grupos de 5 plantas de cada especie con cada uno de los aislados: T388, T318A y T385 (pertenecientes a la colección de aislados del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias) y el aislado clonal T36 CTV9 originado a partir de un clon infeccioso del aislado T36 de Florida (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001), amablemente cedido por el Dr. William O. Dawson, (University of Florida-CREC, Lake Alfred, FL). Como controles negativos se utilizaron 5 plantas de cada huésped sin injertar. Cuando se comprobó que los injertos estaban prendidos, las plantas se cortaron por encima del punto de injerto para inducir una nueva brotación, que se guió a un único brote (Roistacher, 1991). Las plantas se mantuvieron en invernadero con temperatura controlada (18 - 26°C) utilizando un substrato adecuado para cítricos (50% turba y 50% arena) y se fertilizaron por un procedimiento estándar (Arregui *et al.*, 1982).

### 2.2 Inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA indirecto)

En un inicio se estimó la concentración aproximada de cada aislado de CTV en los distintos huéspedes mediante ELISA indirecto (Cambra *et al.*, 1990). Para ello se tapizaron placas de 96 pocillos (Nunc®) con 1 µg/ml de inmunoglobulinas del anticuerpo policlonal 879 (amablemente proporcionado por el Dr. Stephen M. Garnsey, University of Florida-CREC, Lake Alfred, FL), obtenido frente a viriones purificados de CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1973), en tampón carbonato 0.1 M (pH 9.6). Las placas se incubaron durante 4 h a 37°C y se lavaron cinco veces con tampón lavador AFT (0.14 M NaCl, 2.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 7.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) con Tween 20 al 0.05% (v/v). Los extractos (190 µl/pocillo) se prepararon homogeneizando 0.1 g de pecíolos de 5 hojas jóvenes totalmente expandidas por planta en 20 volúmenes de tampón de extracción (AFT + 1% Polivinilpirrolidona, PVP) y las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Tras cinco lavados, las placas se incubaron durante 2 h a 37°C en una mezcla 1:1 (v/v) de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 (Vela *et al.*, 1986) (INGENASA®) diluidos en AFT, a una concentración de uso establecida previamente (0.1 µg/ml). Una vez lavadas cinco

veces, las placas se incubaron durante 90 min con una dilución 1:20.000 de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma®) en AFT, se lavaron de nuevo y se revelaron utilizando como sustrato 1µg/ml de p-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina (10% de dietanolamina en H<sub>2</sub>O destilada, pH 9.8). La densidad óptica (DO<sub>405</sub>) se midió a 405 nm a distintos tiempos utilizando un lector de placas (Microplate Reader Benchmark – BioRad®).

Para poder comparar los valores de DO<sub>405</sub> obtenidos en los distintos ensayos se incluyeron en todas las placas 4 diluciones seriadas (1:2) de un control positivo estándar, que consistía en un extracto (1:20) preparado a partir de una mezcla de hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas infectadas con los aislados T318A, T388, T36 y T385 previamente desecadas y pulverizadas. Los valores ELISA de estos controles positivos fueron utilizados para preparar una recta de calibración.

Se utilizaron dos pocillos por muestra y se consideraron positivas aquellas muestras cuyo valor ELISA medio era al menos dos veces superior a la lectura media del control negativo. Las lecturas de cada muestra se ajustaron restándoles el valor medio de los controles negativos y se expresaron como porcentaje sobre el valor ELISA de la dilución ½ obtenido en la recta de calibración.

## 2.3 Cuantificación de RNA genómico

Para cuantificar la carga viral alcanzada en los distintos huéspedes cítricos se empleó también un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-CPR), puesta a punto en nuestro laboratorio (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

### 2.3.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total (RNAt) se efectuó partiendo de 1-3 g de material vegetal fresco (corteza de planta infectada) triturado en mortero con nitrógeno líquido y homogeneizado en 5 ml de TCES (0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.2 M NaCl, 2% (p/v) SDS) al que se le añadió 5 ml de fenol ácido saturado con agua y 25 µl de β-mercaptoetanol y se incubó 10 min a 50°C. El extracto se centrifugó a 1700 x g durante 10 min para precipitar el material insoluble y la fase acuosa se extrajo con una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El RNA del sobrenadante se precipitó con LiCl 5 M durante toda la noche a – 20°C. El precipitado obtenido tras la centrifugación a 5000 x g

durante 15 min, se lavó con 70% de etanol y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones (Ancillo *et al.*, 2007). Finalmente, los extractos de RNA<sup>t</sup> se resuspendieron en agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las concentraciones del RNA<sup>t</sup> tratado con DNasa se ajustaron aproximadamente a 10 ng/μl y se cuantificaron por duplicado en un espectrofotómetro (Nanodrop®, ND-1000).

Estudios previos realizados con plantas individuales indicaban que la variabilidad biológica entre plantas era mínima, por este motivo, se utilizó en todos los ensayos una mezcla de la corteza de las cinco plantas infectadas con el mismo aislado.

### 2.3.2 RT-PCR a tiempo real

Con el fin de estimar el nº de copias de gRNA viral presente en los tejidos infectados se emplearon los cebadores PM197F Y PM198R (Tabla 1.1) localizados en las proximidades de los extremos 3' de la ORF 1b y 5' de la ORF 2. Estos cebadores permiten evitar la amplificación de los RNA subgenómicos (sgRNAs) más abundantes (sgRNAs 3' co-terminales y los LMTs 1 y 2 5' co-terminales) y la mayoría de los RNAs defectivos (dRNAs) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

**Tabla 1.1** Cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Cebador	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Posición
PM 197F*	CGCCAATTTGATCTGTGAACG	10690-10710
PM 198R*	GCGAAAGCAAACATCTCGACTC	10854-10876
PM 261F*	TTAATACGACTCACTATAGGCGCCAATTTGATCTGTGAACG	10690-10710
PM 274F**	GGTTGATTTGGCCGCTGAA	18757-18775
PM 275R**	CAGCGTTGATGTCCGGTAACA	18867-18887

\* Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007 \*\* Ruiz-Ruiz, 2009

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó utilizando la plataforma LightCycler® (Roche Molecular Diagnostics) con capilares de 20 μl. Para ello se utilizaron 10 μl de mezcla de reacción que contenía 2 μl FastStart DNA MASTER<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche), 4.7 μl de agua libre de RNasa, 0.05 μl de retrotranscriptasa multiScribe (Applied Biosystems), 0.05 μl de Inhibidor de RNasas (Applied

Biosystems), 0.3  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 2  $\mu\text{l}$  del extracto de RNAt ( $\sim 10 \text{ ng RNAt}/\mu\text{l}$ ). En cada uno de los ensayos se incluyeron controles de planta sana y agua libre de RNAsas en lugar de RNAt, y al menos dos diluciones de transcrito de la recta de calibración. Todas las muestras se analizaron por duplicado en 2 experimentos independientes. Las condiciones térmicas incluyeron una retrotranscripción a 48°C durante 30 min, incubación a 95°C durante 10 min, 45 ciclos de amplificación: 2 s a 95°C, 20 s a 60°C y 15 s a 72°C; seguidos de un último segmento de lectura de fluorescencia a 82°C durante 2 s que permitía eliminar la formación de dímeros de cebadores y minimizar así las interferencias en la medida.

La obtención de un producto específico de DNA se confirmó por la observación de picos únicos en la curva de fusión, con valores de temperatura de fusión ( $T_m$ ) de  $\sim 85^\circ\text{C}$  para los aislados virulentos y de  $\sim 83.5^\circ\text{C}$  para los no virulentos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007) (Fig. 1.1).

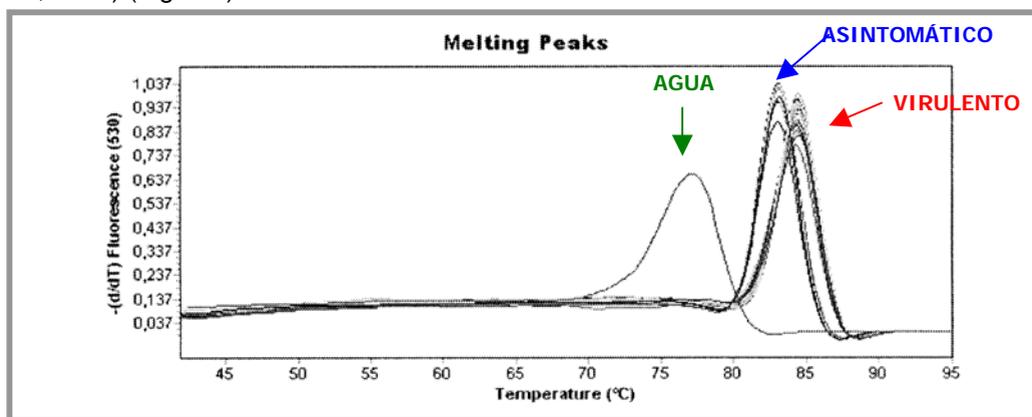


Fig. 1.1 Curvas de fusión para los aislados virulentos (85°C) y asintomático (83.5°C).

El programa informático provisto por la plataforma LightCycler proporcionó el ciclo umbral de fluorescencia ( $C_t$ ) para cada muestra. El  $n^\circ$  de copias de gRNA viral se estimó interpolando los valores  $C_t$  individuales en la recta de calibración anteriormente obtenida.

## 2.4 Inmuno-microscopía electrónica

El procedimiento general para este ensayo fue el descrito por Milne *et al.*, (1993) con algunas modificaciones. Los extractos se prepararon homogeneizando aproximadamente 100 mg de corteza de ND y NA infectados con los aislados T385 o

T388 en 1ml de tampón AFT + 1% PVP. Las rejillas de cobre (Maxtasorm HF34-Fedelco) cubiertas con una película de Parlodión reforzada con carbono se colocaron durante 1h 30 min sobre gotas del anticuerpo policlonal anti-CTV (G604) en tampón carbonato, se lavaron con agua miliQ, se secaron y se colocaron sobre gotas de los extractos vegetales infectados durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavarlas con agua miliQ, las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (p/v), se secaron y se examinaron en un microscopio electrónico (Philips 300) a 80 KV. Para cada muestra se contaron las partículas virales observadas en 100 campos elegidos al azar con 8900 aumentos.

### 3. RESULTADOS

Con el fin de estudiar si la acumulación viral de CTV estaba relacionada con la inducción de síntomas, se inocularon huéspedes cítricos con distinta susceptibilidad al virus: i) ND que sólo manifiesta síntomas con los aislados inductores de AM, ii) LM y CM que son sensibles a la mayoría de los aislados de CTV y muestran síntomas de intensidad variable, y iii) NA que presenta resistencia parcial al virus (Asíns *et al.*, 2004) y con algunos aislados da una infección asintomática mientras con otros induce SY (Moreno *et al.*, 2008). Los aislados de CTV se eligieron en base al tipo e intensidad de síntomas que inducen: T385 es un aislado esencialmente asintomático (Moreno *et al.*, 1991; Vives *et al.*, 1999), el aislado T36-CTV9 induce los síntomas D y SY (Satanarayana *et al.*, 2001), y los aislados T388 y T318A inducen D, SY y AM (Ballester-Olmos *et al.*, 1988; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2007).

La sintomatología observada en invernadero en las distintas combinaciones fue la indicada en la siguiente tabla:

**Tabla 1.2** Sintomatología observada en invernadero en las plantas de lima Mexicana, *C. macrophylla*, naranjo dulce y naranjo amargo inoculadas con los distintos aislados de CTV.

AISLADO	LM	CM	ND	NA
<b>T318A</b>	CN: ++ AM: ++ AH: ++	CN: + AM: ++	CN: + AM: ++	SY: +++
<b>T36</b>	CN: ++ AM: + AH: +	CN: + AM: +	A	SY: ++
<b>T388</b>	CN: +++ AM: +++ AH: +++	CN: + AM: +++	CN: ++ AM: +++	SY: +++
<b>T385</b>	A	A	A	A

**SÍNTOMAS:**

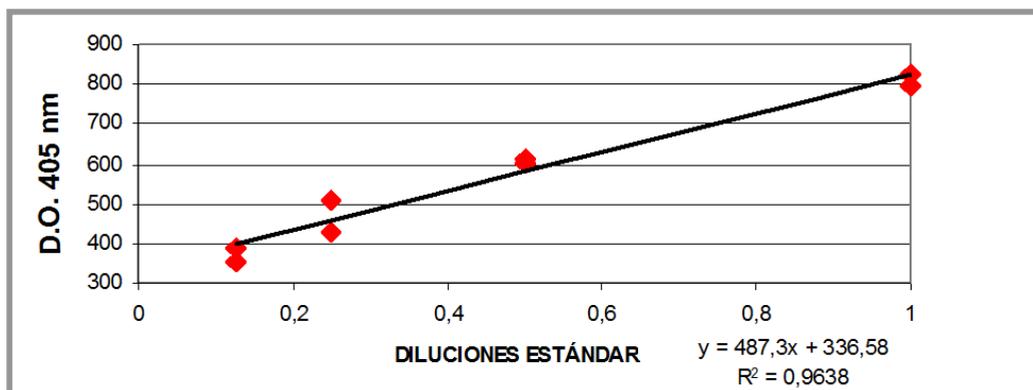
**CN:** clorosis nervial  
**AM:** acanaladuras en la madera  
**AH:** acopamiento hoja  
**SY:** amarillamiento brote  
**A:** asintomático

**INTENSIDAD:**

+: suave  
 ++: moderado  
 +++: intenso

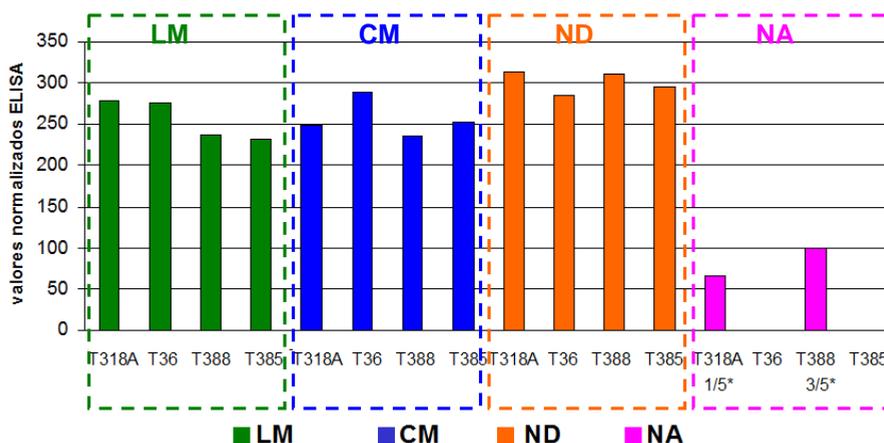
### 3.1 Estimación de la concentración viral en plantas mediante ELISA indirecto

En cada placa se incluyeron ocho pocillos con cuatro diluciones seriadas (1:2) de un control positivo estándar que se utilizaron para obtener una recta de calibración (Fig. 1.2) y normalizar los valores ELISA ajustados (una vez sustraído el valor medio de los controles negativos) de las muestras con respecto a la dilución  $\frac{1}{2}$  del estándar.



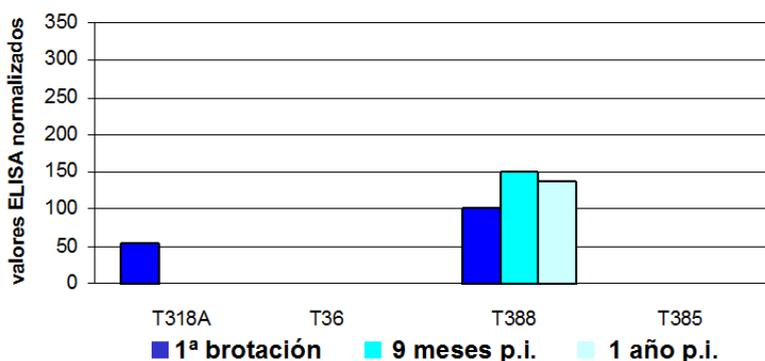
**Fig. 1.2** Recta de calibración realizada con los valores de  $DO_{450}$  de las diluciones seriadas del control positivo estándar obtenidos mediante el ensayo ELISA indirecto.

Los valores de ELISA indirecto normalizados obtenidos en la primera brotación de los huéspedes cítricos ND, CM, LM y NA infectados con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 mostraban en todos los casos diferencias significativas de concentración viral entre el huésped NA y los otros huéspedes cítricos estudiados. En la figura 1.3 se observa la menor acumulación viral en NA respecto a ND, LM y CM en la primera brotación. Cuando se analizó con más detalle la acumulación viral en las plantas de NA se advertían diferencias significativas en la carga viral en función del aislado de CTV. Así, el aislado T388 se detectó en 3 de las 5 plantas de NA; T318A se detectó en 1 planta de 5 y los aislados T385 y T36 no se detectaron en ninguna de las plantas inoculadas.



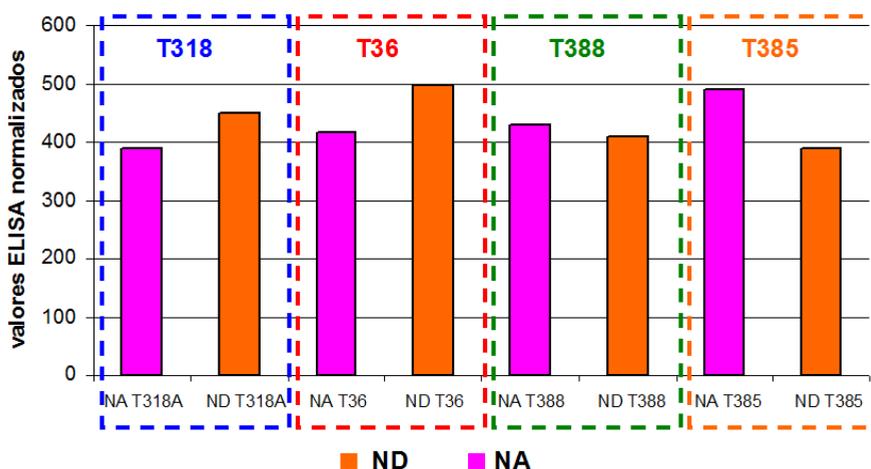
**Fig. 1.3** Valores normalizados de ELISA indirecto obtenidos en la 1ª brotación de plantas de lima Mexicana (LM), *C. macrophylla* (CM), naranjo dulce Pineapple (ND) y naranjo amargo (NA) inoculadas con los aislados T318A, T36, T388 y T385. Con un asterisco negro (\*) se indica el nº de plantas de NA infectadas detectadas en la primera brotación.

Para comprobar si esta pauta de acumulación viral en las plantas de NA variaba con el tiempo se estudió la evolución temporal de la acumulación de CTV en este huésped. Para ello, se analizaron hojas jóvenes totalmente expandidas a los 9 meses y al año de la inoculación (p.i.) (Fig. 1.4). Los aislados T385, T36 y T318A no se detectaron en ninguna de las plantas a los 9 meses ni al año p.i., a pesar de que T318A se había detectado en una planta en la primera brotación, mientras que T388 alcanzó en ambas brotaciones niveles similares de acumulación viral.



**Fig. 1.4** Evolución temporal de los valores normalizados de ELISA indirecto obtenidos en extractos de hoja expandida de naranjo amargo inoculado con los aislados T318A, T36, T388 y T385 en la primera brotación, a los 9 meses p.i. y al año p.i.

No obstante, cuando se realizó un ensayo de ELISA indirecto comparando corteza de NA con la de ND a los 3 años p.i. (Fig. 1.5), se observó que todos los aislados podían detectarse en NA y que sus niveles de acumulación eran similares a los alcanzados en ND.



**Fig. 1.5** Valores normalizados de ELISA indirecto obtenidos en extractos de corteza de naranjo amargo (NA) y naranjo dulce Pineapple (ND) a los 3 años de la inoculación con los aislados T318A, T36, T388 y T385.

### 3.2 Estimación de la concentración viral en planta mediante q-RT-PCR

Los resultados del estudio de la acumulación viral de T388, T318A, T36 y T385 en ND, LM, CM y NA, mediante ELISA indirecto semicuantitativo, indicaban que CTV presentaba una menor acumulación en NA durante al menos el primer año p.i., mientras que al tercer año p.i. la acumulación de todos los aislados en NA y en ND era similar. Para estudiar con más detalle las pautas de acumulación diferencial de los aislados de CTV en NA y comprobar si esta acumulación diferencial también se producía en los otros huéspedes analizados, se estimó mediante q-RT-PCR el nº de copias de gRNA por ng de RNA<sub>t</sub> de cada uno de los aislados de CTV. Para ello se prepararon dos rectas de calibración que presentaban fuerte correlación lineal y un amplio intervalo de concentraciones (6-7 órdenes de magnitud) para la cuantificación (Fig. 1.6 y 1.7). Como T36 tiene una inserción de 18 nt en la zona comprendida por los cebadores, y por tanto da lugar a un fragmento de tamaño mayor que los de T388, T318A y T385 en los ensayos de q-RT-PCR, se utilizaron dos rectas de calibración externas: una basada en la secuencia del aislado T36, para calcular el contenido de

gRNA en plantas infectadas por este aislado, y otra basada en el aislado T305 (cuya secuencia coincide con la de T318A), para estimar el contenido de gRNA en plantas infectadas por el resto de los aislados (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

Las rectas de calibración se realizaron sintetizando *in vitro* transcritos de la zona seleccionada del gRNA. El cDNA utilizado como molde para la transcripción *in vitro* se obtuvo mediante RT-PCR utilizando extractos de RNAt de plantas infectadas con los aislados T305 y T36 y los cebadores PM198R (que contiene en su extremo 5' el promotor T7 de la RNA polimerasa del fago lambda) y PM261F (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007) (Tabla 1.1). Los transcritos de RNA de cadena positiva se sintetizaron directamente utilizando la RNA polimerasa T7 (New England BioLabs), se purificaron con el estuche comercial RNaid w/Spin Kit (Q-BIO gene) según las indicaciones del fabricante y posteriormente se trataron con DNasa libre de RNasa. La concentración de los transcritos se estimó, por duplicado, utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop®, ND-1000). Las diluciones seriadas de transcritos ( $10^{10}$  a  $10^1$  copias de gRNA viral) se prepararon con extractos de RNAt de planta sana a una concentración 10 ng/μl tratados con DNasa libre de RNasa. Posteriormente, se guardaron alícuotas de estas diluciones a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La concentración (pmol) de cada dilución se calculó mediante la fórmula:

$$\mu\text{g transcrito} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{340 \text{ pg}} \times \frac{1}{\text{tamaño inserto}^*} = \text{pmol de ssRNA}$$

\*186 (T305) y 204 (T36)

El  $n^{\circ}$  de copias de RNA se calculó utilizando la constante de Avogadro.

Las rectas de calibración se construyeron con los valores Ct (ciclo umbral) provenientes de 3 experimentos independientes de q-RT-PCR, donde se emplearon 2 réplicas por dilución y el logaritmo del  $n^{\circ}$  de copias de RNA de la dilución.

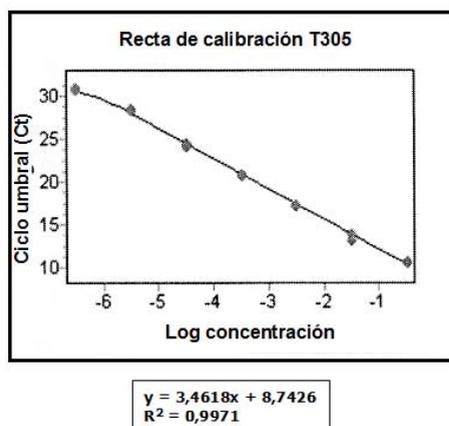


Fig. 1.6 Recta de calibración T305

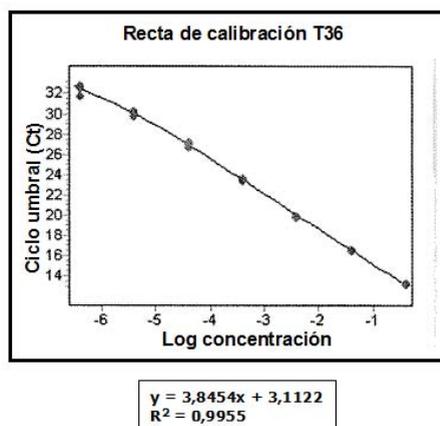


Fig. 1.7 Recta de calibración T36

Con esta herramienta se estimó la acumulación de gRNA de los aislados T318A, T36, T388 y T385 en corteza de plantas de ND, LM, CM y NA, en la primera brotación y a los 9 meses p.i. Al igual que en los ensayos de ELISA indirecto, en estos análisis se observó una pauta de acumulación distinta en NA en comparación con los otros huéspedes estudiados (Fig. 1.8 y Tabla 1.3). En ND, LM y CM la mayor acumulación viral ocurrió en la primera brotación, mientras que en NA la carga viral aumentaba en las brotaciones posteriores.

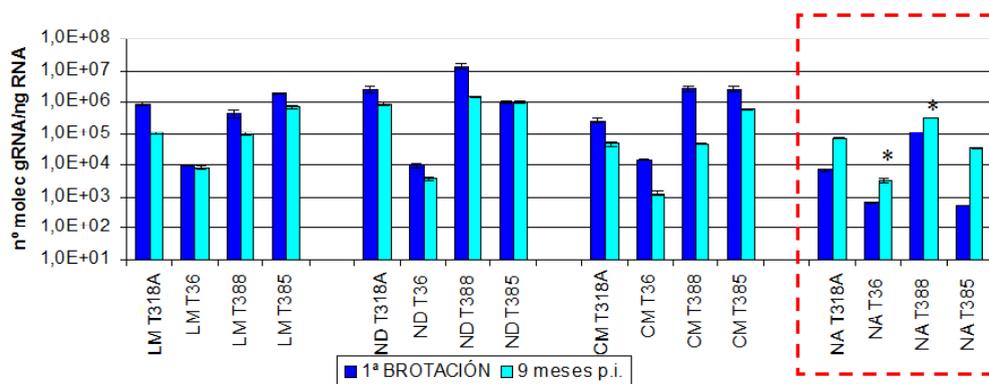


Fig. 1.8 Evolución temporal de la carga viral alcanzada en distintos huéspedes cítricos inoculados con los aislados T318A, T36, T388 y T385 de CTV. \* El análisis de las plantas infectadas con estos aislados se efectuó a los dos años p.i. Se resalta con punteado rojo la distinta pauta de acumulación viral en el huésped NA.

**Tabla 1.3** Número estimado de copias de gRNA/ng RNA<sub>t</sub> en distintos huéspedes cítricos inoculados con los aislados T318A, T36, T385 y T388 de CTV.

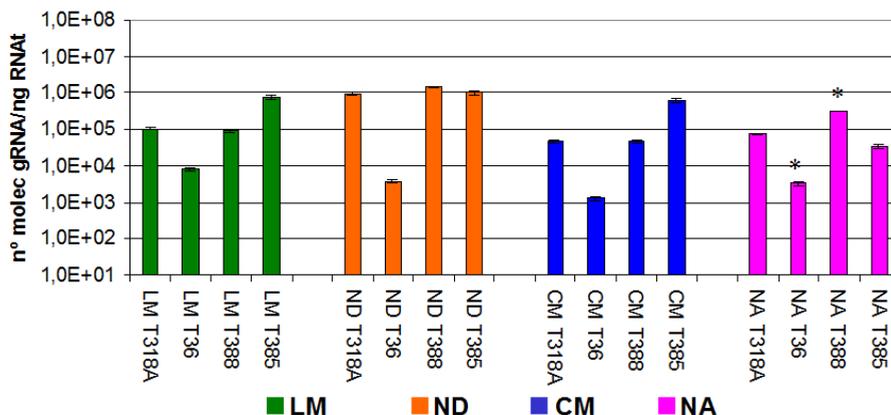
HUÉSPED / AISLADO	INICIO INFECCIÓN <sup>1</sup>	INFECCIÓN ESTABLECIDA <sup>2</sup>
LM T318A	(92 ± 9) E+04	(110 ± 6) E+03
LM T36	(99 ± 9) E+02	(83 ± 8) E+02
LM T388	(45 ± 10) E+05	(93 ± 1) E+04
LM T385	(19 ± 1) E+05	(75 ± 10) E+05
ND T318A	(26 ± 5) E+05	(93 ± 8) E+04
ND T36	(10 ± 1) E+03	(37 ± 3) E+02
ND T388	(14 ± 3) E+06	(150 ± 9) E+04
ND T385	(10 ± 1) E+05	(10E ± 1) E+05
CM T318A	(28 ± 4) E+04	(47 ± 5) E+03
CM T36	(15 ± 1) E+03	(13 ± 2) E+02
CM T388	(28 ± 4) E+05	(47 ± 4) E+03
CM T385	(26 ± 3) E+05	(62 ± 6) E+04
NA T318A	(72 ± 2) E+02	(73 ± 5) E+03
NA T36	(68 ± 2) E+01	(33 ± 4) E+02 *
NA T388	(110 ± 4) E+03	(320 ± 5) E+03 *
NA T385	(56 ± 2) E+01	(340 ± 9) E+02

<sup>1</sup> 1ª brotación <sup>2</sup> 9 meses p.i. \*valores a los 2 años p.i.

Al comparar la carga viral de un mismo aislado en los distintos huéspedes a los 9 meses p.i., se observó que las cepas virulentas T318A y T388 presentaban mayor acumulación en ND en comparación con los otros tres huéspedes ensayados y similar en éstos, mientras que el aislado asintomático T385 alcanzaba un título similar en ND, LM y CM y ligeramente inferior en NA. La mayor acumulación de T36 se observó en LM y la menor en CM, siendo similar en NA y ND. Este aislado fue el que presentó menor carga viral en todos los huéspedes (Fig. 1.9).

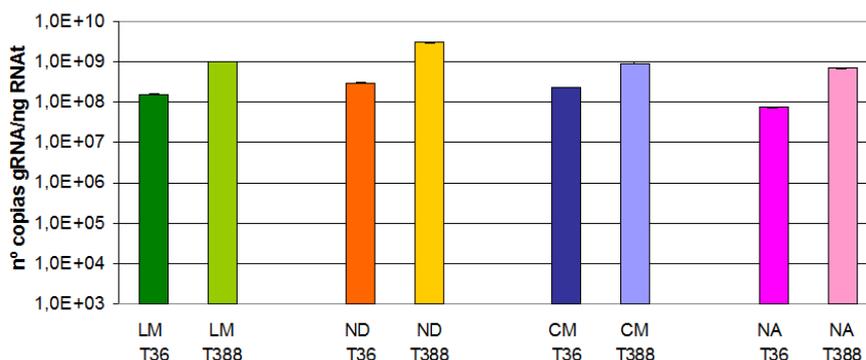
Por otro lado, comparando la carga viral de los distintos aislados en un mismo huésped se observó que LM y CM presentaban pautas de acumulación muy similares, siendo el aislado asintomático T385 el que presentaba la mayor acumulación viral, T36 la más baja y los aislados virulentos T318A y T388 una acumulación intermedia y similar entre ellos. En ND los aislados virulentos T318A y T388 y el asintomático T385 presentaron una acumulación similar, mientras que la carga viral del aislado T36 fue claramente inferior. En NA T388 se acumuló más

rápida y alcanzó el mayor título viral, seguido de los aislados T318A y T385, mientras que T36, al igual que en los otros huéspedes, presentó la menor carga viral.



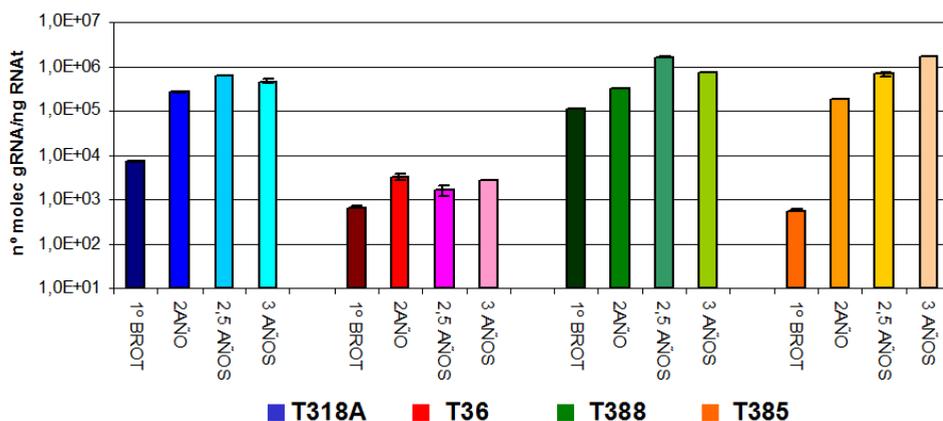
**Fig. 1.9** Carga viral alcanzada por los aislados T318A, T36, T388 y T385 de CTV en lima Mexicana (LM), naranja dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y naranja amargo (NA) a los 9 meses p.i. \* El análisis de las plantas infectadas con estos aislados se efectuó a los dos años p.i.

Con el fin de comprobar si la menor acumulación de gRNA observada para el aislado T36 en todos los huéspedes estudiados se correspondía con una baja replicación del virus, se efectuó una nueva cuantificación del RNA viral de los aislados T36 y T388 en los distintos huéspedes, utilizando q-RT-PCR con los cebadores PM 274F y PM 275R (Tabla 1.1) que anillan en el gen *p23* y por tanto permiten detectar todos los sgRNA 3' co-terminales (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) (Fig. 1.10). Los resultados indicaron que el aislado T36 se acumulaba y replicaba menos que el aislado T388, independientemente del huésped estudiado.



**Fig. 1.10** Acumulación sgRNAs 3' co-terminales y gRNA de los aislados T36 (color oscuro) y T388 (color claro) en lima Mexicana (LM), naranja dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y naranja amargo (NA).

En los ensayos de ELISA indirecto y q-RT-PCR, los distintos aislados de CTV parecían acumularse más lentamente en NA que en los otros huéspedes estudiados. Para estudiar con más detalle la pauta de acumulación temporal de CTV en NA se analizó mediante q-RT-PCR la carga viral a distintos tiempos p.i. (3 meses y 2, 2.5 y 3 años). Se observó que los aislados T318A y T388 aumentaban su carga viral a lo largo de los dos primeros años p.i. estabilizándose a los 2.5 años p.i., mientras que la acumulación del aislado T385 se prolongó hasta al menos 3 años p.i. La carga viral de T36 se estabilizó a los 2 años a un nivel inferior a la de los demás aislados estudiados (Fig. 1.11).

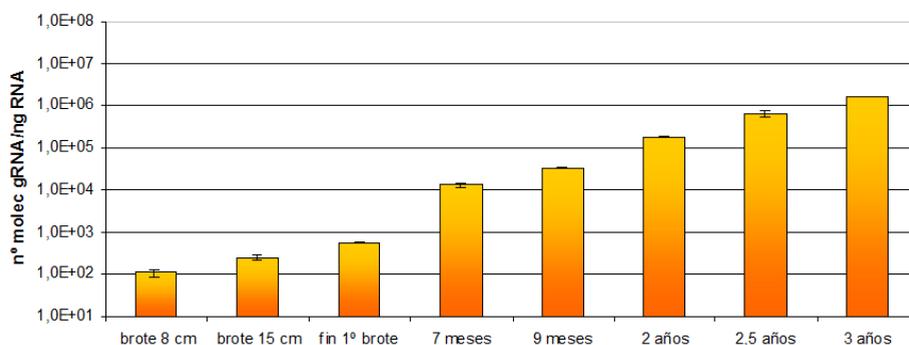


**Fig. 1.11** Evolución temporal de la carga viral de los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 en corteza de NA.

Los resultados reflejados en la figura 1.11 indican un aumento gradual del título viral del aislado T385 en NA a lo largo de 3 años. Para analizar con más detalle el aumento de la carga viral de este aislado desde las etapas iniciales de la infección se analizaron brotes de 8 cm (equivalente 1 mes p.i), de 15 cm (equivalente 2 meses p.i), al final de la primera brotación (equivalente 3 meses p.i), a los 7 y 9 meses, y a los 2, 2.5 y 3 años p.i. Los resultados obtenidos (Fig. 1.12 y Tabla 1.4) indicaron que el aislado T385 mostraba un aumento progresivo de la carga viral desde el inicio de la infección hasta al menos 3 años p.i.

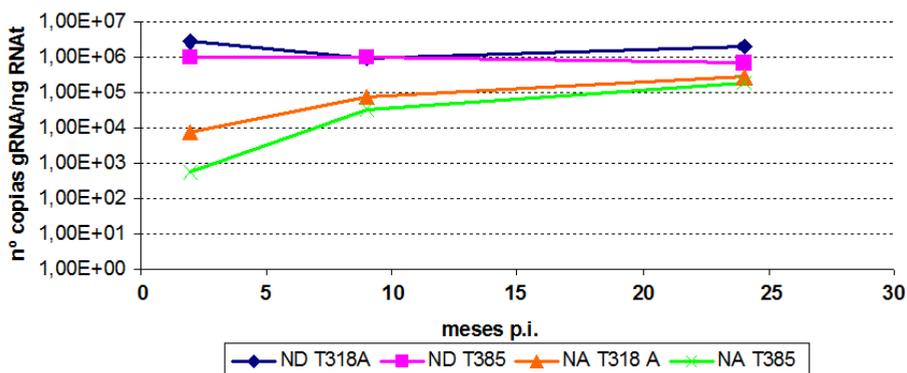
**Tabla.1.4** Número estimado de copias de gRNA/ng RNAt del aislado T385 en corteza de NA durante el transcurso de 3 años p.i.

TIEMPO POST INOCULACIÓN	nº COPIAS gRNA/ng RNAt
<b>Brote 8cm</b>	(11 ± 2) E+01
<b>Brote 15 cm</b>	(25 ± 3) E+01
<b>Fin 1ª brotación</b>	(56 ± 2) E+01
<b>7 meses</b>	(13 ± 1) E+03
<b>9 meses</b>	(340 ± 9) E+02
<b>2 años</b>	(180 ± 4) E+03
<b>2,5 años</b>	(66 ± 9) E+04
<b>3 años</b>	(170 ± 2) E+04



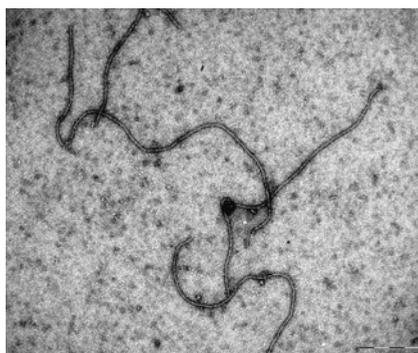
**Fig.1.12** Evolución temporal de la carga viral del aislado T385 en corteza de NA durante los 3 años p.i.

Los resultados obtenidos no muestran una correspondencia entre la intensidad de los síntomas producidos por los aislados de CTV y la acumulación de los mismos en las plantas infectadas (Fig. 1.9), pero sugieren diferencias en las pautas temporales de acumulación en distintos huéspedes (Fig. 1.8) y entre aislados (Fig. 1.11 y 1.12). Para confirmar estos dos aspectos de la infección con CTV se comparó la acumulación temporal de los aislados T385 y T318A en NA y en ND. La infección de ambos huéspedes con T385 es asintomática, mientras que T318A induce SY en NA y AM en ND (Fig. 1.13). Mientras que en ND la carga viral de los dos aislados fue similar en las tres brotaciones, en NA se observó un aumento de la carga viral de ambos aislados en el transcurso de la infección. A lo largo de este período, la diferencia inicial entre la carga viral de T385 y T318A se fue reduciendo para alcanzar un título similar a los dos años p.i.



**Fig.1.13** Pauta de acumulación temporal de los aislados T318A y T385 en extractos de corteza de naranjo amargo (NA) y naranjo dulce (ND) a lo largo de 2 años.

Para comprobar que el aislado asintomático T385 no solo acumulaba niveles de gRNA viral similares a los de los aislados virulentos en NA, sino que estos niveles se correspondían con una concentración similar de viriones, se estimó la concentración de éstos mediante inmunomicroscopía electrónica en extractos de corteza de NA y ND infectados con T385 o con T388 a los 3 años p.i. Las plantas de NA infectadas con el aislado T385 mostraban más partículas virales que las plantas infectadas con el aislado T388, en línea con la cuantificación de gRNA obtenida mediante q-RT-PCR (Fig. 1.11). Asimismo, el número de partículas observadas en NA era igual o superior que el observado en ND (Tabla 1.5). La visualización de los viriones permitió comprobar que la acumulación de gRNA viral se correspondía con la acumulación de viriones.



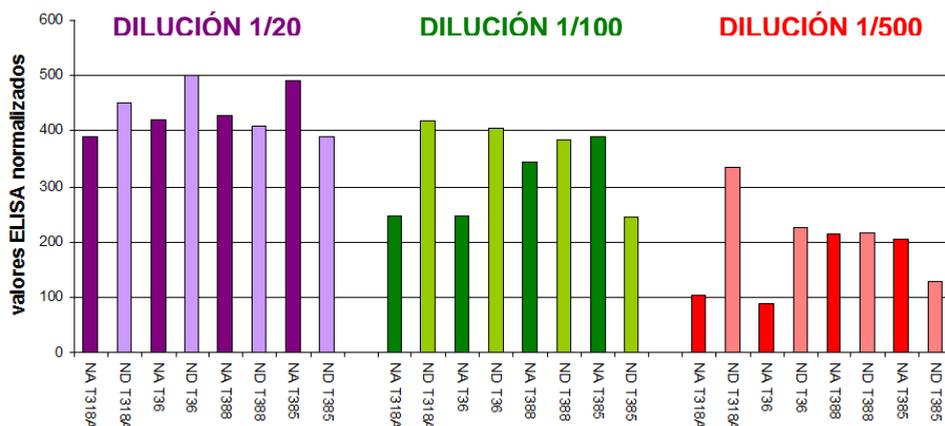
**Fig. 1.14** Viriones de CTV observados en extractos de corteza de NA infectada con el aislado T385 a los 3 años p.i.

**Tabla 1.5** Partículas virales observadas en 100 campos al azar por muestra.

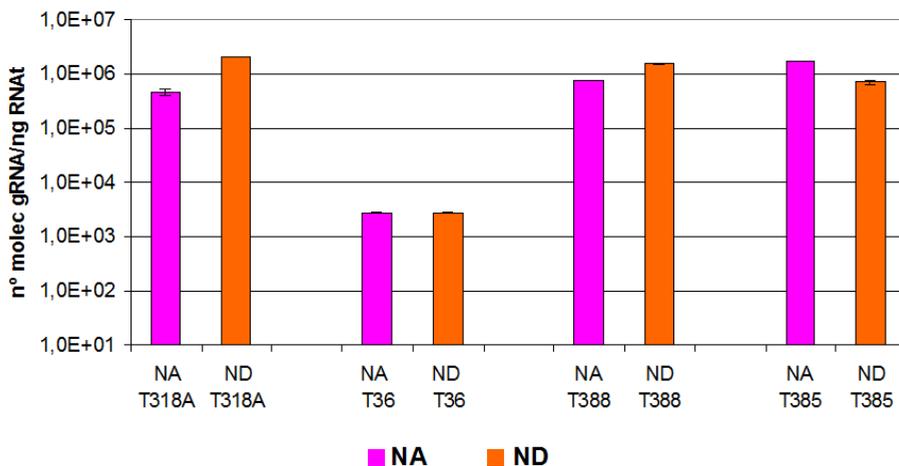
HUÉSPED	AISLADO	TOTAL PARTÍCULAS VIRALES EN 100 CAMPOS	MEDIA POR CAMPO
ND	T385	147	1,47 ± 0,12
ND	T388	147	1,47 ± 0,10
NA	T385	294	2,94 ± 0,17
NA	T388	138	1,38 ± 0,10

### 3.3 Comparación ELISA vs. q-RT-PCR

En la estimación de la carga viral de la primera brotación de plantas de ND, LM y CM infectadas con los aislados T388, T318A, T385 y T36 efectuada mediante ELISA indirecto, no se observaron diferencias significativas ni entre aislados ni entre huéspedes. Por el contrario en la cuantificación de gRNA en los mismos huéspedes y aislados mediante q-RT-PCR, sí se observaron diferencias significativas entre los distintos aislados y huéspedes. Además, mediante la técnica ELISA no se detectaron, en las brotaciones iniciales, los aislados T318A, T36 y T388 en plantas de NA, los cuales si se detectaron, aunque en bajas concentraciones, mediante q-RT-PCR. Mientras estas últimas diferencias confirman la mayor sensibilidad de q-RT-PCR en comparación con ELISA (Bertolini *et al.*, 2008), las discrepancias observadas en LM, CM y ND utilizando ELISA o q-RT-PCR podrían ser debidas a la utilización en la primera de extractos excesivamente concentrados que podrían causar una saturación del anticuerpo utilizado en el tapizado de las placas, lo que daría lugar a lecturas ELISA similares con independencia de la concentración real de cada extracto. Para comprobar si en nuestras condiciones se había producido esta saturación, se analizaron distintas diluciones de extractos de ND y NA (1/20, que era la dilución utilizada anteriormente, 1/100 y 1/500) inoculados con los cuatro aislados de CTV (Fig. 1.15). Las lecturas ELISA mostraron saturación del anticuerpo con la dilución de extracto 1/20, puesto que en estas condiciones no se observaron diferencias significativas entre aislados o entre huéspedes, que sí se observaron cuando se utilizaron las diluciones 1/100 ó 1/500 (Fig. 1.15).



**Fig. 1.15** Valores ELISA normalizados utilizando distintas diluciones: 1/20, 1/100 y 1/500 del extracto de corteza de naranjo amargo (NA, color oscuro) y naranjo dulce (ND, color claro) inoculados con los aislados T318A, T36, T388 y T385.



**Fig. 1.16** Valores nº de copias de gRNA/ng RNAt en extracto de corteza de naranjo amargo (NA) y naranjo dulce (ND) inoculados con los aislados T318A, T36, T388 y T385.

Los resultados obtenidos en ELISA indirecto con las diluciones 1/100 y 1/500 (Fig. 1.15) y los obtenidos en los ensayos de q-RT-PCR (Fig. 1.16) tampoco se correlacionaron en todos los casos. Así, para las muestras de NA y ND infectadas con los aislados T388 y T385, que presentaban una elevada carga viral, se obtuvieron valores similares utilizando ambas técnicas. Por el contrario, para las cepas de CTV T318A y T36, los pautas de acumulación observadas con ambas técnicas fueron diferentes.

#### 4. DISCUSIÓN

Los mecanismos por los que los virus inducen síntomas son en general poco conocidos, y los datos sobre la relación entre el nivel de multiplicación del virus y la intensidad de los síntomas que induce son frecuentemente contradictorios. La mayoría de análisis teóricos de evolución de la virulencia asumen una correlación positiva entre el grado de multiplicación y el efecto del patógeno en el huésped (Bull *et al.*, 1994; Ebert *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios con clones infecciosos del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) en los que se intercambiaron el gen 2b pusieron de manifiesto que la aparición de síntomas depende del gen 2b, pero la intensidad de éstos no está relacionada con la acumulación viral (Shi *et al.*, 2002). Tampoco Sacristán *et al.*, (2005) encontraron una asociación entre la acumulación de distintos aislados de CMV y sus efectos en el desarrollo de la planta. Además, estos autores, observaron que los pases sucesivos en un huésped modificaban la virulencia del virus, pero no su multiplicación, lo que indicaba que la virulencia no era consecuencia de una mayor multiplicación del patógeno.

En este capítulo, se ha analizado la acumulación de aislados de CTV de distinta virulencia en huéspedes de distinta sensibilidad al virus para comprobar si la intensidad de los síntomas estaba asociada con la concentración viral. Los aislados de CTV elegidos difieren en la intensidad de los síntomas que inducen en un mismo huésped, y a su vez los huéspedes inoculados muestran distintos síntomas con un mismo aislado.

La estimación de la carga viral mediante ELISA indirecto en hojas jóvenes expandidas de la primera brotación mostró una clara diferencia en la acumulación alcanzada en NA y en los demás huéspedes. Para todos los aislados ésta fue mayor en ND, LM y CM que en NA. Esta diferencia fue especialmente acentuada para los aislados T385 y T36, ya que ninguna de las plantas de NA inoculadas con estos aislados dio reacción positiva a ELISA, incluso en brotaciones sucesivas hasta 1 año p.i. Sin embargo, cuando se estimó la carga viral en corteza de NA y ND a los 3 años p.i. se observó que todos los aislados presentaban una acumulación similar en ambos huéspedes y que las diferencias entre aislados eran pequeñas. Estos resultados sugerirían una cierta resistencia a la acumulación de CTV en NA al inicio de la infección, más acusada en los aislados menos virulentos. Las diferencias de

acumulación entre aislados en LM, CM y ND fueron en general reducidas y no se relacionaban con la virulencia de cada aislado.

Considerando que la falta de detección viral en plantas de NA y las escasas diferencias entre aislados observadas en otros huéspedes podrían ser debidas en parte a limitaciones en la sensibilidad del procedimiento de ELISA semicuantitativo utilizado, se decidió analizar la acumulación viral estimando la cantidad de gRNA mediante el protocolo de q-RT-PCR desarrollado en el laboratorio (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Se prepararon nuevas curvas patrón utilizando transcritos de RNA de T36 (para cuantificar este aislado) y de T305 (para cuantificar los demás), que resultaron muy similares a las obtenidas por Ruiz-Ruiz *et al.* (2007), y mediante el análisis de las curvas de fusión se comprobó que en cada caso se obtenía un producto de amplificación específico cuyo valor  $T_m$  era el esperado según las características del aislado (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

Cuando se analizó mediante q-RT-PCR la carga viral de los distintos aislados en la primera brotación y al cabo de 9 meses p.i. se observó que i) podía detectarse sin problemas la infección de NA con cualquiera de los aislados, ii) de nuevo el huésped NA presentaba una pauta de acumulación distinta a la de los demás huéspedes: la carga viral en LM, CM y ND en la primera brotación era ligeramente más alta que a los 9 meses, mientras que en NA ocurría lo contrario, y iii) en contraste con las estimaciones de carga viral efectuadas mediante ELISA, las efectuadas mediante q-RT-PCR mostraron diferencias de acumulación entre aislados en un mismo huésped y de algunos aislados en distintos huéspedes. Estos resultados confirman, por una parte, el comportamiento diferencial del NA en comparación con los demás huéspedes ensayados, y por otra, la limitada sensibilidad de ELISA en comparación con q-RT-PCR. El límite de detección de CTV con esta última técnica se estimó en  $\sim 10^2$  copias de gRNA/ng RNAt (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007) y es similar a la sensibilidad obtenida con otros virus (Fabre *et al.*, 2003; Korimbocus *et al.*, 2002; Picó *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2000). La detección de *Barley yellow dwarf virus* o de *Plum pox virus* mediante q-RT-PCR fue  $10^3$  veces más sensible que con ELISA, (Fabre *et al.*, 2003; Olmos *et al.*, 2005). Asimismo, Bertolini *et al.*, (2008) determinaron que la detección de CTV mediante q-RT-PCR con cebadores basados en el extremo 3' terminal era  $10^6$  veces más sensible que la detección mediante DAS-ELISA. En cuanto a las diferentes pautas de acumulación de los aislados de CTV en LM, CM y

ND observadas mediante q-RT-PCR en comparación con ELISA, éstas podrían ser debidas en parte i) a diferencias temporales en los procesos de acumulación y degradación del gRNA y de la proteína p25, ii) a la detección en los ensayos ELISA tanto de la proteína de cápsida formando viriones como de subunidades libres de ésta, mientras que los análisis con q-RT-PCR detectan fundamentalmente gRNA, y iii) a problemas de saturación de los anticuerpos inmovilizados en las microplacas por un exceso de antígeno. De hecho, en un experimento limitado en el que se compararon varias diluciones de extractos de ND o NA infectados, algunas combinaciones aislado/huésped mostraron este efecto de saturación de antígeno por el cual la dilución de un extracto no daba lugar a una disminución apreciable de los valores ELISA.

Utilizando q-RT-PCR se observó que las diferencias de acumulación de cada aislado en los distintos huéspedes, o de distintos aislados en un mismo huésped, en la primera brotación, se mantenían a los 9 meses p.i. y que la carga viral no estaba relacionada con la virulencia del aislado en cada huésped. Así, aunque los síntomas que inducen los aislados T388 y T318A en LM son mucho más intensos que en ND, la carga viral de estos aislados en ND es más alta que en LM. Igualmente los síntomas inducidos por T318A, T36 y T388 en CM son similares a los que inducen en LM, pero la carga viral de estos aislados es superior en el segundo huésped. De forma similar, la acumulación de distintos aislados en un mismo huésped tampoco parece necesariamente relacionada con la intensidad de los síntomas que inducen. Por ejemplo, el aislado T385 es esencialmente asintomático en LM y CM, pero su carga viral es superior a la de los aislados sintomáticos T388, T318A o T36. El aislado T385 también es asintomático en ND, mientras que T318A y T388 inducen AM en este huésped, sin embargo la carga viral de los tres aislados es similar. El aislado T36, a pesar de mostrar una virulencia intermedia (inferior a T318A y T388 y superior a T385), mostró los menores niveles de replicación y acumulación en todos los huéspedes. Estos resultados sugieren que la inducción de síntomas por CTV no es una consecuencia directa de la acumulación viral sino el resultado de interacciones específicas de cada aislado con factores del huésped y que estas interacciones pueden variar en distintas especies huésped. En este sentido es interesante constatar que en análisis filogenéticos de la secuencia completa del gRNA, el aislado T36 es genéticamente muy distante de T385 y de T318A, que también aparecen separados

aunque más próximos entre sí que con T36 (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). A su vez, análisis de distintas regiones de la mitad 3' terminal del genoma mostraron que T388 y T318A son genéticamente muy próximos (Martín *et al.*, 2009).

La estimación de la carga viral mediante q-RT-PCR permitió detectar la infección en plantas de NA inoculadas con cualquiera de los aislados, incluso en el primer brote tierno (8 cm) después de la inoculación con T385, que en las etapas iniciales era el aislado más difícil de detectar por ELISA. Como ya se había observado mediante ELISA la acumulación temporal de CTV en naranjo amargo fue más lenta que en los demás huéspedes. Así, mientras en LM, CM y ND la máxima carga viral para todos los aislados se observó al final de la primera brotación, la acumulación de gRNA en NA aumentó de forma progresiva en el transcurso de la infección con una rapidez variable según los aislados: T36 alcanzó su máxima carga viral a los dos años p.i., T318A y T388 seis meses más tarde y T385 al menos a los tres años p.i. Bernet *et al.*, (2008), también observaron en NA una resistencia inicial a la infección por CTV que desaparecía a los 30 meses. A pesar de la acumulación más lenta de T385 en NA su carga viral máxima fue igual o superior a la de los demás aislados y del mismo orden que la que alcanzaba en ND.

Estos resultados sugieren que el NA ofrece una resistencia inicial a la invasión por CTV, que es variable dependiendo del aislado del virus. Sin embargo, se ha observado que la acumulación de CTV en protoplastos de NA no es distinta a la que tiene lugar en huéspedes más susceptibles como el ND (Albiach-Martí *et al.* resultados no publicados), por lo que la resistencia observada en NA podría ser debida a dificultades en el movimiento célula a célula y/o a larga distancia. Dado que el aislado de acumulación más lenta (T385) pudo ser detectado a las pocas semanas de la inoculación en brotes de 8 cm, parece razonable suponer que las principales limitaciones al incremento de la carga viral provienen del movimiento célula a célula y quizá de la salida del floema del tallo hacia las hojas, lo que justificaría la dificultad para detectar el virus por ELISA en NA. Esta limitación podría ser debida a que i) la acción de los supresores del silenciamiento de CTV fuese menos eficiente en NA que en los otros huéspedes, y ii) las proteínas de movimiento de CTV interaccionasen más eficientemente con los componentes de los huéspedes más susceptibles (LM, CM o ND) que con los de NA.

Tampoco en NA se observó una asociación entre virulencia y acumulación viral. Así, el aislado T385 que es asintomático en este huésped alcanzó una carga viral igual o superior a la de T318A y T388 que inducen un fuerte reacción de SY, mientras que T36, que sólo induce síntomas suaves de SY mostró la menor carga viral. Estos resultados apoyan la idea de que la reacción de SY depende de interacciones específicas de cada aislado con factores del NA que alteran su desarrollo, más que ser una consecuencia directa de la acumulación viral en este huésped.

Aunque diversos modelos teóricos de evolución de la virulencia han asumido una correlación positiva entre el nivel de multiplicación del patógeno y sus efectos en el huésped (Sacristán *et al.*, 2005) y dicha correlación ha sido observada en algunos sistemas virus-planta (Heijbroek *et al.*, 1999; Fargette *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2005), en otros casos se ha encontrado que virulencia y carga viral no estaban relacionados o incluso se correlacionaban negativamente (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 2002; Escriu *et al.*, 2003; Sacristán *et al.*, 2005; Pagán *et al.*, 2007). El presente estudio es el primero en identificar una ausencia de correlación entre virulencia y carga viral en un closterovirus y en un huésped leñoso.



## **CAPÍTULO II**

---



## CAPÍTULO II. ACTIVIDAD REPLICATIVA Y SILENCIAMIENTO VIRAL DE CTV EN DISTINTOS HUÉSPEDES CÍTRICOS

### 1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo I se observaron diferencias en la acumulación viral de distintos aislados de CTV en naranjo dulce (ND), lima mexicana (LM) y *C. macrophylla* (CM), así como, una pauta de acumulación temporal totalmente distinta entre estos huéspedes y naranjo amargo (NA), un huésped que ofrece resistencia a la acumulación de la mayoría de los aislados en las fases iniciales de la infección. Estas variaciones entre aislados de CTV y especies huésped podrían ser consecuencia de diferencias en la tasa de replicación viral o en la eficiencia de la supresión del silenciamiento en función de las interacciones específicas aislado/huésped.

La replicación de CTV, el ensamblaje de los viriones y el movimiento célula a célula y a larga distancia requieren la expresión de distintas proteínas virales y una interacción apropiada de éstas con factores del huésped actualmente desconocidos. Variaciones en los factores implicados de las distintas especies huésped, y en particular de aquellos relacionados con la multiplicación, el movimiento del virus y la defensa de la planta frente al virus, como el silenciamiento génico postranscripcional, pueden explicar en parte las distintas pautas de acumulación observadas. Así, la proteína p23 se acumula en LM, pero resulta tóxica para otras especies de cítricos y es degradada rápidamente (Fagoaga *et al.*, 2005), lo que probablemente requiere una síntesis continuada de la misma para mantener una actividad replicativa de las cadenas de gRNA de polaridad positiva suficiente para la encapsidación de los viriones. Para la replicación de su RNA genómico (gRNA), CTV utiliza distintas estrategias: mientras la replicasa viral se expresa directamente a partir del gRNA, los 10 genes de la mitad 3' terminal lo hacen a partir de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3' co-terminales cuya síntesis está regulada por elementos controladores independientes (Hilf *et al.*, 1995; Satyanarayana *et al.*, 2002 a, b; Gowda *et al.*, 2001, 2003; Ayllón *et al.*, 2004, 2005). Por tanto, la acumulación de sgRNAs en los tejidos infectados, y en particular los correspondientes a las tres proteínas supresoras del silenciamiento de CTV (p25, p20 y p23), es un buen indicador de la actividad replicativa de CTV.

La eficiencia en la supresión del silenciamiento en cada huésped determina en buena medida el éxito de la infección de un virus y probablemente afecta la pauta de acumulación en la planta. Así, en el caso de otros virus restringidos al floema, como polerovirus o begomovirus, se ha observado que la co-inoculación con otros virus o la expresión transgénica de algunos supresores del silenciamiento daba lugar a un incremento en la carga viral y en algunos huéspedes a la invasión de células del mesófilo (Ryabov *et al.*, 2001; Wege y Siegmund, 2007). De este modo, una de las causas de la resistencia inicial a algunos aislados de CTV observada en NA podría ser una supresión ineficiente del silenciamiento génico mediado por RNA.

Como ya se ha indicado, tres de las proteínas codificadas por CTV (p23, p25 y p20) actúan como supresoras del silenciamiento génico mediado por RNA en *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2004). La presencia de tres supresores del silenciamiento que actúan a distintos niveles, hace sin duda que la relación CTV-cítricos sea más compleja que en otros sistemas virus-huésped y que probablemente ésta sea sensible a las diferencias entre especies de cítricos.

Con el fin de dilucidar si las diferencias en las pautas de acumulación viral entre aislados de CTV y huéspedes están relacionadas con variaciones en la actividad replicativa del virus o con cambios en el silenciamiento génico mediado por RNA, los objetivos planteados en este capítulo fueron:

- Estudiar la acumulación temporal de los sgRNAs que expresan los genes *p20* y *p23* en los distintos huéspedes cítricos.
- Examinar la acumulación de siRNAs específicos de CTV en los distintos huéspedes cítricos durante la infección viral.
- Determinar si las proteínas p23 expresadas por los distintos aislados de CTV estudiados manifiestan diferencias en su capacidad supresora.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV

Se utilizaron los mismos huéspedes cítricos (ND, NA, CM y LM) y aislados de CTV (T318A, T36, T388 y T385) descritos en el Capítulo I, apartado 3.1.

## 2.2 Detección y cuantificación de sgRNAs de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot

### 2.2.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNAt a partir de corteza joven de los distintos huéspedes cítricos analizados se realizó mediante el procedimiento detallado en el Capítulo I, apartado 2.3.1.

### 2.2.2 Síntesis de ribosondas específicas para cada aislado

Para realizar los ensayos de hibridación molecular tipo Northern blot se preparó una mezcla de ribosondas específicas de la región 3' terminal de CTV (p23-3' NTR, 940 bases) de cada uno de los aislados estudiados (T318A, T36, T388 y T385) marcadas con digoxigenina (RNA-DIG). Estas sondas permitían detectar el gRNA y los sgRNAs 3' co-terminales presentes en los extractos de RNAt de planta infectada.

Para preparar las sondas RNA-DIG se obtuvo cDNA de cada aislado mediante retrotranscripción y amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos que anillaban en el inicio de la proteína p23 y en el extremo 3' terminal del genoma viral (Tabla 2.1). Los productos obtenidos se clonaron en el vector de transcripción *pGem-T-Easy*® (Promega) según procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). A partir de estos clones se obtuvieron transcritos de RNA abriendo los plásmidos con una enzima de restricción apropiada y utilizando las RNA polimerasas T7 (New England Biolab) o Sp6 (Roche) y desoxiuridín-trifosfato marcado con digoxigenina (DIG-dUTP, Roche®). El DNA se eliminó incubando con DNasa libre de RNasa (Ambion) y los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante precipitación de la sonda con 0.25 volumen de LiCl 4M y 3 volúmenes de etanol 96%.

Previamente a su utilización como sondas en el proceso de hibridación, los transcritos de cada aislado marcados con digoxigenina se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C, se mezclaron con tampón comercial Ultrahyb® (Ambion) a una concentración de 10 ng/ml. Las sondas se ecualizaron utilizando diluciones sucesivas del plásmido homólogo para que la intensidad de hibridación de cada una de ellas fuera equivalente y a continuación se mezclaron antes de su uso y se guardaron a –80°C.

**Tabla 2.1** Cebadores utilizados para preparar un cDNA de la región 3' terminal de los 4 aislados de CTV.

Cebadores <sup>1</sup>	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Posiciones <sup>2,3,4</sup>
PM99F	GTAATGCATATGGACGATACTAGCGGACAAA	18401-18423 <sup>1 2</sup>
R51F	GTAATGCATATGGATAATACTAGCGGACAAAC	18390- 18413 <sup>3</sup>
R53F	GTAATGCATATGGATGATACTAGC	18357-18372 <sup>4</sup>
R52R	GTAAGTCGAGTTGGACCTATGTTGGCCCCC	19174-19290 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> F(directo) y R (reverso)

<sup>2,3,4</sup> posiciones nucleotídicas de los cebadores en el gRNA de los aislados de CTV T318A (2), T36 (3), y T385 (4).

### 2.2.3 Hibridación molecular en formato Northern blot

Para detectar los sgRNAs presentes en los extractos de RNAt de las diferentes plantas inoculadas, los RNAs virales se separaron en geles de agarosa-formaldehído al 0.9% siguiendo el protocolo previamente establecido por Lewandowski y Dawson (1998) con algunas modificaciones. Un volumen equivalente a 2.5 µg de RNAt se mezcló con 2 volúmenes de tampón desnaturizante [1.5 x MOPS, pH 7.0; 60% (v/v) formamida desionizada (Sigma); 6.85% (v/v) formaldehído (Sigma)], se incubó a 65°C durante 15 min e inmediatamente se enfrió en hielo durante 5 min. Tras añadir el colorante (50% glicerol, 1% azul de bromofenol en agua libre de RNAsas) la electroforesis se realizó en tampón MOPS 1 x (5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA sódico, 20 mM MOPS, pH 7.0) a un voltaje constante de 80 V durante 3 horas. La transferencia del RNA a un soporte sólido (membrana de Nylon cargada positivamente, Roche) se realizó utilizando un aparato de electrotransferencia húmeda (Hoefer TE 42, Amersham Biosciences) durante 12-16 h en tampón fosfato 25 mM, pH 6.45, a 4°C. Los RNAs transferidos a la membrana se fijaron mediante irradiación con luz U.V. (125 mJ) (GS Gene Linker™, BioRad).

Las membranas se prehibridaron a 68°C una hora en solución de hibridación 1 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7) con 50% formamida, 0.2% SDS, 2% solución de bloqueo (Roche) y 0.1% N-lauril sarcosina (v/v) y posteriormente se hibridaron con la mezcla de ribosondas a 68°C durante 16 h. El exceso de sonda se eliminó mediante dos lavados de 5 min con 2 x SSC y 0.1% SDS a temperatura ambiente, y dos con 0.1 x SSC y 0.1% SDS a 68°C. Las membranas se equilibraron con dos lavados de 1 min en tampón maleato (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7.5) que contenía 0.3% de Tween 20 y dos lavados con tampón maleato. Las membranas se bloquearon con una solución de 10% de caseína (Sigma) en tampón

maleato durante una hora, se incubaron durante al menos 30 min con una dilución 1/1000 (v/v) de anticuerpos anti-DIG en tampón de bloqueo (Roche) y se lavaron dos veces (15 min) con una solución de Tween 20 (0.3%, v/v) en tampón maleato, dos veces (15 min) con tampón maleato y una con tampón de detección (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5).

La hibridación de la sonda con los RNAs fijados se detectó con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche). Las bandas correspondientes a los sgRNAs de *p20* y *p23* se visualizaron mediante el equipo *Luminiscent Image Analyzer LAS-3000®* (Fujifilm) con un tiempo de exposición variable entre 30 min y toda la noche usando el programa *LAS-3000 Lite Pro quimioluminescence* y las opciones *Increment* (que capta imágenes sucesivamente) y *High resolution* (que proporciona la mayor resolución). La densidad de las bandas de los sgRNAs se midió usando el paquete informático *Multi Gauge V3.0* (FujiFilm) que permite acotar todas las bandas de sgRNA presentes en los extractos mediante la opción *Profile* y eliminar el ruido de fondo con la opción *Spline*. La acumulación relativa de los sgRNAs se estimó con imágenes de los Northern blot captadas antes de la saturación.

### **2.3. Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV mediante hibridación molecular tipo Northern blot**

#### **2.3.1 Extracción siRNAs**

Para la obtención de preparaciones enriquecidas en siRNAs se ensayaron distintos métodos de extracción y fraccionamiento descritos en la bibliografía [Papaefthimiou *et al.*, (2001); Goto *et al.*, (2003); Fagoaga *et al.*, (2005); Molnár *et al.*, (2005)]. Finalmente, el fraccionamiento de los siRNAs a partir de extractos de RNAt se hizo según Dunoyer *et al.*, (2004). El RNAt se extrajo a partir de aproximadamente 0.5 g de corteza joven infectada utilizando Tri-Reagent® y BCP® (1-bromo-3-cloropropano) (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente los RNAs de mayor tamaño se precipitaron con una solución de PEG 8000 al 5% y NaCl 0.5 M durante 30 min a 4°C. Los siRNAs contenidos en el sobrenadante se precipitaron con 3 volúmenes de etanol al 96%, se resuspendieron en agua libre de RNasas, se cuantificaron por duplicado en un espectrofotómetro (Nanodrop®, ND-1000) y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

### **2.3.2 Hibridación molecular en formato Northern blot**

Los pequeños RNAs fraccionados (4 µg) se desnaturalizaron con un volumen de formamida desionizada (Sigma) y tras añadirles colorante (50% glicerol y 1% de azul de bromofenol en agua libre de RNAsas) se separaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida [15% acrilamida y 7 M de urea] usando tampón 0.5 x TBE (10 x: 1M Tris, 0.9M ácido bórico, 0.01M EDTA) y voltaje constante (200 V) durante aproximadamente 3.5 h.

La electrotransferencia de los siRNAs a una membrana de nylon (ver apartado 2.2.3) se efectuó durante una hora a 25 V en tampón 0.5 x TBE a 4°C. La pre-hibridación e hibridación de la membrana con una mezcla de ribosondas específicas de CTV se efectuó a 42°C durante 16 h. Los procesos de lavado, revelado de las membranas y cuantificación relativa de la señal quimioluminiscente se realizó según el procedimiento indicado en el apartado 2.2.3, excepto que en este caso las condiciones de lavado fueron menos estrictas y no se realizaron los lavados con tampón 0.1 x SSC y 0.1% SDS a 68°C.

### **2.4 RT-PCR cuantitativa a tiempo real**

Para realizar los ensayos de q-RT-PCR se utilizó la metodología descrita en el Capítulo I, apartado 2.3, desarrollada en el laboratorio (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

### **2.5 Ensayo de la capacidad supresora de la proteína p23 de distintos aislados de CTV**

#### **2.5.1 Clonación del gen p23 en un plásmido binario**

El cDNA de p23 de los aislados de CTV T385, T36 y T388 (el de T318A es idéntico al de T388) se sintetizó mediante retrotranscripción con *SuperScript II* (Invitrogen) a 42°C, utilizando dsRNA previamente desnaturalizado con hidroximetilmercurio y el cebador p23R (Tabla 2.2), y se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos que contenían el sitio de corte para *BamH I* (Tabla 2.2). Los fragmentos obtenidos se clonaron en el sitio de corte *BamH I* del vector pMOG (amablemente proporcionado por el Dr. Leandro Peña, IVIA) previamente digerido con este enzima. El vector pMOG contiene la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CMV) y la secuencia del

terminador del gen de la nopalina sintasa (*Nos-T*). Una vez confirmada la secuencia clonada, el *cassette* de expresión completo de cada aislado se liberó digiriendo con *EcoRI* y se subclonó en el vector binario pCAMBIA 2300 (GenBank. No. AF2343315), previamente digerido con *EcoRI* (Fig. 2.1), para dar lugar a pCAMBIA-*p23*. Todas las ligaciones se realizaron con T4 ligasa (Promega) y los plásmidos recombinantes se transfectoron en células competentes de la cepa JM109 de *E. coli* mediante choque térmico.

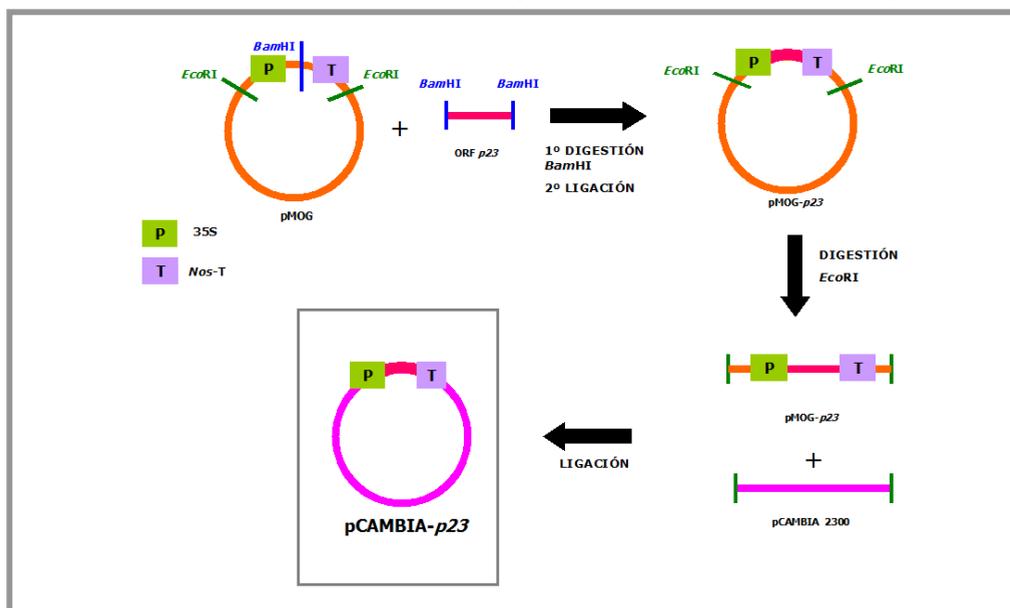
Los clones pCAMBIA-*p23* se utilizaron para transformar mediante electroporación células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa COR 308, portadora del plásmido pCH32 que contiene copias extra de los genes de virulencia *virG* y *virE*.

**Tabla 2.2** Cebadores utilizados para la retrotranscripción y amplificación del gen *p23* de los aislados T388/T318A, T36 y T385 mediante PCR.

Cebadores <sup>1</sup>	Secuencia nucleotídica 5'-3' <sup>2</sup>	Posiciones <sup>3,4,5</sup>
p23-T388F	TTTCT <sup>2</sup> GGATCCATGGACGATACTAGCGGACAAAC	18401-18423 <sup>3</sup>
p23-T36F	TTTCT <sup>2</sup> GGATCCATGGTAATACTAGCGGACAAAC	18390- 18413 <sup>4</sup>
p23-T385F	TTTCT <sup>2</sup> GGATCCATGGATGATACTATCGGACAAAC	18357-18372 <sup>5</sup>
p23R	AAAGA <sup>2</sup> GGATCCAATCAGATGAAGTGGTGTTCAC	19900-19921 <sup>4</sup>

<sup>1</sup> F(directo) y R (reverso) <sup>2</sup> sitio de corte del enzima *BamHI* (2)

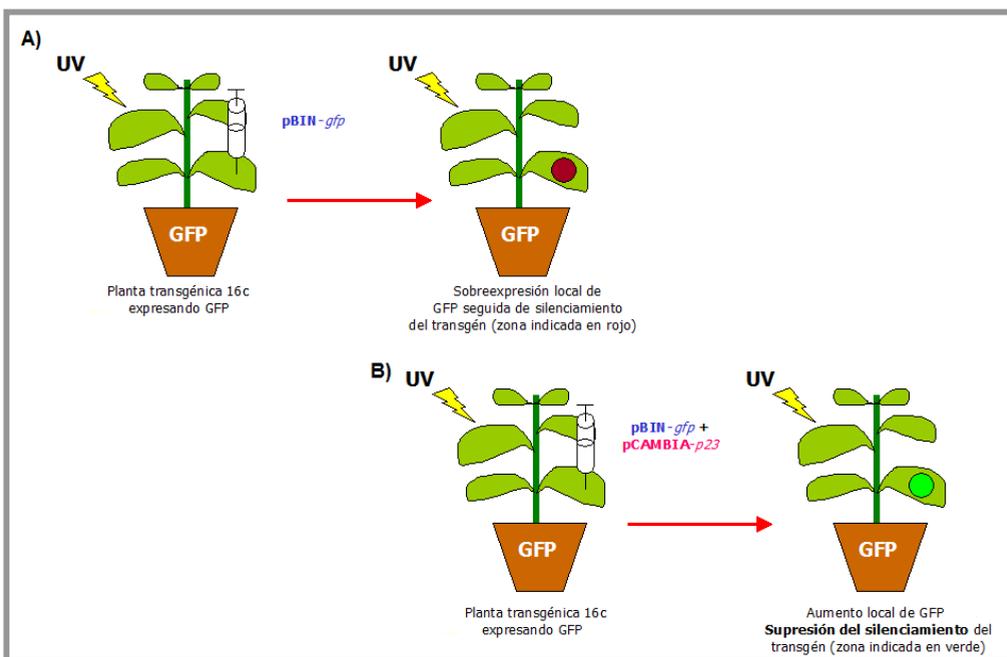
<sup>3,4,5</sup> posiciones nucleotídicas de los cebadores en el gRNA de los aislados de T318A (3), T36 (4), y T385 (5)



**Fig. 2.1** Esquema de la clonación del gen *p23* de cada aislado de CTV en el vector binario pCAMBIA 2300.

## 2.5.2 Ensayo de supresión de la expresión transitoria de GFP mediante agroinfiltración de *p23* en plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c

Para comparar la capacidad supresora de la proteína p23 de distintos aislados de CTV se efectuó un ensayo de expresión transitoria de ésta y de la proteína verde fluorescente (GFP). Para este ensayo se co-infiltraron las hojas de *Nicotiana benthamiana* GFP 16c, que expresa GFP a partir de un transgén (Llave *et al.*, 2000; Ruiz, *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 2000), con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* transfectados con pCAMBIA-*p23* y pBIN-*gfp*.



**Fig. 2.2** Esquema del ensayo de expresión transitoria de *gfp* mediante agroinfiltración. **A)** La agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* GFP 16c con el plásmido binario pBIN-*gfp* produce sobreexpresión local de GFP seguida del silenciamiento del transgén. **B)** La agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* GFP 16c con los plásmidos pBIN-*gfp* y pCAMBIA-*p23* produce un aumento local de la fluorescencia verde del GFP que indica supresión del silenciamiento del transgén *gfp*.

Para realizar este ensayo, colonias individuales de las bacterias transformadas se cultivaron a 28°C en agitación durante 16 h, en medio líquido Luria-Bertani (LB) conteniendo 50 mg/l de Kanamicina ( $K_{50}$ ) y 5 mg/l de Tetraciclina ( $T_5$ ). Posteriormente se realizaron diluciones de este precultivo con el medio de inducción [10 mM MES pH 5.6 (ácido N-morfolinoetansulfónico), 20  $\mu$ M acetosiringona y  $T_5$  en 50 ml LB] y se incubaron entre 12 y 16 h a 28°C. A continuación, las bacterias se precipitaron, se

resuspendieron en medio de infiltración (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES y 150 μM acetosiringona) hasta una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) igual a 1, se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente en agitación suave y transcurrido este tiempo, se procedió a la co-infiltración en el envés de las hojas de *N. benthamiana* GFP 16c con la ayuda de jeringuillas de 2 ml. En cada ensayo se co-infiltraron volúmenes equivalentes de un cultivo de *Agrobacterium* que contenía el vector binario pCAMBIA-p23 y de otro que contenía pBIN-*gfp*. Como controles positivos se utilizaron la proteína p19 del tomosvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), que actúa como un potente supresor local del silenciamiento (Voinnet *et al.*, 2003), y la proteína de movimiento del virus del manchado foliar de los cítricos (*Citrus leaf blotch virus*, CLB<sub>V</sub>), que es una proteína supresora débil (Renovell *et al.*, datos no publicados). El vector pBIN-*gfp* junto con el vector vacío se empleó como control negativo. La fluorescencia verde de GFP se visualizó mediante una lámpara U.V. a distintos días post infiltración (dpi) y se realizaron fotos con una cámara digital (Nikon D-200) utilizando un objetivo de 60 mm (Micro-NIKKOR AF-S) y un filtro para luz U.V. Se realizaron 5 experimentos independientes, en los cuales se agroinfiltraron 4 plantas individuales por construcción y controles (Fig. 2.2).

### 2.5.3 Detección de la expresión del transgén *gfp* mediante hibridación molecular tipo Northern blot

La zona de supresión o sobreexpresión de GFP en las hojas de *N. benthamiana* GFP 16c agroinfiltradas se marcó bajo luz U.V. y posteriormente se recortó para analizar los RNAs expresados a los 4 dpi. Los fragmentos de hoja se trituraron con nitrógeno líquido y se procedió a la extracción de RNAt mediante una desproteinización con fenol ácido seguida de una precipitación de los ácidos nucleicos totales con etanol absoluto y acetato de sodio 5 M. El RNAt obtenido se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop®, ND-1000). El transgén de *gfp* presente en 1.5 μg de RNAt se detectó mediante hibridación molecular tipo Northern blot (ver apartado 2.2.3). La ribsonda específica para *gfp* se preparó digiriendo el plásmido que contenía el gen *gfp* (amablemente cedido por el Dr. Leandro Peña, IVIA) con el enzima de restricción *Sal*I (Fermentas) y transcribiéndolo *in vitro* con la RNA polimerasa T7 (New England Biolab) en presencia de DIG-UTP (ver apartado 2.2.1).

#### **2.5.4 Detección de los siRNAs específicos de *gfp* mediante hibridación molecular tipo Northern blot**

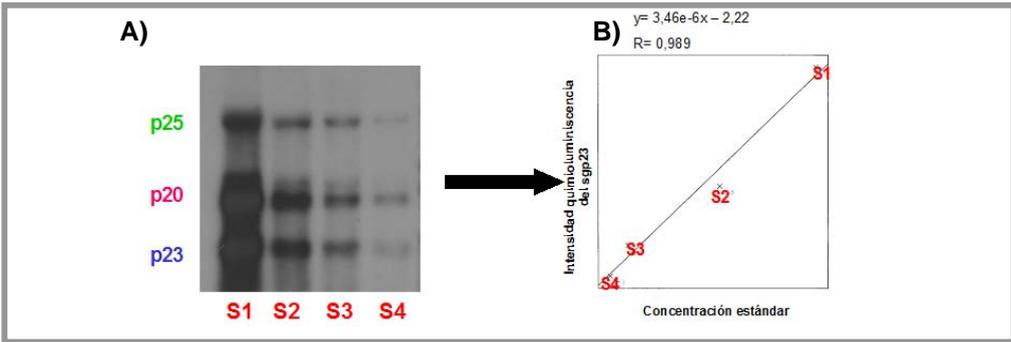
Las preparaciones enriquecidas en siRNAs se obtuvieron a partir de los fragmentos recortados de hojas de *N. benthamiana* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1. Los siRNAs derivados de *gfp* se detectaron mediante hibridación molecular en formato Northern blot con la ribosonda específica de *gfp* a 42°C (Ver apartado 2.3.2).

### **3. RESULTADOS**

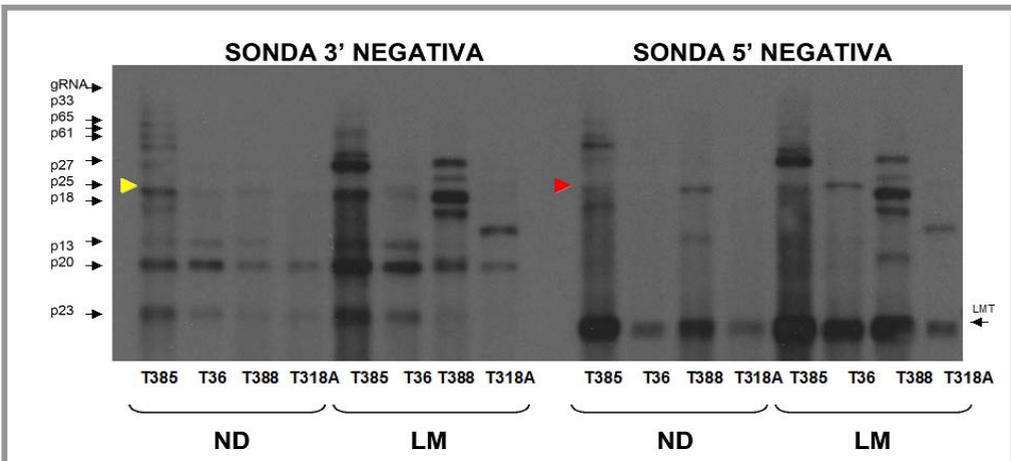
#### **3.1 Detección y cuantificación de los sgRNA de los genes *p20* y *p23* en distintas especies infectadas**

En todos los gels de agarosa-formaldehído se incluyeron, junto a las muestras, cuatro diluciones seriadas de un control positivo estándar que permitió comparar la acumulación de sgRNA en los distintos experimentos. Este control consistía en un extracto de RNA<sub>t</sub> de una mezcla de corteza joven de plantas infectadas con los 4 aislados de CTV. La señal de hibridación correspondiente a los sgRNAs de *p20* y *p23* en cada una de las diluciones del control positivo estándar se cuantificó mediante el paquete informático Multi Gauge V3.0 del lector LAS 3000 (FujiFilm) y los valores obtenidos se representaron frente a las diluciones correspondientes (S1:100, S2:50, S3:25, S4:12.5) para obtener una recta de calibración para cada gen (Fig. 2.3). La acumulación relativa de cada uno de los sgRNAs en los extractos vegetales se obtuvo relacionando los valores de intensidad de luminiscencia de cada banda con los valores de la recta de calibración correspondiente.

La estimación del sgRNA de *p25* se vio dificultada por la presencia en algunos aislados de un RNA defectivo (dRNA) del mismo tamaño que impedía su cuantificación fiable (Fig. 2.4).



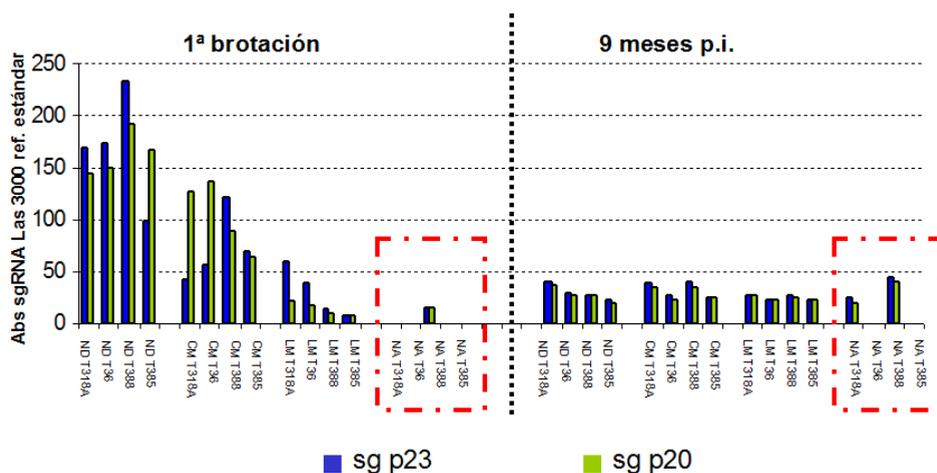
**Fig. 2.3** A) Hibridación molecular en formato Northern blot de diluciones seriadas del control positivo estándar. A la izquierda se indican las posiciones de los sgRNAs 3' co-terminales *p23*, *p20* y *p25*. B) Recta de calibración obtenida al representar los valores de intensidad de quimioluminiscencia del sgRNA *p23* frente a las diluciones del extracto.



**Fig. 2.4** Hibridación molecular tipo Northern blot del RNA viral de plantas de ND y LM infectadas con los 4 aislados de CTV. La hibridación con la sonda 3' detecta el gRNA, sgRNAs y dRNAs presentes en los extractos (panel izquierdo) mientras que la sonda 5' sólo detecta el gRNA y los dRNAs (panel derecho). Con flecha amarilla se indica la posición del sgRNA de *p25* y con flecha roja el dRNA que comigra con este sgRNA.

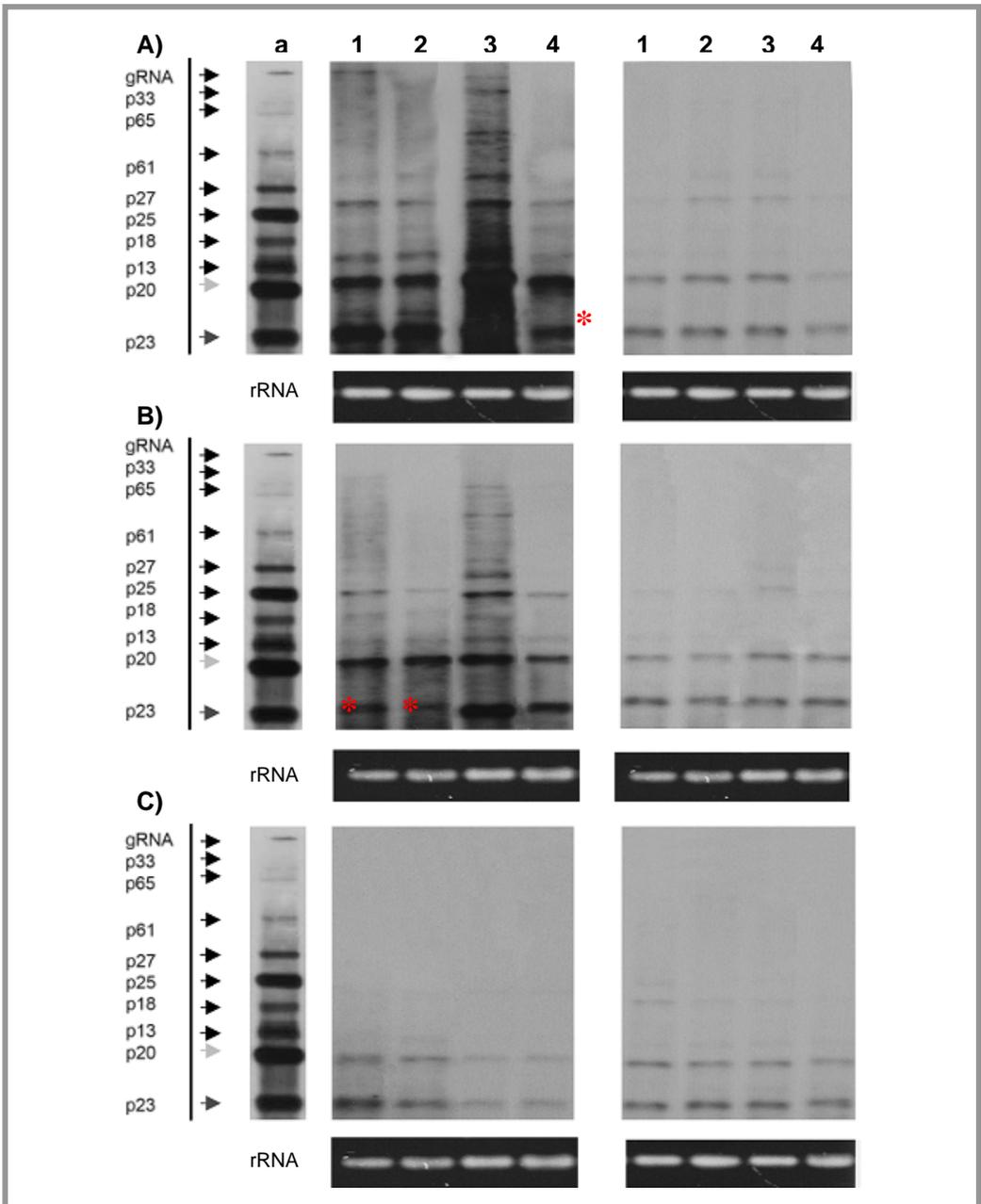
La cuantificación relativa de los sgRNAs en plantas inoculadas con cuatro aislados diferentes de CTV mostró un comportamiento variable entre huéspedes cítricos y aislados (Fig. 2.5 y 2.6). Así, mientras la acumulación de los sgRNAs de *p20* y *p23* en ND y CM era mayor en la primera brotación que a los 9 meses p.i., esta diferencia no se apreciaba en LM, y en NA la tendencia era la inversa, es decir, mayor acumulación a los 9 meses p.i. que al comienzo de la infección. De hecho, en la primera brotación de NA sólo se detectaron los sgRNAs del aislado T388 (Fig. 2.7). En esta brotación la mayor acumulación de sgRNAs para todos los aislados se

observó en ND seguido de CM, mientras que en LM resultó sorprendentemente baja, en particular los niveles observados para T388 y T385 (Fig. 2.5 y 2.6). La cantidad de sgRNA de *p23* fue similar o ligeramente superior a la de *p20*, salvo en ND infectado con T385 y CM infectado con T318A o T36 (Fig. 2.6 A, B). El nivel de sgRNAs a los 9 meses p.i. en ND, CM y LM fue similar entre aislados y entre huéspedes, mientras que en NA no se detectaron los sgRNAs de los aislados T36 y T385 (Fig. 2.5, 2.6 y 2.7).



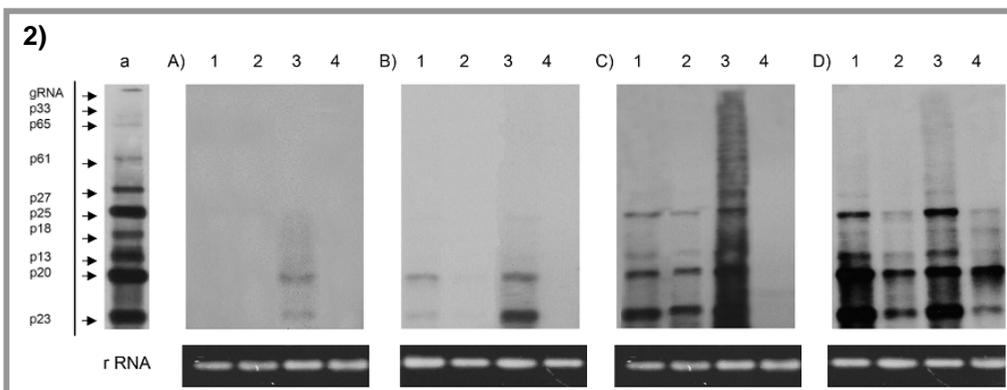
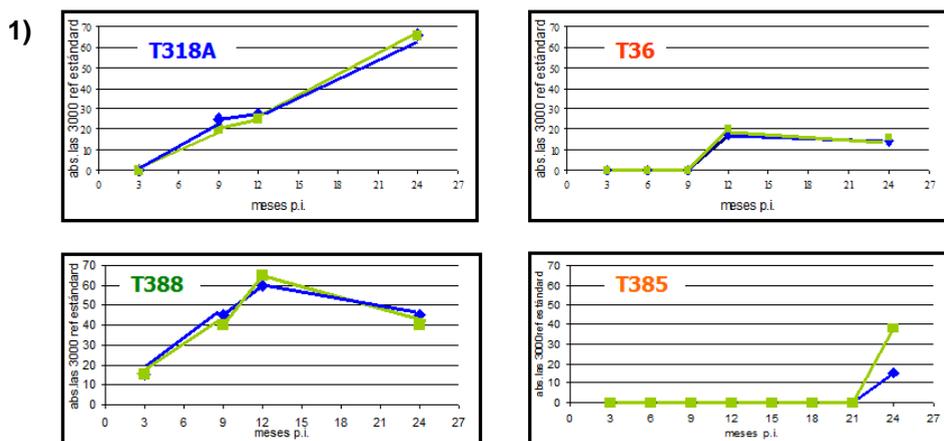
**Fig. 2.5** Evolución temporal de la acumulación de los sgRNAs de *p23* y *p20* en extractos de corteza de naranjo dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM), lima Mexicana (LM), y naranjo amargo (NA) inoculadas con los aislados T318A, T36, T388 y T385 de la primera brotación (panel izquierdo) y a los 9 meses p.i. (panel derecho). Se resalta con punteado rojo el aumento de los sgRNAs de *p23* y *p20* observado en corteza de NA a los 9 meses p.i.

Para analizar en más detalle la infección de NA y comprobar si el incremento en la actividad replicativa se mantenía en brotaciones posteriores, se realizaron nuevos ensayos de hibridación molecular tipo Northern blot a distintos tiempos hasta los 24 meses p.i. (Fig. 2.7). Para todos los aislados el perfil de acumulación de los sgRNAs de *p20* y *p23* fue idéntico, observándose un incremento en la cantidad de éstos a partir de los 3-9 meses p.i., excepto para el aislado T385 en el que sólo se detectaron los sgRNAs a los 21 meses p.i. Las pautas de acumulación temporal fueron distintas para cada aislado.



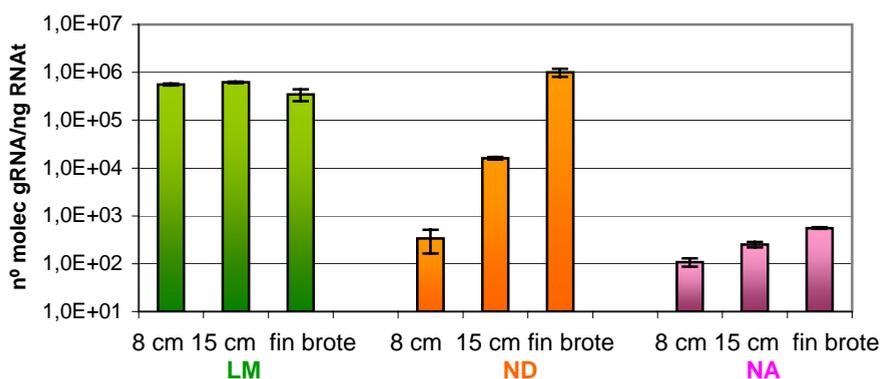
**Fig. 2.6** Hibridación molecular tipo Northern blot de RNAt de corteza de **(A)** naranjo dulce Pineapple (ND), **(B)** *C. macrophylla* (CM) y **(C)** lima Mexicana (LM), inoculadas con los aislados T318A **(1)**, T36 **(2)**, T388 **(3)** y T385 **(4)**, en la primera brotación (panel izquierdo) y a los 9 meses p.i. (panel derecho). Las membranas se hibridaron con una mezcla de sondas RNA-DIG complementarias al extremo 3' de cada uno de los aislados. A la izquierda se indican las posiciones de los sgRNAs 3' co-terminales presentes en un extracto de dsRNA (a). Se resalta la posición de los sgRNAs de p23 (gris oscuro) y p20 (gris claro) y con asterisco rojo la menor acumulación del sgRNA de p23 en la 1ª brotación de ND infectado con T385 y de CM infectado con T318A y T36. La tinción con bromuro de etidio del RNA ribosomal (rRNA) revela la carga equivalente de las muestras.

Las plantas infectadas con T388 y T36 alcanzaron su nivel más alto de sgRNAs a los 12 meses p.i., aunque el nivel de las primeras fue superior al de las segundas. Por el contrario, el nivel de sgRNAs de las plantas infectadas con T318A siguió aumentando hasta al menos los 24 meses p.i., y el de las infectadas con T385 no se detectaron hasta los 24 meses p.i. La acumulación de sgRNA de *p20* fue similar a la de *p23* para T318A, T36 o T388 y algo superior para T385.



**Fig. 2.7 1)** Acumulación temporal de los sgRNAs de *p23* (azul) y *p20* (verde) de CTV en corteza de naranjo amargo (NA) durante los dos primeros años de la infección viral. **2)** Hibridación molecular tipo Northern blot de RNA<sub>t</sub> de corteza de NA infectado con los aislados T318A (1), T36 (2), T388 (3) y T385 (4), en la primera brotación (A), a los 9 meses p.i. (B), 1 año p.i. (C) y 2 años p.i. (D). Las membranas se hibridaron con una mezcla de sondas RNA-DIG complementarias al extremo 3' de cada uno de los aislados. A la izquierda se indican las posiciones de los sgRNAs 3' co-terminales presentes en un extracto de dsRNA (a). La tinción con bromuro de etidio del RNA ribosomal (rRNA) muestra la carga equivalente de las muestras.

Como se ha indicado anteriormente (Fig. 2.5 y 2.6), la acumulación de sgRNAs en la primera brotación de LM resultó inesperadamente baja en comparación con ND y CM, en particular en las plantas infectadas con los aislados T388 y T385. En el invernadero se observó que las plantas de LM eran las primeras en completar su brotación, seguidas de CM y posteriormente de ND y NA. Para efectuar un seguimiento más detallado de la infección en la primera brotación, se analizó mediante q-RT-PCR la carga viral en brotes de 8 cm, 15 cm y una vez finalizada la brotación, en plantas de LM, ND y NA infectadas con el aislado T385 (Fig. 2.8). Las pautas de acumulación fueron distintas en los tres huéspedes: mientras la carga viral en LM había alcanzado su máximo en brotes de 8 cm y posteriormente permanecía estable con tendencia a disminuir, en ND aumentaba rápidamente hasta el final de la brotación y en NA crecía lentamente, permaneciendo en valores bajos incluso en el brote terminado. La estabilidad de la carga viral en LM desde estadios tempranos de la brotación era congruente con el bajo nivel de sgRNAs, ya que el virus tendría tasas de replicación más bajas en estadios tardíos de la brotación.



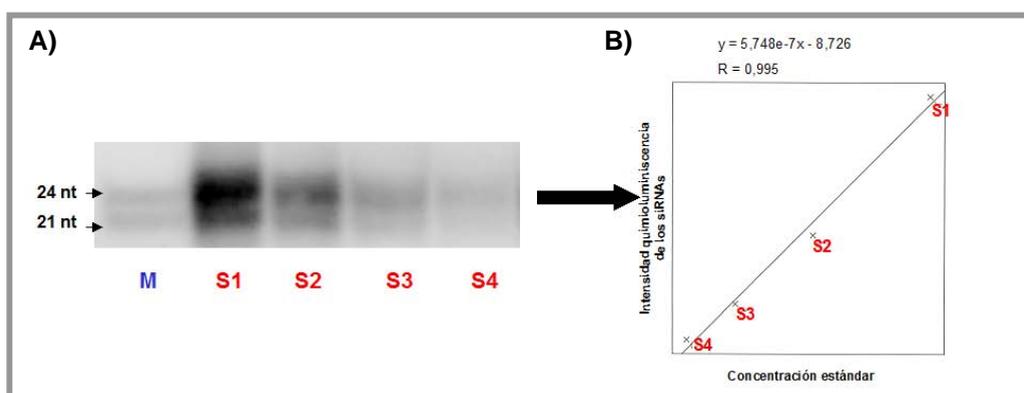
**Fig. 2.8** Evolución temporal de la carga viral durante la primera brotación de plantas de lima Mexicana (LM), naranjo dulce Pineapple (ND) y naranjo amargo (NA) inoculadas con el aislado T385.

### 3.2 Detección y cuantificación de siRNAs derivados de CTV en plantas infectadas

La cuantificación de siRNAs derivados de CTV en extractos de corteza de la primera brotación y a los 9 meses p.i., se efectuó mediante hibridación molecular en formato Northern blot utilizando extractos enriquecidos en RNAs pequeños y geles de poliacrilamida. Como en el caso de los sgRNAs, la cantidad relativa de siRNAs se

estimó incluyendo en todos los experimentos diluciones seriadas de un extracto enriquecido en siRNAs de un control positivo estándar, con el que se preparó una recta de calibración (Fig. 2.9).

La cuantificación relativa de la acumulación de los siRNAs presentes en los extractos vegetales se obtuvo relacionando los valores de intensidad de luminiscencia de la banda de los siRNAs con los valores de la curva patrón. Dos cebadores de DNA de 21 y 24 nt, respectivamente, complementarios a las ribosondas específicas del extremo 3' terminal utilizadas en la hibridación, se usaron como marcadores de tamaño de los siRNAs (Fig. 2.9).

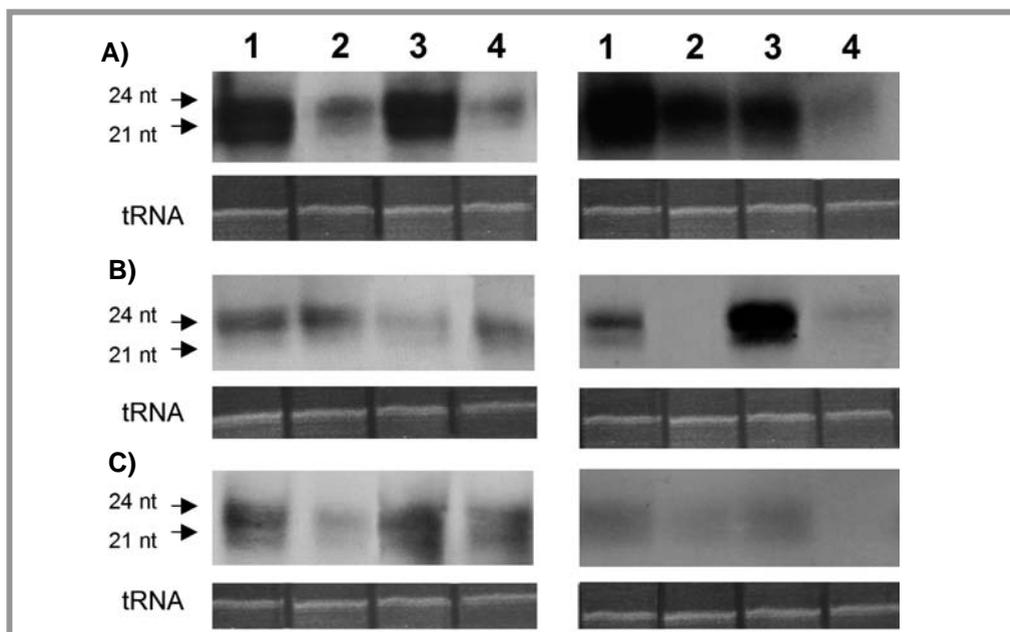


**Fig. 2.9 A)** Hibridación molecular en formato Northern blot de diluciones seriadas del control positivo estándar (S1, S2, S3, S4). M: marcador de tamaño de siRNAs (21 y 24nt). **B)** Recta de calibración obtenida representando los valores de intensidad de señal de los siRNAs obtenidos mediante el paquete informático Multi Gauge V3.0® (FujiFilm) frente a la dilución del extracto.

En todos los casos, la mayor acumulación de siRNAs se correspondía con una mayor carga viral. Por este motivo, para evaluar la intensidad del silenciamiento inducido por el virus en cada huésped y poder comparar el comportamiento de los 4 aislados de CTV en los distintos huéspedes cítricos se utilizaron valores normalizados de siRNAs, dividiendo la concentración relativa de éstos por el número de copias de gRNA por ng de RNAt determinado en el mismo extracto (Capítulo I, apartado 3.2) (Tablas 2.3 y 2.4).

En la primera brotación de las plantas de ND, LM y CM infectadas con cada uno de los 4 aislados se detectaron cantidades variables de siRNAs derivados de CTV (Fig. 2.10, panel izquierdo), mientras que la acumulación en NA fue más tardía (ver más adelante, Fig. 2.13). Aunque la cantidad de siRNA en las plantas infectadas con

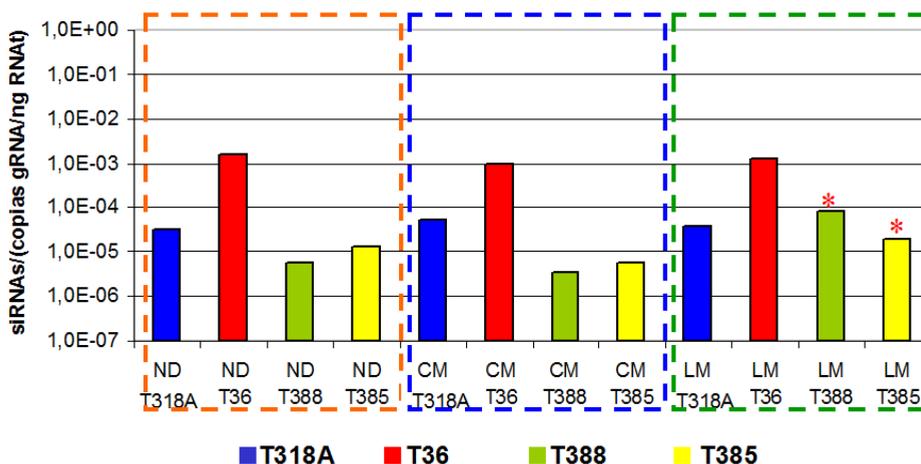
T36 era similar o inferior a las de otros aislados su valor normalizado fue el más elevado (Tabla 2.3) en los tres huéspedes, debido a la baja acumulación de gRNA de este aislado, lo que sugiere que este aislado presenta un silenciamiento más intenso que los demás aislados. El valor normalizado de siRNA de cada aislado en los tres huéspedes fue similar excepto para los aislados T388 y T385 en LM, donde la producción de siRNAs fue ligeramente superior respecto a los otros huéspedes (Fig. 2.11, Tabla 2.3).



**Fig. 2.10** Hibridación molecular tipo Northern blot de extractos enriquecidos en siRNA de corteza de plantas de **A)** naranjo dulce Pineapple (ND), **B)** *C. macrophylla* (CM) y **C)** lima Mexicana (LM), inoculadas con los aislados T318A (1), T36 (2), T388 (3) y T385 (4). El panel de la izquierda muestra los siRNAs detectados en la primera brotación y el de la derecha a los 9 meses p.i. Las membranas se hibridaron con una mezcla de sondas RNA-DIG complementarias al extremo 3' de cada uno de los aislados. A la izquierda se indica el tamaño de los siRNAs. La tinción de los tRNAs con bromuro de etidio muestra la carga equivalente de las muestras.

**Tabla 2.3** Nivel de acumulación y valores normalizados de los siRNAs presentes en la primera brotación de plantas de naranjo dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y lima Mexicana (LM) inoculadas con cuatro aislados diferentes de CTV.

	copias gRNA/ng RNAt	Acumulación relativa de siRNAs	VALOR NORMALIZADO siRNAs/(copias gRNA/ng RNAt)
ND T318A	2,60E+06	83	3,19E-05
ND T36	1,00E+04	16	1,60E-03
ND T388	1,40E+07	81	5,79E-06
ND T385	1,00E+06	13	1,30E-05
CM T318A	2,80E+05	15	5,36E-05
CM T36	1,50E+04	14	9,33E-04
CM T388	2,80E+06	10	3,57E-06
CM T385	2,60E+06	15	5,77E-06
LM T318A	9,20E+05	36	3,91E-05
LM T36	9,90E+03	12	1,21E-03
LM T388	4,50E+05	35	7,78E-05
LM T385	1,90E+06	37	1,95E-05



**Fig. 2.11** Valores normalizados de los de los siRNAs presentes en la primera brotación de plantas de naranjo dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y lima Mexicana (LM) inoculadas con T318A, T36, T388 y T385. Se resalta con un asterisco rojo la producción algo mayor de siRNAs de los aislados T388 y T385 en LM respecto a los otros huéspedes.

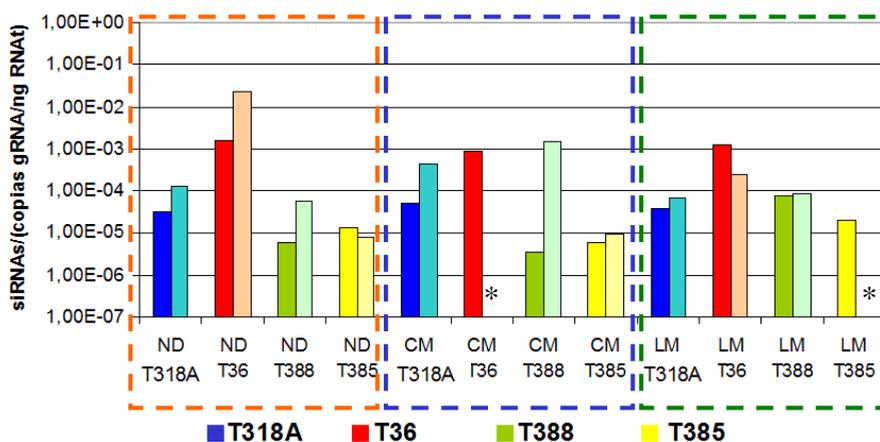
A los 9 meses p.i. se detectaron siRNAs en la mayoría de los casos, a excepción del aislado T36 en CM y el aislado T385 en LM (Fig. 2.10, panel derecho). En comparación con la primera brotación, los valores normalizados de siRNAs a los 9 meses p.i. variaron en función del aislado y del huésped (Tabla 2.4, Fig. 2.12). Así, mientras los aislados T318A y T388 aumentaron o mantuvieron a un nivel similar sus valores normalizados de siRNA en los tres huéspedes, los valores de T385 se

mantuvieron en ND y CM y disminuyeron en LM y los de T36 aumentaron en ND y disminuyeron en CM y LM (Fig. 2.12).

**Tabla 2.4** Valores normalizados de los siRNAs presentes al cabo de 9 meses en corteza de plantas de naranjo dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y lima Mexicana (LM) inoculadas con los cuatro aislados diferentes de CTV.

	copias gRNA/ng RNAt	Acumulación relativa siRNAs	VALOR NORMALIZADO siRNAs/(copias gRNA/ng RNAt)
ND T318A	9,3E+05	120	1,29E-04
ND T36	3,7E+03	85	2,31E-02
ND T388	1,5E+06	83	5,52E-05
ND T385	1,0E+06	8	7,84E-06
CM T318A	4,7E+04	20	4,23E-04
CM T36	1,3E+03	*nd	
CM T388	4,7E+04	70	1,50E-03
CM T385	6,2E+05	6	9,71E-06
LM T318A	1,1E+05	10	9,50E-05
LM T36	8,3E+03	2	2,40E-04
LM T388	9,3E+04	8	8,60E-05
LM T385	7,5E+05	*nd	

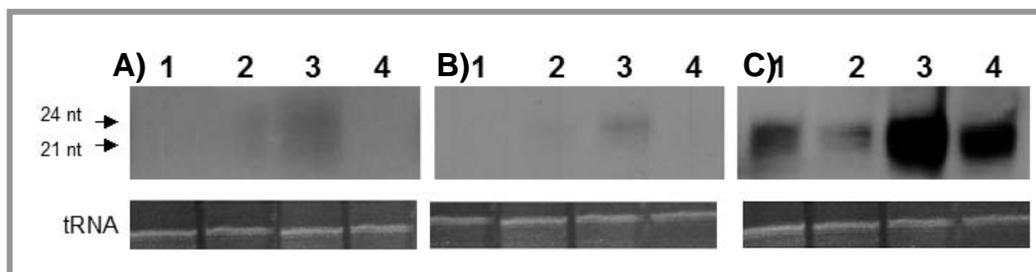
\*nd: no detectado en nuestras condiciones



**Fig. 2.12** Comparación de los valores normalizados de siRNAs derivados de CTV entre la primera brotación (color oscuro) y a los 9 meses p.i. (color claro) de plantas de naranjo dulce Pineapple (ND), *C. macrophylla* (CM) y lima Mexicana (LM) inoculadas con los aislados T318A (azul), T36 (rojo), T388 (verde) y T385 (amarillo). Se indica con un asterisco negro la no detección de siRNAs en nuestras condiciones.

Como ya se ha indicado, la acumulación de siRNAs derivados de CTV en plantas de NA siguió una pauta diferente a la observada en ND, CM o LM, por lo que la cuantificación de siRNAs se efectuó en la primera brotación (3 meses p.i.) y al cabo de 1 y 2 años p.i. (Fig. 2.13). En los dos primeros análisis apenas se detectó la

presencia de siRNAs de CTV en las plantas infectadas con el aislado T388. Sin embargo, con el desarrollo de la infección, junto al incremento en el título viral (ver Capítulo 1) se detectó un aumento de los siRNAs, resultando a los 2 años p.i. detectables para todos los aislados (Fig. 2.13).

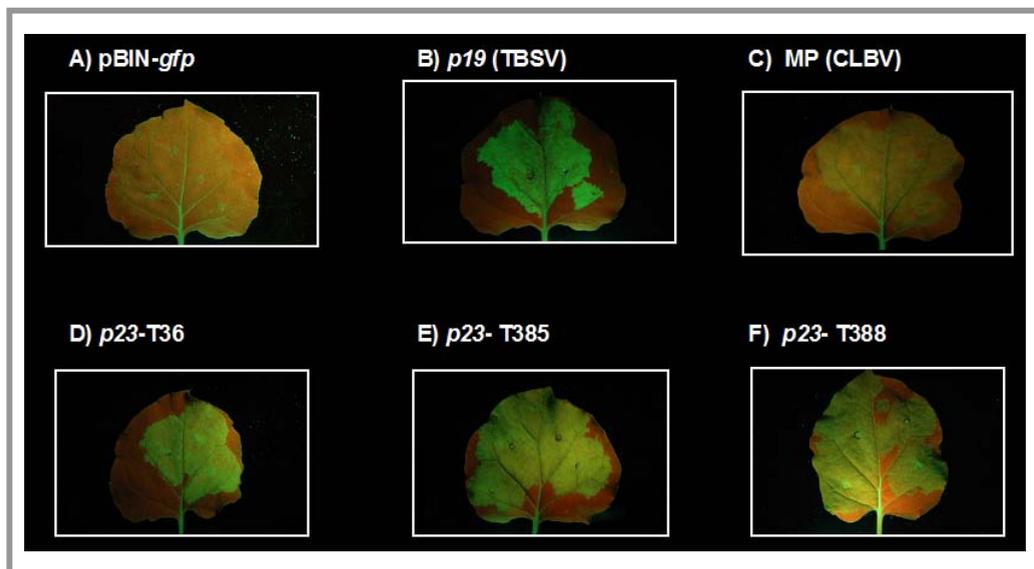


**Fig. 2.13** Hibridación molecular tipo Northern blot de extractos enriquecidos en siRNA de corteza de plantas de naranjo amargo infectadas con los aislados de CTV T318A (1), T36 (2), T388 (3) y T385 (4) a los 3 meses p.i. (A), 1 año p.i. (B) y 2 años p.i. (C). Las membranas se hibridaron con una mezcla de sondas RNA-DIG complementarias al extremo 3' de cada uno de los aislados. A la izquierda se indican los tamaños de los siRNAs derivados de CTV. La tinción de los tRNAs con bromuro de etidio muestra la carga equivalente de las muestras.

### 3.3 Evaluación de la capacidad supresora de la proteína p23 de los distintos aislados de CTV

Para los ensayos de supresión del silenciamiento se utilizaron plantas transgénicas de *N. benthamiana* 16c (Ruiz *et al.*, 1998) que expresan constitutivamente el gen *gfp*, por lo que sus tejidos muestran fluorescencia verde bajo la luz U.V. En cada ensayo se co-infiltraron dos vectores binarios que portaban el gen *gfp* y el gen supresor del silenciamiento (el gen *p23* de cada uno de los aislados de CTV o los controles *p19* o el gen de la proteína MP de CLBV). En las hojas de *N. benthamiana* 16c, la agroinfiltración del plásmido binario pBIN-*gfp* genera un incremento en la transcripción de *gfp* que induce el silenciamiento del mismo por parte de la planta y una pérdida en la expresión de GFP que puede visualizarse bajo luz U.V. como una área roja anaranjada en la zona infiltrada (Fig. 2.15, Foto A). La co-expresión de *gfp* y *p23* (o el gen de otra proteína supresora control) anula el silenciamiento local del transgén *gfp* inducido por el primero, provocando un aumento de la intensidad fluorescente verde en la zona infiltrada. En los ensayos efectuados, los genes *p23* de los distintos aislados de CTV generaron bajo la luz U.V. una intensidad fluorescente verde similar en la zona agroinfiltrada, indicando que no difieren en su capacidad supresora del silenciamiento génico mediado por RNA, al

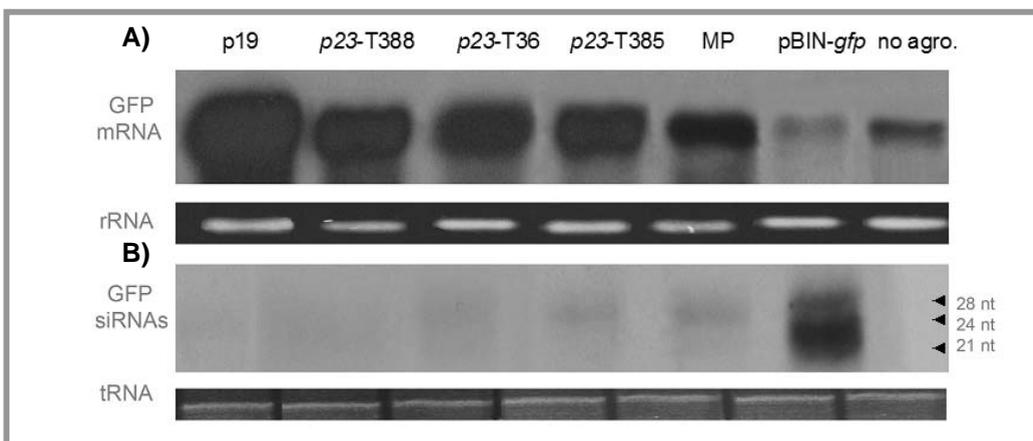
menos en *N. benthamiana* (Fig. 2.15, Fotos D, E y F). Sin embargo, la proteína p19 generó una intensidad fluorescente verde mayor y la proteína MP una intensidad menor en comparación con p23 (Fig. 2.15, Fotos B y C).



**Fig. 2.14** Ensayo de la capacidad supresora de la proteína p23 de los aislados de CTV T36 (D), T385 (E) y T388 (F) en hojas de *N. benthamiana* 16c. Plantas co-infiltradas con la construcción portadora de *gfp* y el vector vacío (A), el gen *p19* de TBSV (B), o el gen de la proteína MP de CLBV (C), utilizadas como control.

La sobreexpresión de GFP en las plantas agroinfiltradas fue máxima a los 4 días p.i. Por este motivo las zonas de sobreexpresión (o represión) de GFP observadas a los 4 dpi se recortaron y se utilizaron para la extracción y detección de RNA mensajero (mRNA) de *gfp* y los siRNAs derivados del mismo. La hibridación molecular tipo Northern blot (Fig. 2.15.A) mostró que la mayor acumulación de mRNA de *gfp* ocurría en las plantas agroinfiltradas con el plásmido binario portador de *p19*, seguidas de las plantas agroinfiltradas con el gen *p23* de los distintos aislados de CTV. El nivel de mRNA para estos tres supresores era similar y mayor que el observado para la proteína MP de CLBV. Las hojas co-infiltradas con pBIN-*gfp* más el vector vacío presentaban niveles muy bajos de mRNA de *gfp* debido al silenciamiento del transgén. Finalmente, los niveles de mRNA de *gfp* en hojas de plantas no agroinfiltradas eran superiores a los de las plantas co-infiltradas con pBIN-*gfp* más vector vacío, pero inferiores a los de plantas agroinfiltradas con las proteínas supresoras.

La acumulación de siRNAs específicos de *gfp* también se examinó mediante hibridación Northern a los 4 dpi (Fig. 2.15.B). La mayor cantidad de siRNAs se observó en hojas co-infiltradas con pBIN-*gfp* más vector vacío, mientras que en hojas agroinfiltradas con supresores del silenciamiento la señal de hibridación de los siRNAs derivados de *gfp* fue muy débil o indetectable. No se detectaron siRNAs en hojas de plantas no agroinfiltradas (Fig. 2.15).



**Fig. 2.15 A)** Niveles de expresión del mRNA de *gfp* en hojas de *N. benthamiana* 16c no agroinfiltradas o co-infiltradas con pBIN-*gfp* y genes de proteínas supresoras del silenciamiento (*p19*, *p23-T388*, *p23-T36*, *p23-T385* y gen de la MP de CLBV), o con pBIN-*gfp* más el vector vacío. Detección mediante hibridación Northern con una sonda de *gfp*. En el panel inferior la tinción con bromuro de etidio del RNA ribosomal (rRNA) muestra la carga equivalente de las muestras. **B)** Acumulación de siRNAs específicos de *gfp* en extractos enriquecidos en RNAs pequeños de las mismas muestras y usando la misma sonda. La tinción con bromuro de etidio del tRNA revela la carga equivalente de las muestras. A la derecha se indican los tamaños de los siRNAs.

#### 4. DISCUSIÓN

En el capítulo anterior se observaron diferencias en las pautas de acumulación viral de distintos aislados de CTV en un mismo huésped y de distintos huéspedes cítricos infectados con un mismo aislado. Estas variaciones podrían ser debidas a diferencias en la tasa de replicación viral o en la eficiencia de la supresión del silenciamiento, como resultado de las interacciones específicas aislado/huésped. Para evaluar la actividad replicativa de cada aislado viral en los distintos huéspedes se examinó la acumulación de sgRNAs de los genes *p20* y *p23* en las distintas combinaciones aislado/huésped. La elección de estos sgRNAs obedece a que, junto al de *p25*, son los que más se acumulan en tejidos infectados (Hilf *et al.*, 1995), y a

que los tres genes actúan como supresores de silenciamiento en *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2004) y es probable que también lo hagan en cítricos, por lo que cabe pensar que su expresión será necesaria para mantener la infección. Sin embargo, la presencia en alguno de los aislados de un dRNA que co-migra con el sgRNA de p25, impidió la cuantificación de éste. A su vez, la eficiencia en la supresión del silenciamiento se evaluó i) estimando la acumulación normalizada de siRNAs derivados de CTV en las mismas combinaciones aislado/huésped, y ii) comparando la capacidad de supresión del silenciamiento de la proteína p23 de cada aislado en un ensayo de inducción/supresión del silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* que expresan GFP a partir de un transgén.

La hibridación molecular en formato Northern blot reflejó que las cinéticas de acumulación de sgRNAs en ND y CM eran similares, observándose una mayor cantidad de sgRNAs en el primer brote que a los 9 meses p.i. Estos resultados concuerdan con los datos de acumulación viral obtenidos mediante los ensayos de q-RT-PCR de los mismos extractos (Capítulo I, apartado 3.2, Tabla 1.3 y Fig. 1.8), en los que también se observó mayor carga viral al inicio de la infección que a los 9 meses p.i. En LM los niveles de acumulación de los sgRNAs en la primera brotación eran inferiores a los observados en ND y CM, sin embargo, a los 9 meses p.i., los niveles de sgRNAs en estos tres huéspedes fueron similares. Un análisis más detallado de la carga viral en el proceso de desarrollo del primer brote en plantas de LM, ND y NA inoculadas con T385 mostró que, mientras en LM la carga máxima se alcanzaba en una etapa muy temprana de la brotación (brote  $\leq 8$  cm), la acumulación viral en ND continuaba hasta el final de la brotación y en NA se prolongaba en brotaciones posteriores (ver Capítulo I). Estos resultados se podrían explicar por i) una mayor actividad replicativa del virus en LM en comparación con los demás huéspedes, ii) una mayor capacidad de movimiento viral célula a célula y/o a larga distancia en LM permitiendo así el establecimiento de una infección sistémica más rápida en dicho huésped, y/o iii) una activación más temprana de los mecanismos de silenciamiento génico mediado por RNA en LM gracias a una rápida acumulación de RNA viral en sus tejidos, explicando así la menor cantidad de sgRNAs virales observada en LM al final de la brotación. La estabilización de la acumulación viral observada en LM, ND y CM a los 9 meses p.i. (ver Capítulo I) se correlaciona con una estabilización de la actividad replicativa estimada en este capítulo por los niveles de

sgRNAs de *p20* y *p23*. Puesto que una vez estabilizada la infección la carga viral de T385 (y de otros aislados) en LM no fue más alta que en ND, la acumulación viral más rápida en LM habría que atribuirla a una mayor eficiencia de la replicación/movimiento viral en este huésped y no a un silenciamiento más intenso en ND. Esta replicación/movimiento más rápidos en LM podría ser debida en parte a una interacción más eficiente entre factores virales y del huésped.

La expresión ectópica de *p23* en plantas transgénicas de LM dio lugar a la expresión de síntomas foliares similares a los inducidos por la infección de CTV, y la intensidad de los mismos se correlacionaba con el nivel de acumulación de la proteína *p23*, pero no estaba asociada con la patogenicidad del virus del que procedía esta proteína (Ghorbel *et al.*, 2001; Faoaga *et al.*, 2005). Estos resultados sugerirían que las diferencias de patogenicidad entre los aislados utilizados en este trabajo podrían ser debidas a distintos niveles de acumulación de *p23*. En nuestro estudio, una vez establecida la infección no se observaron diferencias en la acumulación del sgRNA de *p23* en LM, CM y ND, lo que indicaría que este factor no es responsable de las diferencias en la sintomatología inducida por los distintos aislados en estos huéspedes. Durante el transcurso de esta tesis se realizaron experimentos de Western Blot utilizando anticuerpos policlonales de *p23* (López *et al.*, 2000). Sin embargo, el funcionamiento del antisuero con nuestros extractos de planta fue deficiente y no se pudo cuantificar la acumulación de esta proteína.

Antes de que se conociesen la expresión de los genes de CTV mediante sgRNAs y las funciones biológicas de *p23*, en algunos estudios basados en análisis de dsRNA en plantas infectadas (Dodds y Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1984) se observó una asociación entre la acumulación del sgRNA de *p23* y la virulencia del aislado (Dodds *et al.*, 1987b,c), mientras que esta asociación no resultó evidente en estudios similares con aislados de otras regiones (Moreno *et al.*, 1990). Estos estudios pusieron de manifiesto que el nivel de sgRNAs varía con los aislados de CTV, la especie infectada y la época del año, y que este nivel suele ser paralelo al de la carga viral, lo que apoya la idea de que la acumulación de sgRNAs es un buen indicador de la actividad replicativa del virus. También se observó que el nivel de sgRNAs en plantas de NA era mucho más bajo que en otros huéspedes como LM o ND (Dodds *et al.*, 1987b,c; Moreno *et al.*, 1990), si bien en estos estudios no se

efectuó un análisis de la acumulación de sgRNAs a distintos tiempos post-inoculación.

La cinética de acumulación de los sgRNAs virales en NA fue paralela a la de acumulación viral en dicho huésped (Capítulo I, apartado 3.2, Fig. 1.11) y distinta de la observada en los otros huéspedes cítricos. En la primera brotación sólo se detectó un nivel muy bajo de sgRNAs en plantas infectadas con el aislado T388 y no se detectaron en absoluto en las plantas infectadas con los demás aislados, indicando una actividad replicativa muy reducida en NA en la fase inicial de la infección. Esta actividad fue aumentando en brotaciones sucesivas y a los 2 años p.i. se detectaron los sgRNAs de todos los aislados estudiados. Estos resultados indican que la resistencia inicial a la acumulación viral de algunos aislados de CTV en NA observada en el capítulo anterior está asociada a una baja actividad replicativa, probablemente debida a factores del huésped implicados en el proceso del movimiento sistémico, ya que se ha observado que la replicación de CTV en protoplastos de NA es similar a la de otros huéspedes (Albiach-Martí, datos no publicados).

Hay que destacar que la acumulación de los sgRNAs de *p20* y *p23* en NA infectado con los aislados virulentos T388 y T318A, que inducen síntomas severos de SY en NA, fue mayor que la observada en los aislados T36 y T385, sugiriendo que su tasa de multiplicación es mayor. La acumulación de los sgRNAs de *p20* y *p23* en las plantas infectadas con el aislado T36, que induce SY menos intenso que T388 o T318A, fue mucho menor que la de los dos aislados virulentos y no se detectó hasta los 12 meses p.i., manteniéndose constante con el tiempo. Por último, con el aislado T385, que es asintomático en NA, sólo se pudo detectar la actividad replicativa a los 2 años p.i. Estos datos sugieren que NA debe poseer algún gen de resistencia que retrasa la multiplicación y/o movimiento de ciertos aislados de CTV, al menos en la fase inicial de la infección.

Los síntomas observados en plantas transgénicas de LM y de otras especies de cítricos que expresan *p23*, no se observaron en plantas transgénicas equivalentes de *N. benthamiana* o *N. tabacum* (Fagoaga *et al.*, 2005), lo que sugiere que dichos síntomas derivan de una interacción específica de *p23* con algún factor de los cítricos. Esta interacción podría ser diferente en NA y en otras especies como LM, ya que i) en contraste con la LM, la proteína *p23* apenas se detecta en plantas transgénicas de NA, aunque la intensidad de síntomas está asociada con el nivel de expresión de

mRNA del transgén, y ii) los síntomas foliares de las plantas transgénicas de NA (clorosis nervial y puntos cloróticos) no se observan en plantas normales de esta especie infectadas con CTV (Fagoaga *et al.*, 2005). Las plantas de NA infectadas con algunos aislados de CTV permanecen asintomáticas mientras que otras muestran el síndrome de SY. Recientemente se ha demostrado que el determinante de patogenicidad de SY en NA probablemente está localizado en *p23* y que la intensidad de síntomas no se correlaciona con la acumulación de proteína *p23* (Albiach-Martí *et al.*, 2009).

El silenciamiento mediado por RNA proporciona a la planta un eficaz mecanismo de defensa antiviral (Lemmetty *et al.*, 2008), siendo los siRNAs la huella molecular del mismo (Mlotshwa *et al.*, 2002). No obstante, la relación entre actividad de silenciamiento y nivel de acumulación de siRNAs debe tomarse con cautela en algunos casos, ya que los niveles de siRNAs derivados del virus se correlacionan con los niveles de RNA viral en las células infectadas (Qu y Morris, 2005). De esta forma, la abundancia de los siRNAs en un determinado huésped no es un indicador fiable de la intensidad del silenciamiento viral. Los siRNAs derivados del virus son más abundantes en presencia que en ausencia de los supresores del silenciamiento (Ratcliff *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 2000; Qu y Morris, 2002), ya que los mutantes defectivos de la proteína supresora se acumulan menos, confirmando que la acumulación de los siRNAs es proporcional a la carga viral alcanzada en las células infectadas. Los modelos matemáticos que describen los mecanismos de silenciamiento indican que éste se intensifica cuando aumenta la cantidad de dsRNA (Bergstrom *et al.*, 2003; Groenenboom *et al.*, 2005 y 2008), lo que apoyaría el incremento en el nivel de siRNAs cuando aumenta la carga viral. Por ello, para comparar mejor la actividad de silenciamiento inducida por diferentes aislados en los distintos huéspedes, en este trabajo se estimó un valor normalizado de la acumulación de siRNAs derivados de CTV en relación con la correspondiente carga viral.

En LM, ND y CM se observó i) que en general la mayor acumulación normalizada de siRNAs de CTV se correspondía con una carga viral más reducida (comparar Fig. 1.8 del Capítulo I y Fig. 2.12 del Capítulo II), lo que sugiere que las diferencias de acumulación de los distintos aislados en cada huésped podrían ser debidas a una eficiencia de silenciamiento distinta según el aislado, y ii) que la

acumulación normalizada de siRNAs a los 9 meses p.i. tendía a ser mayor que en la primera brotación, en correspondencia con un descenso en la carga viral, lo que sugiere un silenciamiento del virus por parte de la planta tras la invasión inicial. Esta invasión inicial de la planta ocurre con distinta velocidad según la especie huésped, siendo más rápida en LM, que alcanzó la máxima carga viral en una etapa temprana de la primera brotación, lo que podría explicar en parte las menores diferencias observadas en este huésped en los niveles de siRNAs de CTV al final de la primera brotación y a los 9 meses p.i.

La pauta de acumulación de los siRNAs de CTV en NA fue diferente de la observada en los otros huéspedes cítricos. Así, en la primera brotación sólo se detectaron siRNAs en las plantas infectadas con T388 y hubo que esperar a los 2 años p.i. para detectar siRNAs en las plantas infectadas con los demás aislados. A su vez, como se indicó en el Capítulo I, la máxima carga viral en este huésped se alcanzó a partir de los 2 años p.i. Ello sugiere que la activación del mecanismo de silenciamiento en NA requiere que la carga viral de CTV exceda de un nivel umbral. El aislado T388 es el que más se acumula en la primera brotación y superaría pronto este nivel umbral, permitiendo la detección de siRNAs en el primer brote. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Forrest *et al.*, (2004) en hongos, y Pal-Bhadra *et al.*, (2002) en *Drosophila* sp., en los que demuestran la existencia de una dosis umbral de dsRNA necesaria para activar el silenciamiento génico mediado por RNA. Asimismo, Tenllado *et al.* (2001), Robalino *et al.*, (2005) y Carbonell *et al.*, (2008), indicaron que el silenciamiento génico como respuesta a la infección viral era dosis-dependiente y la protección que se obtenía frente a virus o viroides infiltrando dsRNA específico aumentaba con la concentración de dsRNA introducido.

La ausencia de siRNAs de CTV en las plantas de NA inoculadas con los aislados T318A, T36 y T385 al inicio de la infección, apoya la idea de que la resistencia inicial del NA a la replicación y acumulación de estos aislados no sería debida a fenómenos relacionados con el silenciamiento, puesto que éste parece no estar activado en esa etapa de la infección, sino a una interacción menos eficiente entre factores virales y del huésped para el movimiento del virus. Esta resistencia inicial a la acumulación viral en NA fue observada también por Bernet *et al.* (2008).

El aislado T36 tuvo un comportamiento diferente al de los demás aislados en todos los huéspedes estudiados, ya que presentaba la menor carga viral y la mayor

acumulación normalizada de siRNAs. Ello sugiere que la activación del mecanismo de silenciamiento frente a T36 ocurriría a una concentración umbral más baja que frente a otros aislados, lo que dificultaría su acumulación posterior en los tejidos infectados. Las diferencias observadas entre NA y los otros huéspedes cítricos y, entre el aislado T36 y los otros 3 aislados de CTV concuerdan con las conclusiones de Groenenboom *et al.*, (2008), que indican que los parámetros del silenciamiento génico mediado por RNA son determinados por el huésped, y su intensidad depende de las características propias del virus.

En respuesta a la activación de los mecanismos de silenciamiento de la planta los virus expresan proteínas supresoras del silenciamiento génico para poder efectuar la invasión sistémica de la misma. Como ya se ha indicado CTV codifica tres proteínas (p25, p20 y p23) que actúan como supresores del silenciamiento en tabaco y *N. benthamiana* (Lu *et al.*, 2004). Aunque no hay pruebas directas de que las tres proteínas ejerzan esta misma función en cítricos, la observación de que p23 expresada ectópicamente en plantas transgénicas de LM da lugar a síntomas foliares similares a los causados por CTV (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005), y de que el determinante de patogenicidad del síndrome de SY se localiza en la región p23-3' NTR (Albiach-Martí *et al.*, 2009), apoyan la idea de que al menos p23 también es un supresor de silenciamiento en cítricos. El análisis filogenético del gen *p23* de los distintos aislados de CTV los separa en 3 grupos bien diferenciados: virulento (T318A y T388), asintomático (T385) y atípico (T36) (Sambade *et al.*, 2003), lo que está en concordancia con el hecho que p23 sea un determinante de patogenicidad en *Citrus spp.* (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005). Mientras las proteínas p23 de los aislados T318A y T388 son idénticas, la identidad aminoacídica de éstas con las de T385 y T36 es de 92 y 91%, respectivamente, y la de T36 con T385, es de 90.5% (Vives *et al.*, 1999; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006).

Para comprobar si el comportamiento diferencial de los aislados de CTV en distintos huéspedes, y en particular la menor acumulación viral de T36 en comparación con los otros aislados de CTV estudiados, podía asociarse con una capacidad distinta de p23 para suprimir el silenciamiento, se realizaron ensayos de supresión de las proteínas p23 de T36, T388/T318A y T385. De los distintos ensayos que se han propuesto para identificar proteínas supresoras de silenciamiento (Moissiard y Voinnet, 2004, Roth *et al.*, 2004, Qu y Morris, 2005 y Li y Ding, 2006), se

eligió el de expresión transitoria mediante co-infiltración de hojas de *N. benthamiana* 16c con dos cultivos de *Agrobacterium*, uno que contiene el gen *gfp* y otro que contiene el gen de la proteína candidata, por ser el más rápido y sencillo. En estos ensayos no se observaron diferencias significativas entre la capacidad supresora de las proteínas p23 de los distintos aislados de CTV, aunque sí entre éstas y la proteína p19 de TBSV o la proteína MP de CLB, utilizadas como control. Este resultado no nos permite atribuir las diferencias de carga viral entre aislados a una actividad supresora distinta de la proteína p23 de cada uno de ellos, si bien tampoco podemos excluir esta posibilidad, ya que la actividad supresora en *N. benthamiana* 16c y en un huésped cítrico podría no ser la misma. De hecho, la expresión ectópica de p23 en plantas transgénicas de cítricos da lugar a fenotipos aberrantes mientras que en *N. benthamiana* da lugar a un fenotipo normal (Fagoaga *et al.*, 2005). Más aún, los efectos de la expresión ectópica de p23 en cítricos tampoco coinciden totalmente con los inducidos por el virus, ya que i) plantas transgénicas de LM que expresaban el gen *p23* de un aislado asintomático, o de un aislado virulento, mostraban síntomas foliares indistinguibles, mientras que los síntomas inducidos por los respectivos aislados son muy diferentes, y ii) plantas transgénicas de NA que expresaban p23 mostraban clorosis nervial y puntos cloróticos (Fagoaga *et al.*, 2005), mientras que las plantas no transgénicas de NA inoculadas con CTV son asintomáticas (si el aislado es suave) o muestran el síndrome SY, pero nunca clorosis nervial o puntos cloróticos, pese a que el determinante de patogenicidad de SY se ha localizado en la región p23-3' NTR (Albiach-Martí *et al.*, 2009). Estos datos sugieren, por una parte, que el efecto de la proteína p23 expresada por el virus varía con la secuencia de ésta, y por otra, que el efecto de p23 podría variar según el tejido en que se exprese (CTV está restringido al floema, mientras que en las plantas transgénicas la expresión es constitutiva) y entre especies huésped (en LM y CM la mayoría de los aislados produce clorosis nervial, en ND sólo lo hacen los aislados más virulentos, mientras que en NA sólo algunos aislados virulentos inducen SY). A ello habría que añadir los potenciales efectos de las proteínas p20 y p25 sobre el silenciamiento en plantas de cítricos, que son aún más desconocidos.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo indican que la cinética de acumulación de los aislados de CTV es paralela a su actividad replicativa estimada en base a la acumulación de sgRNAs de *p20* y *p23*. En las especies más susceptibles

(ND, CM y LM) la mayor actividad replicativa y la máxima carga viral se detectan en la primera brotación, mientras que en NA, que presenta una resistencia inicial, la acumulación viral y la actividad replicativa aumentan progresivamente durante el transcurso de la infección. Asimismo, en ND, CM y LM el silenciamiento del virus por parte de la planta se produce tras la invasión inicial debido a que en estos huéspedes se alcanzan niveles de acumulación viral altos y se dispara el mecanismo de silenciamiento viral, mientras que en NA la activación de este mecanismo requiere superar un nivel umbral de carga viral, lo que sugiere que la resistencia inicial a la acumulación viral no es consecuencia del silenciamiento sino de una interacción menos eficiente entre factores virales y del NA necesarios para el movimiento de CTV. El comportamiento diferencial de los distintos aislados de CTV no pudo asociarse a una distinta capacidad supresora de sus proteínas p23, puesto que, al menos en *N. benthamiana*, las capacidades supresoras de éstas resultaron similares.





## **CAPÍTULO III**



## CAPÍTULO III. DISTRIBUCIÓN DE CTV EN EL HUÉSPED NARANJO AMARGO

### 1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se obtuvieron indicios de la existencia de una resistencia inicial a la replicación y acumulación de algunos aislados de CTV en naranjo amargo (NA), que desaparecía en el transcurso de la infección viral. Asimismo, los resultados sugerían la necesidad de alcanzar una carga viral mínima para activar el silenciamiento génico mediado por RNA como respuesta a la infección por CTV. En NA esta carga se lograba más lentamente que en otros huéspedes, y de hecho, al inicio de la infección sólo se detectaban siRNAs en las plantas inoculadas con uno de los cuatro aislados de CTV ensayados. Estos datos apuntaban a que la resistencia inicial del NA a la acumulación de algunas cepas de CTV no sería debida al mecanismo de silenciamiento sino a otras causas.

La infección sistémica del virus requiere dos procesos: el movimiento célula a célula vía plasmodesmos y el movimiento a larga distancia a través del sistema vascular (Hull, 1989). De este modo, una limitación en la capacidad de movimiento de CTV en NA podría explicar en parte la resistencia inicial observada. Asimismo, la acumulación viral y los procesos de silenciamiento en NA podrían ser diferentes dependiendo del tejido de la planta. Para examinar estas posibilidades en este capítulo se abordaron los siguientes objetivos:

- Evaluar la pauta de distribución y acumulación de CTV en distintos tejidos de naranjo amargo de semilla y estudiar la intensidad del silenciamiento viral en los mismos, estimando la acumulación de siRNAs derivados del virus.
- Determinar los efectos del patrón utilizado (resistente o tolerante a CTV) en la acumulación viral y en la intensidad del silenciamiento génico mediado por RNA en la copa de NA.
- Comparar la frecuencia de células infectadas en NA propagado sobre distintos patrones e inoculado con un clon infeccioso de CTV que expresa GFP (CTV9-GFPC3).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Huéspedes cítricos y aislados de CTV

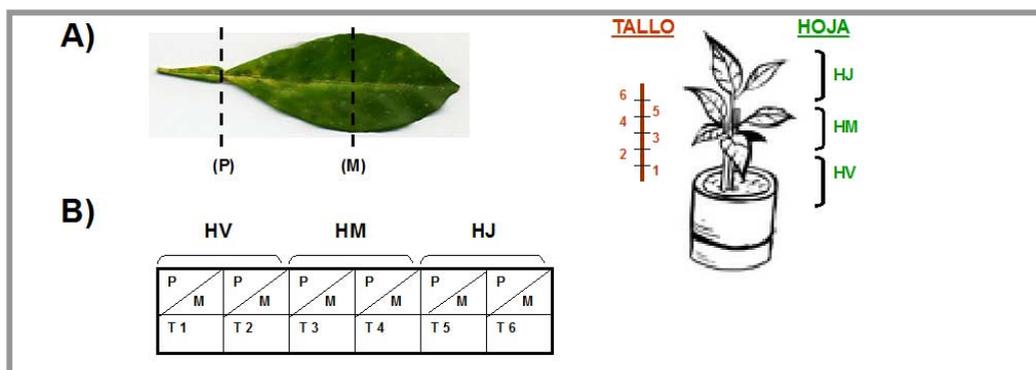
En los distintos experimentos se emplearon los aislados de CTV T388, T318A, T36 y T385 descritos en el Capítulo I, apartado 2.1. Como huéspedes cítricos se emplearon 25 plantas de NA de semilla, otras tantas de NA injertado sobre citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osbc. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] (NA/CC) o sobre NA (NA/NA), y 45 de NA propagado sobre naranjo dulce Pineapple (NA/ND). Una vez el brote de NA había alcanzado 5-8 mm de diámetro, cinco plantas de cada combinación se inocularon por injerto con cada uno de los aislados de CTV y las cinco restantes se dejaron como control negativo. En el caso de la combinación NA/ND, 20 plantas se inocularon en la variedad (NA\*/ND) y las otras 20 en el patrón (NA/ND\*), dejando las cinco restantes como control.

Para examinar la frecuencia de células infectadas en el tallo de NA propagado sobre distintos patrones, las plantas se inocularon a partir de ND infectado con una versión recombinante de CTV que expresa GFP. Este virus recombinante fue obtenido a partir del clon infeccioso CTV9 procedente del aislado T36 (Satyanarayana *et al.*, 1999; 2001) en el que se había insertado el gen *gfp* de la proteína fluorescente verde (CTV9-GFPC3) (Satyanarayana *et al.*, 2008), amablemente cedido por el Dr. William O. Dawson (University of Florida-CREC, Lake Alfred, FL, EUA). En nuestro laboratorio el clon CTV9-GFPC3 fue agroinfiltrado en *Nicotiana benthamiana* y sus viriones pasados a cítricos por la Dra. S. Ambrós. De estas plantas se obtuvo el inóculo para injertar las distintas combinaciones utilizadas.

### 2.2 Inmunoimpresión-ELISA

Las improntas de tejido se prepararon a partir de hoja vieja, hoja media, hoja joven y tallo de NA de semilla al cabo de 9 meses y de 3.5 años p.i. Las improntas se realizaron mediante corte transversal del material vegetal y aplicación de la sección fresca sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con tampón TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.3% (v/v) de Tween 20) con 0.1% (p/v) de BSA (albúmina de suero bovino, Roche) durante 30 min. Posteriormente, las membranas se incubaron en tampón TBST que contenía una mezcla 1:1 (v:v) de los anticuerpos monoclonales 3DFI y

3CA5 (Vela *et al.*, 1986) (INGENASA®) a una concentración de 0.25  $\mu\text{g/ml}$  durante 90 min a 37°C. A continuación se realizaron tres lavados de 15 min en tampón TBST y las membranas se volvieron a incubar en una dilución 1:20.000 de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma®) en tampón TBST a 37°C durante 90 min. Tras la incubación, se repitieron los 3 lavados con tampón TBST y las membranas se equilibraron en tampón sustrato (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5) durante 5 min. Para la detección colorimétrica de las muestras positivas se utilizó NBT (nitroblue tetrazolium, Roche) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, Roche) (Blake *et al.*, 1984). La formación de un precipitado púrpura característico (diformazan) en el floema de las secciones se visualizó con una lupa. Se realizaron improntas por duplicado a partir de 3 plantas inoculadas con cada aislado. Como controles se utilizaron plantas de ND y LM inoculadas con cada uno de los 4 aislados estudiados (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1 A)** Tipos de tejido utilizados en la inmunopresión: P y M indican las muestras de peciolo (P) y mitad de la hoja (M), respectivamente, tomadas de hoja joven (HJ), hoja media (HM) y hoja vieja (HV); Los cortes del tallo (T) se realizaron cada 3 cm. **B)** Esquema de la membrana de nitrocelulosa utilizada para cada planta de NA inoculada con el aislado de CTV.

### 2.3 Estimación de la acumulación viral mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR)

La extracción de RNAt y la detección y cuantificación del nº de moléculas de gRNA por ng de RNAt en extractos de corteza, brote, hoja y raíz de NA de semilla o de las distintas combinaciones patrón/variedad (NA/CC, NA/NA, NA\*/ND y NA/ND\*) se efectuó según se ha descrito en el Capítulo I, apartado 2.3.

#### **2.4 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV mediante hibridación molecular en formato Northern blot**

Para la extracción y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en los distintos tejidos de NA de semilla (corteza, brote y raíz) o en la corteza de NA propagado sobre distintos patrones se utilizó la metodología descrita en el Capítulo II, apartado 2.3.

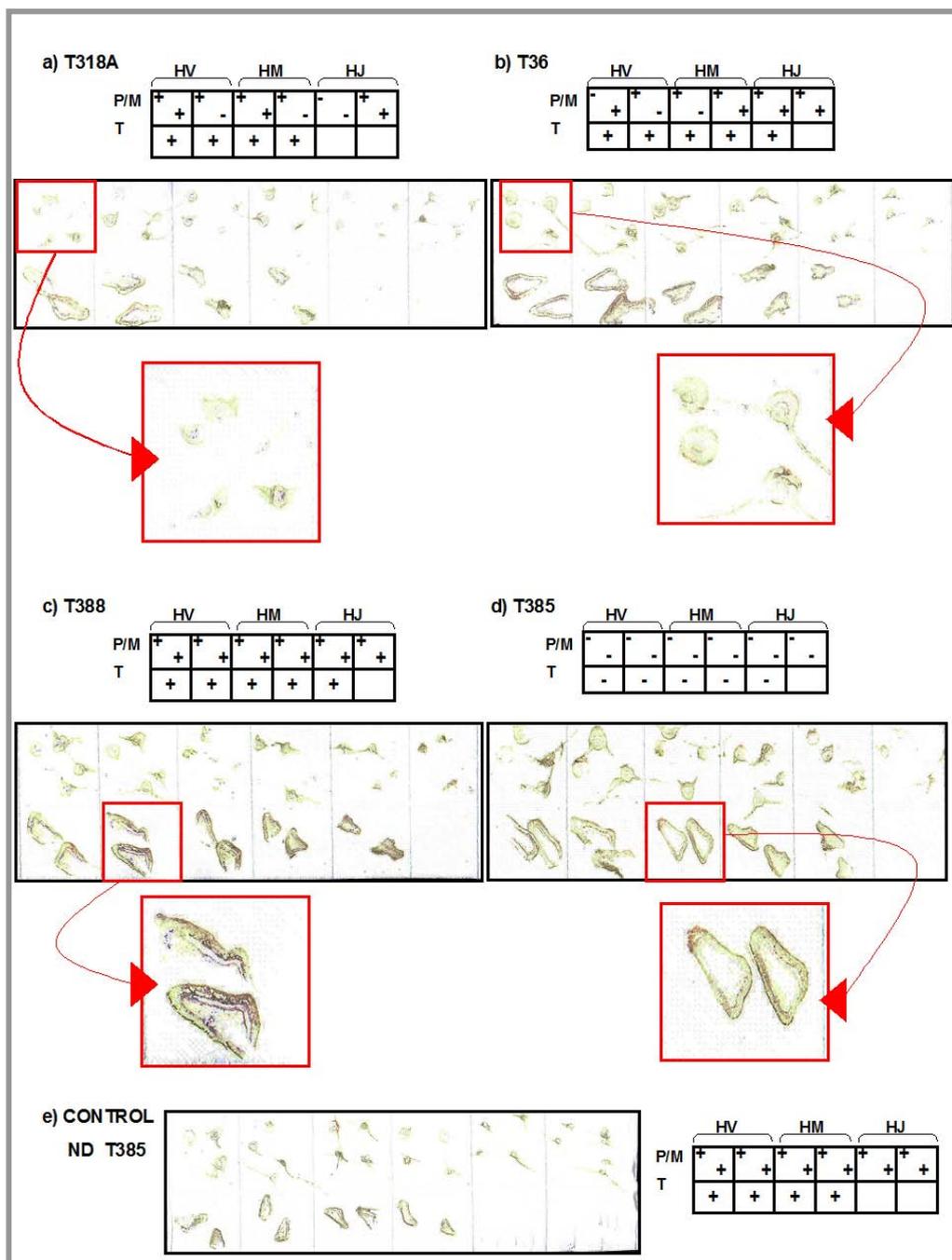
#### **2.5 Determinación de la frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones**

Para determinar la frecuencia relativa de células infectadas en las plantas de NA injertado sobre el patrón CC, NA y ND se inoculó el clon CTV9-GFPC3 (Satyanarayana *et al.*, 2008) en la variedad. Posteriormente, al final de la primera brotación y a los 15 meses p.i., se realizaron cortes longitudinales del tallo y se examinaron con una lupa Leica MZ16 utilizando un filtro para GFP. Las fotografías se obtuvieron con una cámara LEICA DFC490 utilizando el programa informático IM50 (Leica).

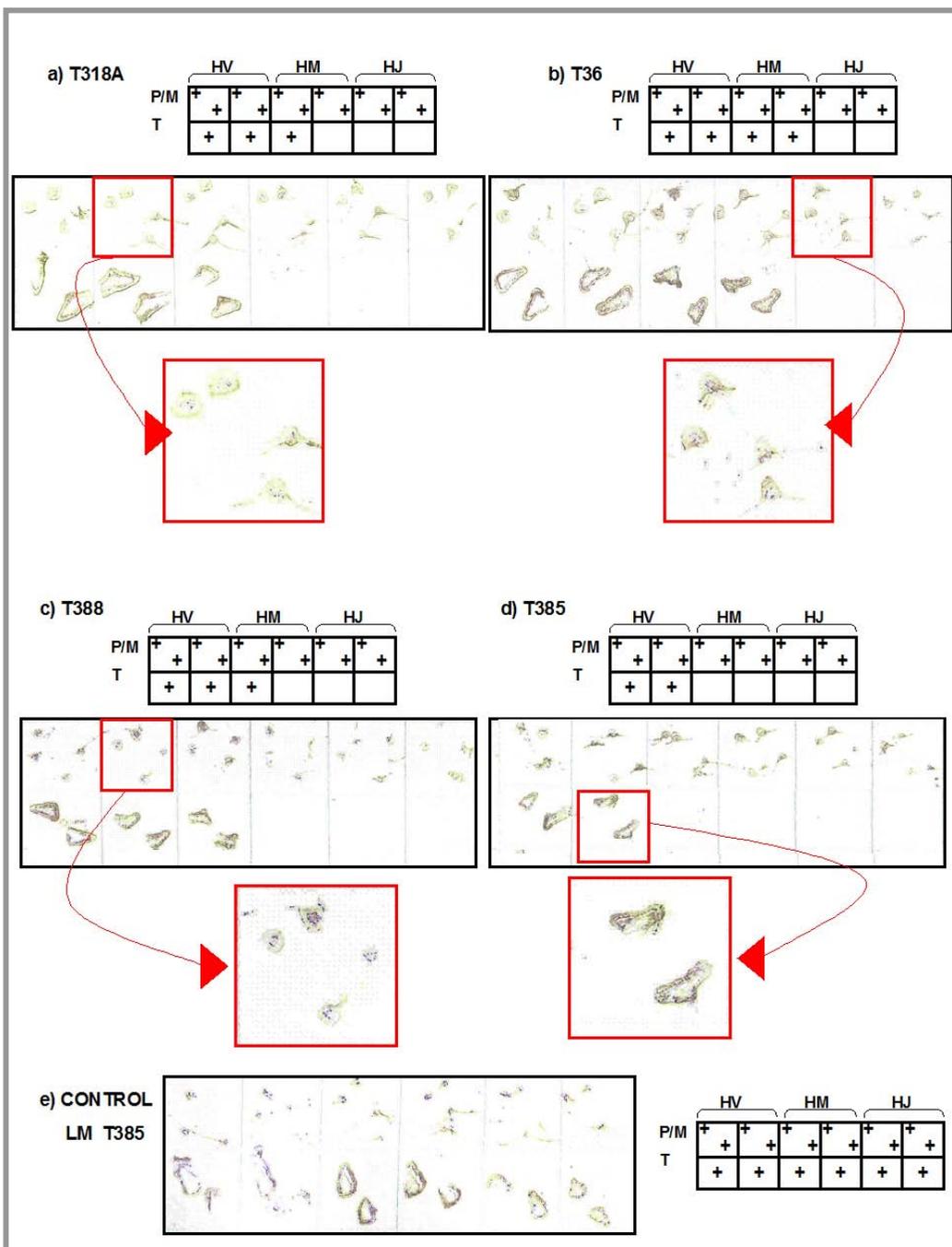
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Análisis de la distribución de CTV en naranjo amargo de semilla mediante inmunopresión-ELISA**

El análisis de la distribución de CTV en hoja vieja, media y joven y en distintas secciones del tallo en plantas de NA a los 9 meses p.i. (Fig. 3.2) mostró diferencias entre los aislados. El aislado T388 presentaba una distribución generalizada en toda la planta, los aislados T318A y T36 presentaban distribución generalizada en los tallos e irregular en las hojas, mientras que el aislado T385 no se detectó en ninguna de las improntas de los distintos tejidos analizados. En contraposición a los resultados obtenidos en NA, las improntas realizadas con tejido de ND inoculado con cada uno de los aislados (en la Fig. 3.2.e se muestra sólo la correspondiente a T385) revelaron una distribución homogénea en este huésped para todos los aislados.



**Fig.3.2** Imprints de distintos tejidos de naranjo amargo (NA) inoculado con los aislados de CTV **a)** T318A, **b)** T36, **c)** T388 y **d)** T385 realizadas a los 9 meses p.i. **e)** Control naranjo dulce Pineapple (ND) inoculado con el aislado T385 a los 9 meses p.i.

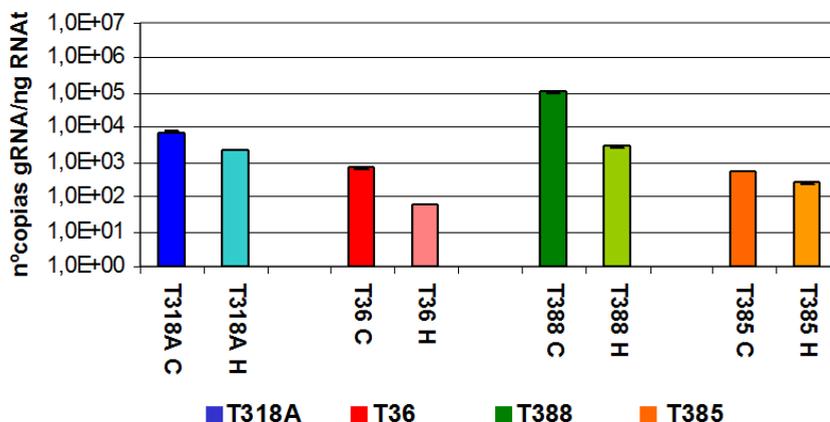


**Fig.3.3** Imprintas de distintos tejidos de naranjo amargo (NA) inoculado con los aislados **a)** T318A, **b)** T36, **c)** T388 y **d)** T385 realizadas a los 3.5 años p.i. **e)** Control lima Mexicana (LM) inoculada con el aislado T385 a los 3.5 años p.i.

Cuando el ensayo se repitió a los 3.5 años p.i. se detectó CTV en todas las muestras, indicando una distribución generalizada de todos los aislados de CTV en NA (Fig. 3.3). Incluso el aislado T385, que resultó indetectable a los 9 meses p.i. presentó una distribución similar a la del control LM (Fig. 3.3, d y e). Estos resultados confirman la restricción inicial del NA a la acumulación de T385 y la superación de la misma durante el curso de la infección.

### 3.2 Acumulación de CTV en los distintos tejidos de naranjo amargo de semilla

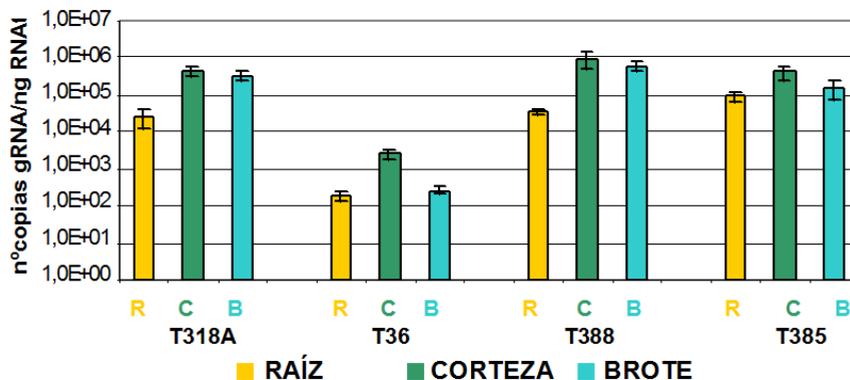
La carga viral estimada mediante q-RT-PCR en la primera brotación de plantas de NA inoculadas con cada uno de los aislados de CTV fue superior en corteza que en hojas totalmente expandidas (Fig. 3.4). De nuevo la mayor carga viral correspondió al aislado T388, confirmando los datos de capítulos anteriores.



**Fig. 3.4** Carga viral alcanzada en extractos de corteza (C, color oscuro) y hoja (H, color claro) de la primera brotación de naranjo amargo de semilla infectado con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385.

Para examinar la distribución de CTV en distintos tejidos de NA, una vez vencida la resistencia inicial, se estimó mediante q-RT-PCR la carga viral en extractos de raíz, corteza y brote joven de NA a los 2 años p.i. (Fig. 3.5). En todos los casos la menor acumulación viral se observó en la raíz. Sorprendentemente, el aislado que alcanzaba una mayor carga viral en este tejido era T385 (Fig. 3.5). Dado que este aislado presentaba una acumulación en corteza más lenta que los demás, este resultado sugería la posibilidad de que la raíz pudiese actuar como reservorio viral de este genotipo. La acumulación viral en brote y corteza fue similar en T318A, T388 y T385, pero no en el aislado T36, que presentó una carga viral en brote menor que en

corteza y similar a la de la raíz (Fig. 3.5). Este aislado fue el que presentó menor acumulación viral en todos los tejidos analizados (Fig. 3.5), apoyando los datos obtenidos en capítulos anteriores.



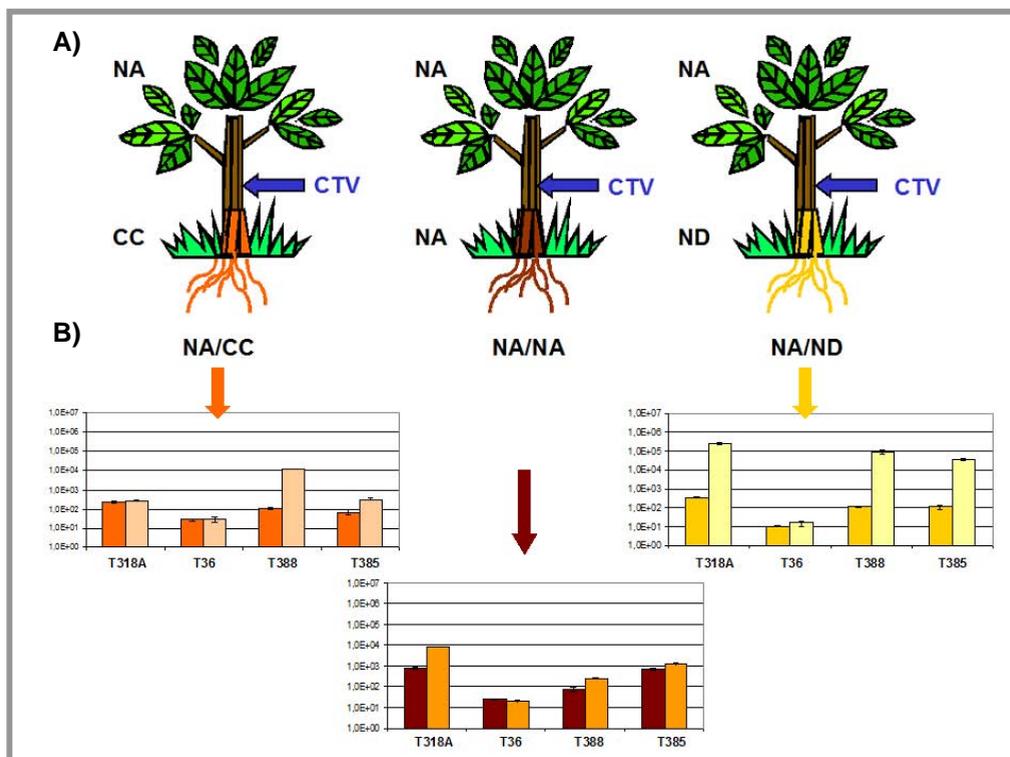
**Fig. 3.5** Acumulación viral de los cuatro aislados de CTV en distintos tejidos de NA de semilla: raíz (R), corteza (C) y brote (B) a los 2 años p.i.

### 3.3 Acumulación de CTV en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones

La elevada carga viral del aislado T385 en raíz de NA sugería la posibilidad de que este tejido pudiese actuar como reservorio viral. Para evaluar la posible influencia del patrón en la acumulación de CTV en la variedad NA se inocularon los cuatro aislados de CTV en plantas de NA propagado sobre citrange Carrizo (NA/CC), un patrón resistente a CTV, sobre naranjo dulce (NA/ND), un huésped susceptible que generalmente permite una alta carga viral, y sobre el propio NA (NA/NA) como control (Fig. 3.6 A). La estimación de la acumulación viral en la raíz y en la copa se efectuó mediante q-RT-PCR.

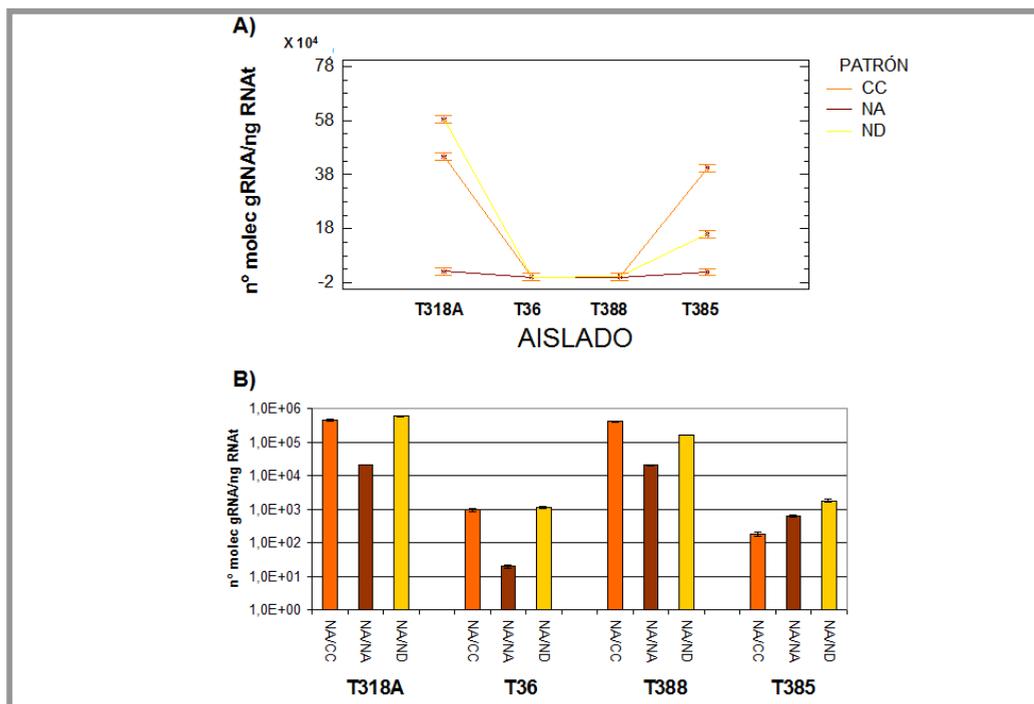
En primer lugar se cuantificó la carga viral alcanzada en raíz a las 3 y 6 semanas p.i. (Fig. 3.6 B). En general, en este período se observó un aumento de la acumulación viral variable con la combinación patrón/variedad y con la cepa de CTV. En el patrón CC se observó un incremento acentuado de la carga viral de T388 y un aumento moderado de T385, mientras que la carga viral de T318A y T36 permaneció esencialmente invariable (Fig. 3.6 B). En el patrón ND se observó un incremento importante del título viral de todos los aislados excepto T36 que mostró un incremento mínimo (Fig. 3.6 B). El aumento de la carga viral en el patrón NA fue relativamente modesto en T318A, T388 y T385 e indetectable en T36 (Fig. 3.6.B). La acumulación

viral en raíz más alta a las 6 semanas p.i. se observó en ND, seguido de NA y CC, si bien el título de T388 fue algo mayor en CC que en NA y el de T36 fue similar en los tres patrones.



**Fig. 3.6 A)** Inoculaciones efectuadas para analizar el efecto del patrón en la acumulación de CTV en NA. Yemas de NA se propagaron sobre citrange Carrizo (NA/CC, naranja), naranjo amargo (NA/NA, marrón) y naranjo dulce Pineapple (NA/ND, amarillo). La flecha azul indica la inoculación de CTV en la variedad. **B)** Evolución temporal de la acumulación de los aislados T318A, T36, T388 y T385 de CTV en la raíz del patrón a las 3 semanas (color oscuro) y a las 6 semanas p.i. (color claro).

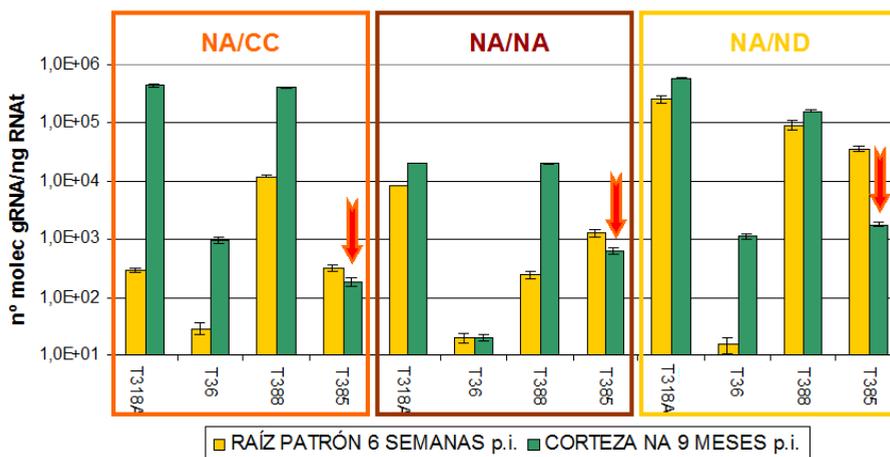
A continuación se estimó mediante q-RT-PCR la acumulación viral en la corteza de la copa de NA de las mismas plantas a los 9 meses p.i. El análisis de la varianza mediante un *Multifactor ANOVA* (paquete informático STATGRAPHICS Plus 5.1) indicó que existía una acumulación diferencial en la corteza del NA en función del patrón. Así, en la figura 3.7.A se observa que la acumulación viral en la corteza de NA varía de forma similar entre aislados en las plantas propagadas sobre CC y ND pero de forma diferente en las propagadas sobre NA.



**Fig. 3.7 A)** Efecto de la interacción patrón aislado en la acumulación de CTV en corteza del naranjo amargo (NA) a los 9 meses p.i., detectado mediante análisis de la varianza *Multifactor* ANOVA. Los niveles del factor aislado se representan en el eje de abcisas, y para cada uno de ellos se representan las medias de la variable dependiente (carga viral) en cada uno de los niveles del factor patrón (líneas de color). El distinto comportamiento de las líneas resultantes indica la existencia de interacción. **B)** Acumulación viral de los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 en la copa de naranjo amargo propagado sobre los patrones citrange Carrizo (NA/CC, naranja), naranjo amargo (NA/NA, marrón) y naranjo dulce Pineapple (NA/ND, amarillo) a los 9 meses p.i.

Los aislados T318A, T388 y T36 presentaron una mayor acumulación viral en la corteza de NA en las combinaciones NA/CC y NA/ND e inferior en la combinación NA/NA, mientras que las plantas infectadas con el aislado T385 presentaron la acumulación más baja en NA/CC y la más alta en NA/ND (Fig. 3.7 B).

Al comparar la acumulación viral en la raíz del patrón a las 6 semanas p.i. y en la corteza de la variedad a los 9 meses p.i. se observó que la acumulación de los aislados T318A, T36 y T388 era generalmente mayor en corteza, mientras que la del aislado T385 era mayor en raíz en cualquiera de las combinaciones (Fig. 3.8).



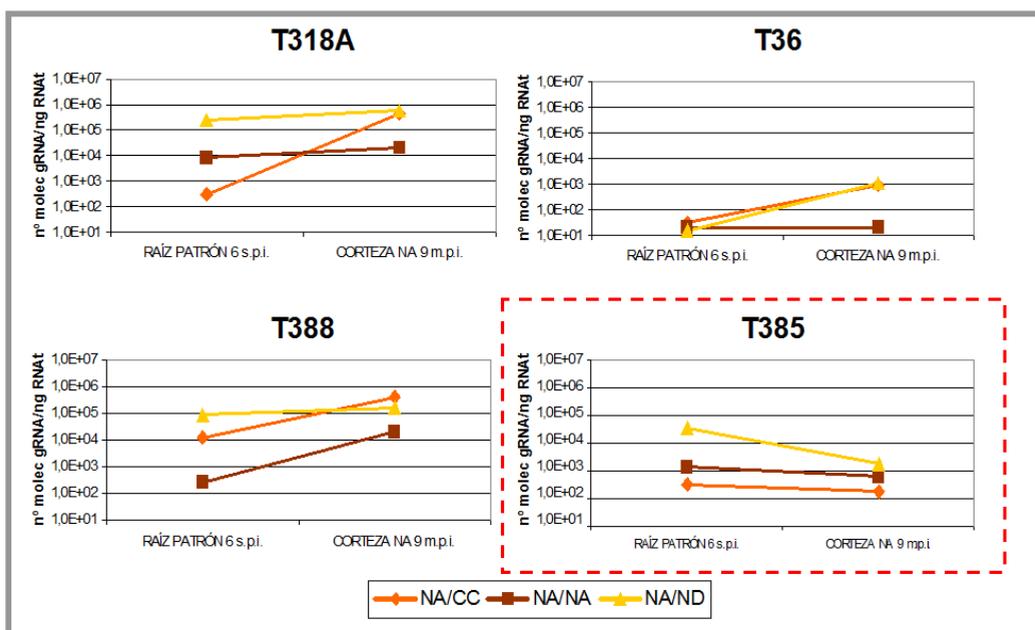
**Fig. 3.8** Comparación de la acumulación viral de los 4 aislados de CTV en la raíz del patrón a las 6 semanas p.i. (amarillo) y la corteza de naranjo amargo (NA) a los 9 meses p.i. (verde) alcanzada en las distintas combinaciones: naranjo amargo propagado sobre citrange Carrizo (NA/CC), NA propagado sobre NA (NA/NA) y NA propagado sobre naranjo dulce Pineapple (NA/ND). Se señala con una flecha roja la menor acumulación observada para el aislado T385 en la corteza de NA en todas las combinaciones.

En la figura 3.9 se ilustra mejor el distinto comportamiento en las pautas de acumulación en la raíz del patrón y en la corteza del NA de los distintos aislados. En las plantas inoculadas con los aislados T318A, T36 y T388 la carga viral en la corteza del NA a los 9 meses p.i. i) es igual o superior a la observada en la raíz del patrón a las 6 semanas p.i., y ii) no parece depender de ésta (p.e. comparar cargas virales de T318A o T388 en NA/ND y NA/CC). Por el contrario, en las plantas inoculadas con T385 la carga viral en la corteza de NA a los 9 meses p.i. continúa siendo inferior a la detectada en raíz a las 6 semanas p.i. y ambas parecen asociadas.

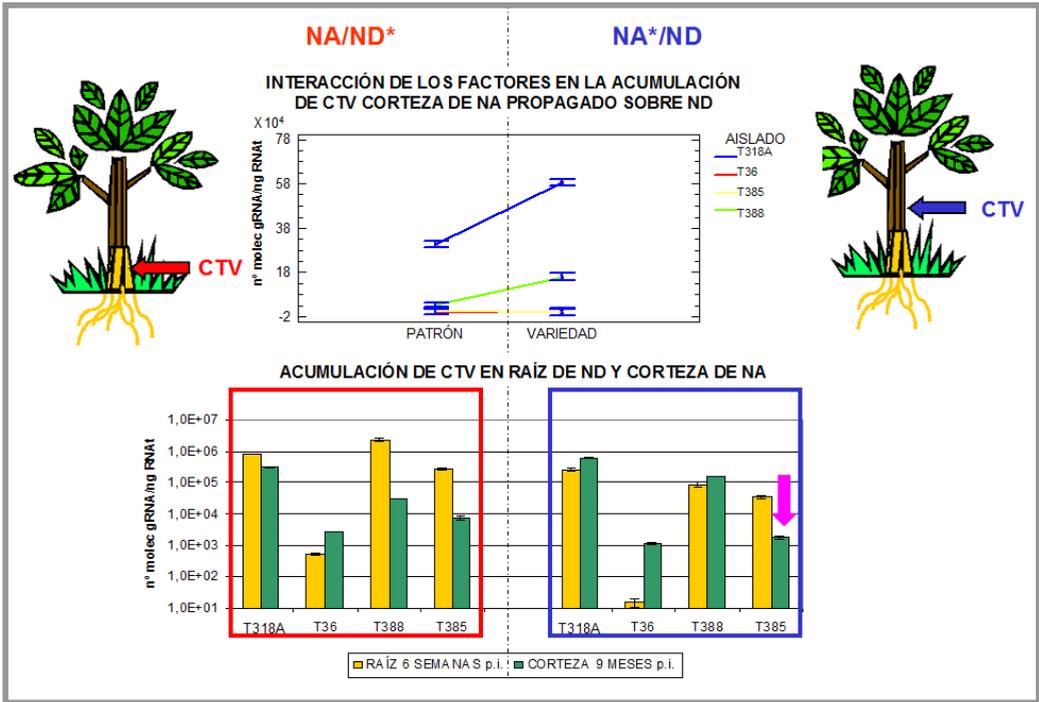
Finalmente, en las plantas de NA propagadas sobre el patrón susceptible ND, se evaluó si la acumulación viral en la raíz y en la corteza de la copa eran diferentes en plantas inoculadas en la copa (NA\*/ND) y en plantas similares inoculadas sobre el patrón (NA/ND\*) (Fig. 3.10).

El análisis de la varianza *Multifactor* ANOVA indicó que existían diferencias significativas en la carga viral en función del sitio de inoculación de CTV (Fig. 3.10). Así, la acumulación viral de todos los aislados en la raíz a las 6 semanas p.i. fue superior cuando la inoculación se hizo en el patrón que cuando se hizo en la variedad. En cuanto a la acumulación en la corteza de la copa se detectó una interacción entre el factor sitio de inoculación y el factor aislado (Fig. 3.10, gráfica superior): mientras la carga viral de los aislados T318A y T388 en la corteza de NA

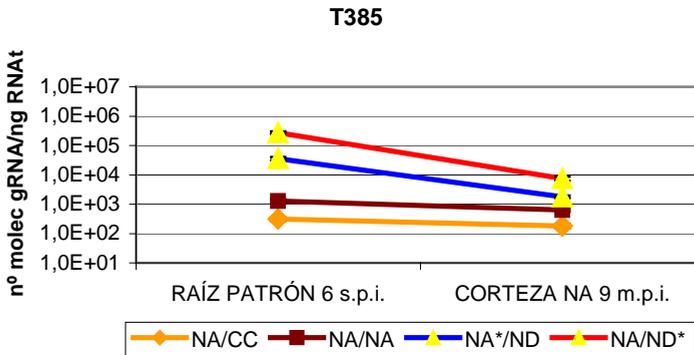
era mayor en las plantas inoculadas en la variedad, la de los aislados T36 y T385 fue más alta en las plantas inoculadas en el patrón. De nuevo se observó que la carga viral de T385 en la corteza a los 9 meses p.i. aparecía asociada a la carga viral en la raíz a las 6 semanas p.i. (Fig. 3.11). Esta asociación y el hecho de que T385 fuese el único aislado que presentaba mayor acumulación en raíz a las 6 semanas p.i. que en la corteza a los 9 meses p.i. sugiere que para este aislado la raíz podría actuar como reservorio para la infección progresiva de la copa de NA.



**Fig. 3.9** Acumulación diferencial del gRNA de los aislados de CTV en la raíz del patrón y la corteza de naranjo amargo (NA) en las combinaciones naranjo amargo/citrango Carrizo (NA/CC, naranja), naranjo amargo/naranjo amargo (NA/NA, marrón), naranjo amargo/naranjo dulce Pineapple (NA/ND, ocre). Se resalta en punteado rojo la actuación de la raíz como reservorio viral para el aislado T385.



**Fig. 3.10** Acumulación de CTV en naranjo amargo propagado sobre naranjo dulce Pineapple (NA/ND) en función del sitio de inoculación. A la derecha se indican los valores de acumulación viral en las plantas inoculadas en la variedad NA (NA\*/ND, azul) y en la parte izquierda los de las plantas inoculadas en el patrón (NA/ND\*, rojo). La gráfica superior representa el efecto de la interacción entre el factor lugar de inoculación y el factor aislado en la acumulación viral en la corteza de NA a los 9 meses p.i (análisis *Multifactor ANOVA*). Las dos gráficas inferiores muestran la comparación entre la acumulación viral en raíz a las 6 semanas p.i. (amarillo) y en corteza de NA a los 9 meses p.i. (verde). La flecha rosa resalta la menor acumulación observada en corteza de NA cuando el aislado T385 es injertado en la variedad.



**Fig. 3.11** Comparación de la carga viral del aislado T385 en la raíz (a las 6 semanas p.i.) y en la corteza de la copa (a los 9 meses p.i.) en plantas de naranjo amargo propagadas sobre patrón citrange Carrizo (NA/CC, naranja), naranjo amargo (NA/NA, marrón) y naranjo dulce Pineapple, estas últimas inoculadas en la variedad (NA\*/ND, azul), o en el patrón (NA/ND\*, rojo).

Estos datos indican que i) existe una acumulación viral diferencial en la raíz del patrón, así el patrón ND es el que presenta una mayor carga viral en este tejido; ii) todos los aislados a excepción del aislado T385 presentan una mayor acumulación en corteza que en raíz; iii) para los aislados T318A, T36 y T388 la carga viral en corteza de NA no depende de la acumulación viral en la raíz, de modo que independientemente del uso de un patrón tolerante o uno resistente la acumulación viral en la copa de NA es similar; iv) para el aislado T385, sin embargo, sí influye el patrón utilizado, y a mayor carga viral alcanzada en raíz, es mayor el título viral obtenido en corteza de NA, confirmando que para este aislado la raíz actuaría como reservorio viral.

### **3.4 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en distintos tejidos de naranjo amargo de semilla**

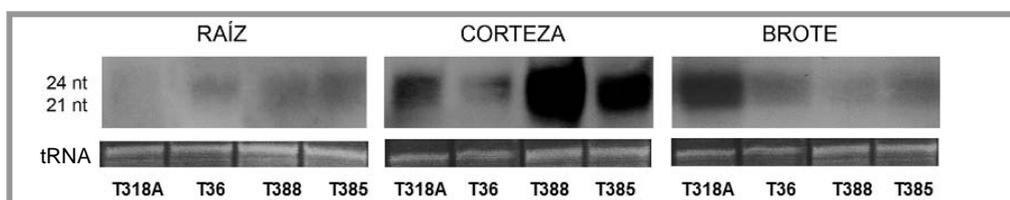
En el capítulo anterior se observó que, en contraste con otras especies huésped, la presencia de siRNAs en la corteza del NA sólo era detectable cuando se alcanzaba una carga viral mínima, normalmente a los 2 años p.i. Para examinar la intensidad del silenciamiento en distintos tejidos de NA, se analizaron y cuantificaron los siRNAs específicos de CTV presentes en extractos de brote, raíz y corteza a los 2 años p.i. (Fig. 3.12). Al igual que en el Capítulo II, apartado 3.2, en cada gel se introdujeron diluciones seriadas de un control positivo para disponer de una recta de calibración que permitiese comparar la intensidad de las bandas de siRNAs acotadas en los distintos ensayos mediante el paquete informático Multi Gauge V3.0. En todos los tejidos analizados, la acumulación de siRNAs fue proporcional a la carga viral (Fig. 3.12). Por este motivo y con el fin de comparar el comportamiento de los 4 aislados de CTV en los distintos tejidos se utilizaron los valores normalizados de siRNAs que se calcularon dividiendo la cantidad de estos por el nº de moléculas de gRNA detectado en el mismo extracto (Tabla 3.1).

Los valores normalizados de siRNAs en los distintos tejidos fueron variables para los diferentes aislados de CTV (Tabla 3.1 y Fig. 3.13), indicando que las pautas de silenciamiento de cada uno de ellos dentro de la planta podría ser ligeramente distinta. Así, mientras las plantas infectadas con T318A mostraron niveles similares de siRNAs específicos en los 3 tejidos estudiados, las plantas inoculadas con el aislado T36 mostraron niveles similares en brote y raíz y menor acumulación relativa

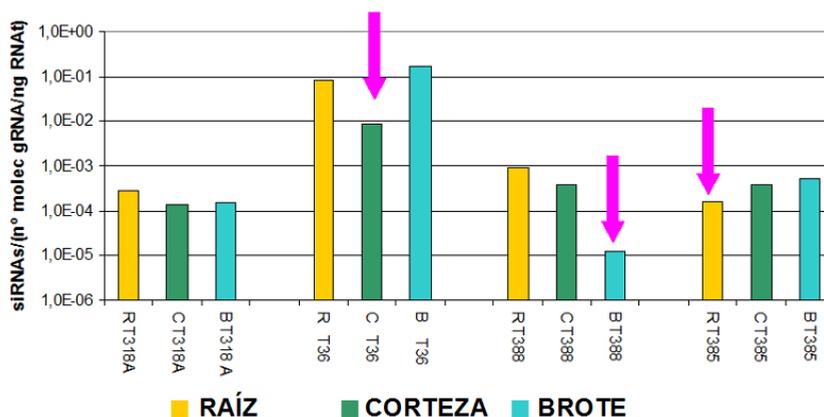
en corteza, las infectadas con T388 presentaron niveles similares en raíz y corteza y menor acumulación relativa en brote, y las infectadas con T385 presentaron niveles similares en brote y corteza y menor acumulación relativa en raíz. Al igual que en otros huéspedes la mayor acumulación relativa de siRNAs en distintos tejidos de NA se observó en las plantas inoculadas con el aislado T36.

**Tabla 3.1** Nivel de acumulación y valores normalizados de los siRNAs presentes en raíz, corteza y brote de plantas de NA inoculadas con cuatro aislados diferentes de CTV a los 2 años p.i.

	nº molec gRNA/ng RNAt	siRNAs	siRNAs/ (nºmolec gRNA/ng RNAt)
<b>RAÍZ T318A</b>	4,3E+04	12	2,8E-04
<b>CORTEZA T318A</b>	2,6E+05	36	1,4E-04
<b>BROTE T318A</b>	4,5E+05	70	1,6E-04
<b>RAÍZ T36</b>	2,5E+02	21	8,6E-02
<b>CORTEZA T36</b>	3,3E+03	29	8,9E-03
<b>BROTE T36</b>	2,3E+02	40	1,8E-01
<b>RAÍZ T388</b>	2,7E+04	25	9,1E-04
<b>CORTEZA T388</b>	3,2E+05	125	3,9E-04
<b>BROTE T388</b>	7,8E+05	10	1,3E-05
<b>RAÍZ T385</b>	1,2E+05	20	1,6E-04
<b>CORTEZA T385</b>	1,8E+05	70	3,9E-04
<b>BROTE T385</b>	4,8E+04	25	5,2E-04



**Fig. 3.12.** Hibridación molecular tipo Northern blot de extractos enriquecidos en siRNA de raíz, corteza y brote de plantas de naranjo amargo (NA) de semilla inoculadas con cuatro aislados diferentes de CTV (T318A, T36, T388 y T385) a los 2 años p.i.



**Fig. 3.13** Valores normalizados de siRNAs derivados de CTV en raíz (R), corteza (C) y brote (B) de plantas de naranjo amargo (NA) de semilla infectadas con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 a los 2 años p.i. Las flechas rosas indican tejidos con menor acumulación relativa de siRNAs.

### 3.5 Detección y cuantificación de los siRNAs derivados de CTV presentes en corteza de naranjo amargo propagado sobre distintos patrones

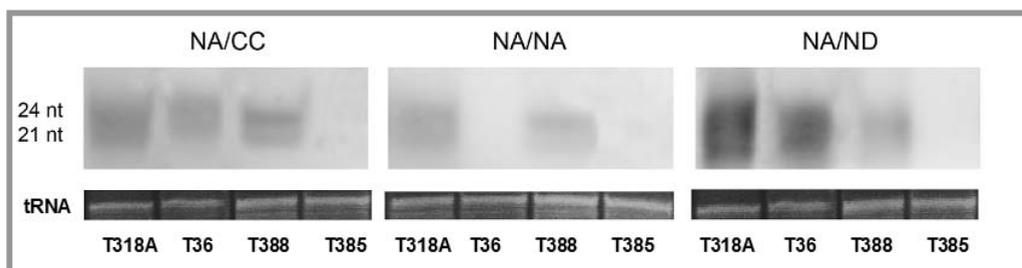
Los resultados mostrados en el apartado 3.3 indicaron que existían diferencias en la acumulación viral en corteza de NA en función del patrón donde estaba injertado y del sitio de inoculación (patrón o variedad) del aislado. Para ver si el patrón y el lugar de inoculación de CTV también afectaban al mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA y por lo tanto a la producción de los siRNAs, se estimó la acumulación normalizada de siRNAs en la corteza del NA de las combinaciones NA/CC, NA/NA, NA\*/ND y NA/ND\*.

Inicialmente se evaluó la influencia del patrón en la producción de siRNAs en la corteza de NA a los 9 meses p.i. (Tabla 3.2 y Fig. 3.14). Al igual que en las plantas de semilla de NA (Capítulo II), no se detectaron siRNAs de T385 en ninguna de las combinaciones variedad/patrón inoculadas, y tampoco se detectaron siRNAs de T36 en NA/NA, confirmando así la aparente necesidad de una carga viral mínima para la detección de siRNAs en tejidos infectados. Por otra parte, una vez alcanzada esta carga viral mínima, el nivel de siRNAs en la copa de NA fue algo mayor en la combinación NA/NA que en las otras (Fig. 3.15). Una vez más la acumulación relativa de siRNAs de T36 fue mayor que la de los otros aislados en las mismas combinaciones (Fig. 3.15).

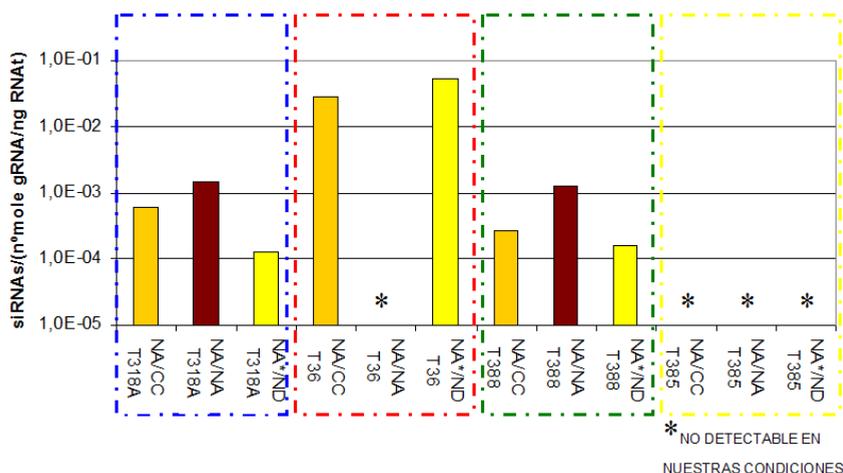
**Tabla 3.2.** Nivel de acumulación y valores normalizados de los siRNAs en corteza de plantas de NA propagado sobre citrange Carrizo (NA/CC), naranjo amargo (NA/NA) y naranjo dulce Pineapple (NA/ND) infectadas con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 a los 9 meses p.i.

	n° molec gRNA/ng RNAt	siRNAs	siRNAs/(n°molec gRNA/ng RNAt)
NA/CC T318A	4,2E+04	25	6,0E-04
NA/CC T36	9,5E+02	26	2,7E-02
NA/CC T388	1,1E+05	30	2,7E-04
NA/CC T385	1,8E+02	-	
NA/NA T318A	2,1E+04	30	1,4E-03
NA/NA T36	2,0E+01	-	
NA/NA T388	2,0E+04	25	1,2E-03
NA/NA T385	6,3E+02	-	
NA*/ND T318A	5,9E+05	75	1,3E-04
NA*/ND T36	1,1E+03	60	5,3E-02
NA*/ND T388	1,6E+05	25	1,6E-04
NA*/ND T385	1,8E+03	-	
NA/ND* T318A	3,0E+05	15	4,9E-05
NA/ND* 36	2,8E+03	15	5,4E-03
NA/ND* T388	3,0E+04	15	4,9E-04
NA/ND* T385	7,5E+03	-	

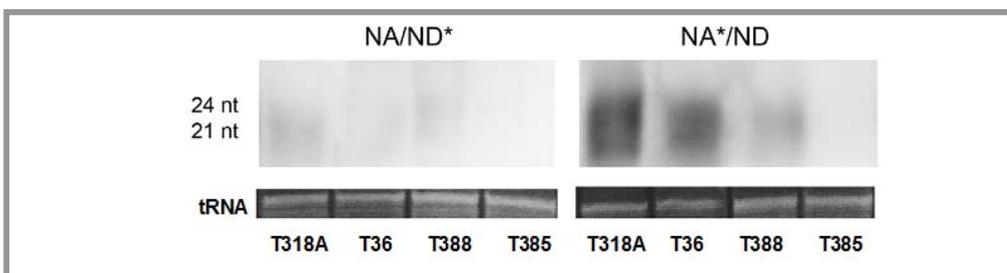
NA\*/ND, inoculadas en la variedad; NA/ND\*, inoculadas en el patrón  
- no se detectó en nuestras condiciones



**Fig. 3.14.** Hibridación molecular tipo Northern blot de extractos enriquecidos en siRNA de corteza de naranjo amargo (NA) propagado sobre citrange Carrizo (NA/CC), naranjo amargo (NA/NA) y naranjo dulce Pineapple (NA/ND) infectadas con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385, a los 9 meses p.i.



**Fig. 3.15** Valores normalizados de los siRNAs derivados de CTV en la corteza de plantas de naranjo amargo (NA) propagado sobre citrange Carrizo (NA/CC, naranja), naranjo amargo (NA/NA, marrón) y naranjo dulce Pineapple (NA/ND, amarillo) infectadas con los aislados de CTV T318A (punteado azul), T36 (rojo), T388 (verde) y T385 (amarillo) a los 9 meses p.i.. Se indica con un asterisco la no detección de siRNAs en nuestras condiciones.

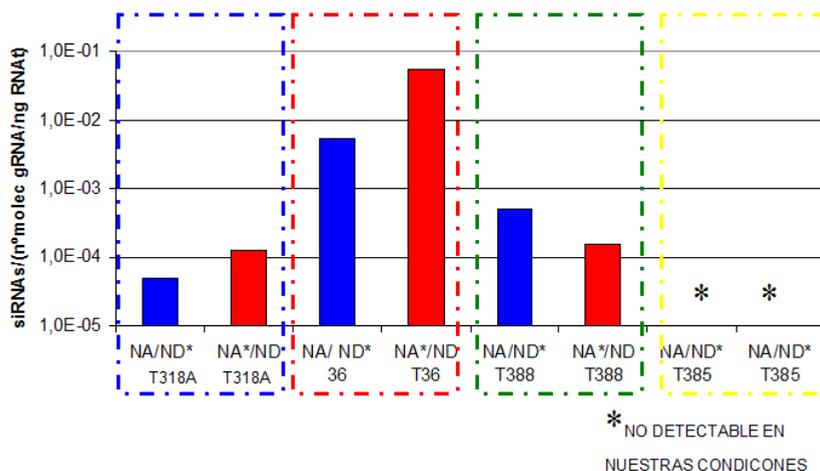


**Fig. 3.16.** Hibridación molecular tipo Northern blot de extractos enriquecidos en siRNA de corteza de naranjo amargo propagado sobre naranjo dulce Pineapple (NA/ND) e inoculado con los aislados de CTV T318A, T36, T388 y T385 en el patrón (NA/ND\*) o en la variedad (NA\*/ND) a los 9 meses p.i..

A continuación se evaluó en la combinación NA/ND la influencia del sitio de inoculación de CTV [en el patrón (NA/ND\*) o en la variedad (NA\*/ND)] en la producción de siRNAs en la corteza del NA (Fig. 3.16).

El análisis de los valores normalizados de siRNAs en la corteza del NA (Tabla 3.2 y Fig. 3.17) indicó que la intensidad del silenciamiento génico mediado por RNA varía en función del sitio de inoculación y del aislado de CTV. Así, la acumulación relativa de siRNAs en las plantas infectadas con T318A y con T36 fue mayor cuando la inoculación se hizo en la variedad que cuando se hizo en el patrón, pese a que en el caso de T318A la carga viral que se alcanzó en ambas modalidades de inoculación

fue similar, y en el caso de T36 fue ligeramente superior en las plantas inoculadas en el patrón. Por el contrario, en plantas inoculadas con T388 la acumulación de siRNAs fue mayor cuando la inoculación se hizo en el patrón, acompañada de una menor carga viral. Por último, en ninguna de las plantas inoculadas con T385, en cualquiera de las modalidades de inoculación, se detectaron siRNAs a los 9 meses p.i., confirmando la necesidad de una carga viral mínima para alcanzar niveles detectables de siRNA.

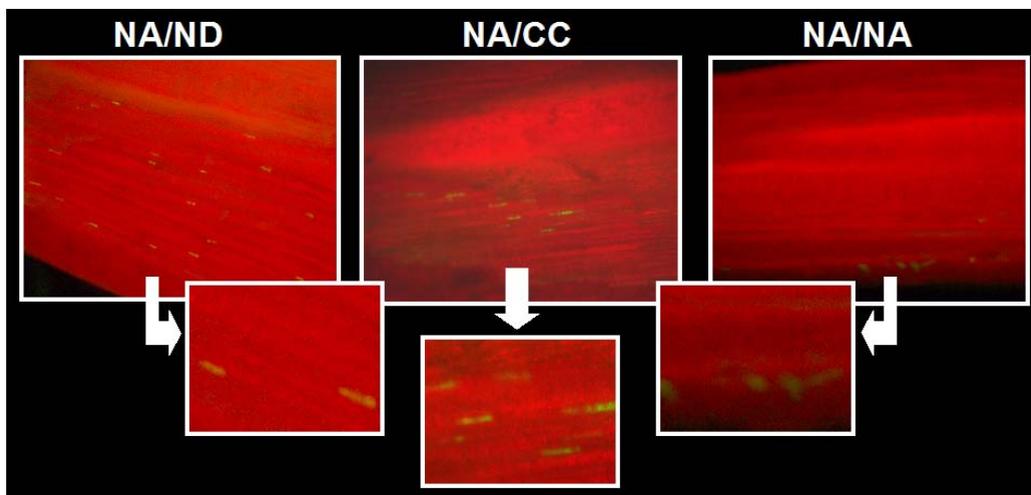


**Fig. 3.17** Valores normalizados de los siRNAs presentes en los extractos de la corteza de naranjo amargo propagado sobre naranjo dulce Pineapple donde los cuatro aislados de CTV fueron injertados en el patrón (NA/ND\*, azul) o en la variedad (NA\*/ND, rojo).

### 3.6 Frecuencia de células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 en naranjo amargo propagado sobre distintos patrones

La detección de fluorescencia verde producida por GFP en las células infectadas por el clon CTV9-GFPC3 del genotipo T36 permitió observar la distribución de CTV en el tallo de NA propagado sobre distintos patrones durante el transcurso de la infección. El examen de distintas secciones a lo largo del primer brote mostró la presencia de escasas células infectadas distribuidas erráticamente, lo que explicaría el bajo título viral del aislado T36 en la primera brotación del NA (capítulo I, apartado 3.2). Una observación pormenorizada de las secciones reveló que en todos los casos se observaba fluorescencia en células aisladas y nunca en las células adyacentes a las infectadas, lo que sugiere que el movimiento célula a célula es la principal limitación para la infección sistémica de CTV en NA. La menor frecuencia de células

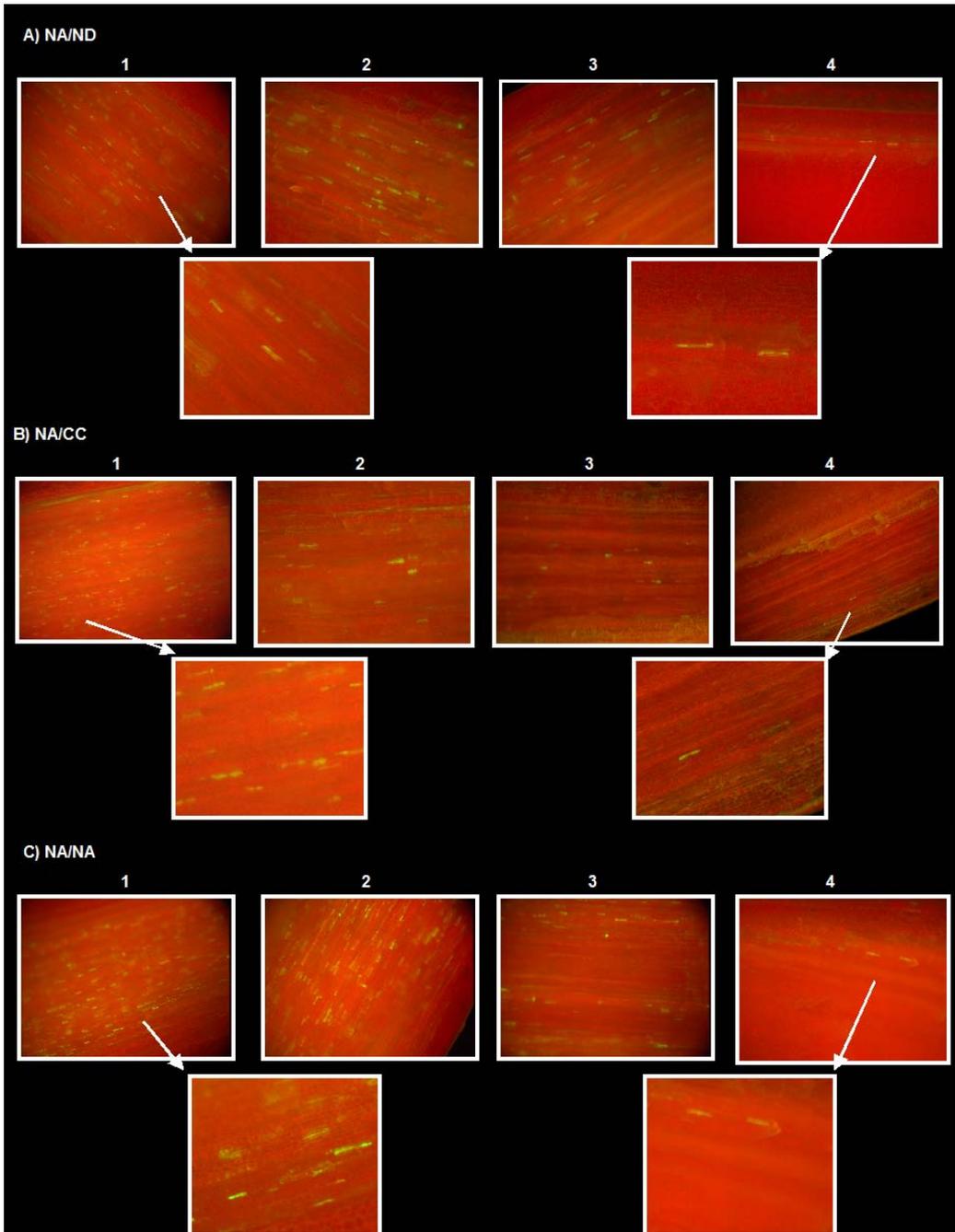
infectadas se observó en la combinación control NA/NA (Fig. 3.18), observación que es compatible con la menor carga viral detectada en plantas de esta combinación inoculadas con T36 en comparación con las otras dos.



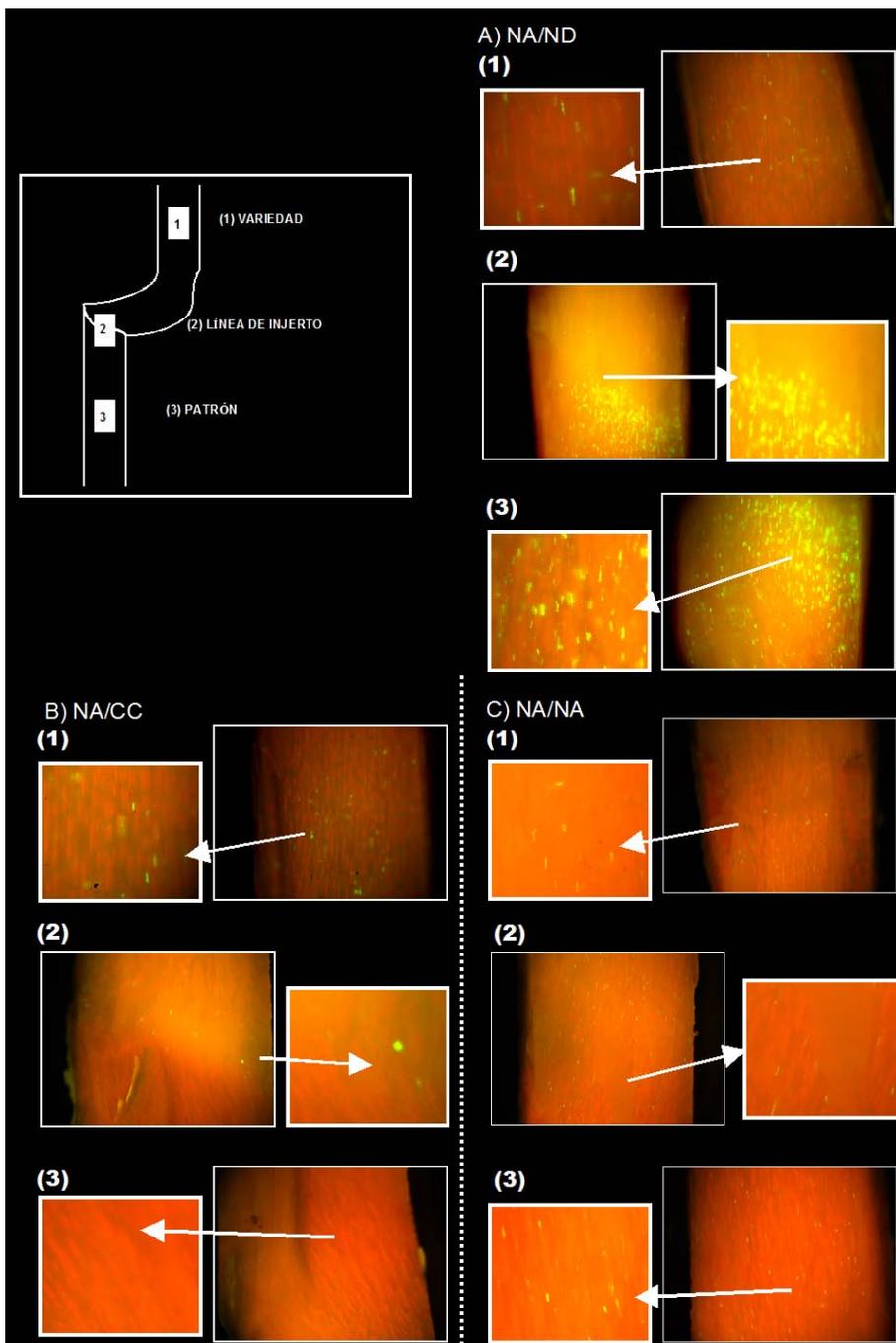
**Fig. 3.18** Frecuencia de células infectadas en corteza de la primera brotación de naranjo amargo propagado sobre naranjo dulce Pineapple (NA/ND), citrange Carrizo (NA/CC) y NA (NA/NA) inoculado en la variedad con CTV recombinante CTV9-GFP derivado del clon de T36.

Un segundo examen al microscopio de los tallos de NA infectados a los 15 meses p.i. puso de manifiesto un incremento en el número de células infectadas en todas las combinaciones variedad/patrón, si bien este incremento disminuía a medida que el tejido era más joven (Fig. 3.19). De nuevo se observó que la infección afectaba a células individuales, indicando que aunque se observa un avance de la infección hacia zonas más distales de la planta, el movimiento célula a célula parecía seguir restringido (Fig. 3.19).

A los 15 meses p.i. también se examinó la frecuencia de células infectadas en la zona del injerto y proximidades (Fig. 3.20). En la combinación NA/ND se observó mayor número de células infectadas, aisladas o en grupos en el patrón ND que en la variedad NA (Fig. 3.20 A), mientras que en la combinación NA/CC (Fig. 3.20 B) se observó lo contrario, es decir, no se detectaron células infectadas en el patrón CC y sólo se observaron células aisladas en la variedad NA. En la combinación NA/NA se observó la misma frecuencia de células infectadas en el patrón y en la variedad (Fig. 3.20 C).



**Fig. 3.19** Frecuencia de células infectadas a lo largo del tallo (1: brote viejo – 4: joven) de NA propagado sobre **A)** naranjo dulce Pineapple (NA/ND), **B)** citrange carrizo (NA/CC) y **C)** naranjo amargo (NA/NA), inculcado en la variedad con CTV recombinante CTV9-GFP derivado del clon de T36 a los 15 meses p.i.



**Fig. 3.20** Frecuencia de células infectadas en la zona del injerto de plantas de NA propagado sobre **A)** naranjo dulce Pineapple (NA/ND), **B)** citrange Carrizo (NA/CC) y **C)** naranjo amargo (NA/NA) inoculado en la variedad con CTV recombinante CTV9-GFP derivado del clon de T36 a los 15 meses p.i. Se muestra en el esquema los cortes realizados en la variedad (1), la línea del injerto (2) y en el patrón (3).

#### 4. DISCUSIÓN

En los capítulos anteriores se obtuvieron evidencias de que el NA ofrece una resistencia inicial a la acumulación de algunas cepas de CTV que no sería debida al mecanismo de silenciamiento inducido por el virus, ya que al menos la acumulación de siRNAs específicos no se hace patente hasta que se ha alcanzado un umbral de carga viral. Se sabe que el aislado T36 de CTV se replica normalmente en protoplastos de NA y de huéspedes resistentes a CTV como *Poncirus trifoliata* (Albiach-Martí *et al.*, 2004 y resultados no publicados), pero el aumento de carga viral requiere, además de la replicación en las células infectadas, el movimiento célula a célula y a larga distancia. Para conocer mejor el tipo de limitaciones que pone el NA a la invasión sistémica de CTV, en este capítulo examinamos la distribución de distintos aislados del virus en plantas de NA de semilla o propagadas en un patrón resistente o susceptible y analizamos la carga viral y la acumulación de siRNAs derivados de CTV en distintas partes de la planta.

La detección serológica de CTV en improntas de distintos tejidos de NA a los 9 meses p.i. mostró que, mientras el aislado T388 presentaba una distribución generalizada en toda la planta, los aislados T318A y T36 presentaban una distribución consistente en el tallo e irregular en las hojas, y el aislado T385 no se detectó en ninguno de los tejidos analizados. Estos datos confirman una resistencia diferencial del NA a los distintos genotipos de CTV que se manifiesta como una restricción del movimiento célula a célula en el caso de los aislados T318A y T36, y una limitación de los movimientos célula a célula y a larga distancia del aislado T385. Por el contrario, el análisis de las improntas realizadas a los 3.5 años p.i. mostró una distribución generalizada de todos los aislados de CTV en la planta, en sintonía con los análisis de la carga viral efectuados en el Capítulo I, en los que se observó una rápida acumulación de T388, una acumulación lenta de T385, y una situación intermedia para T318A y T36.

El análisis de la carga viral mediante q-RT-PCR en la primera brotación mostró de nuevo mayor acumulación viral del aislado T388, seguido de T318A, y luego de los aislados T36 y T385, como ya se había visto en el Capítulo I. Asimismo, se detectó menor acumulación viral en hoja que en corteza, lo que reflejaría, por una parte, la menor proporción de tejido floemático en las hojas, y por otra, una posible limitación inicial del movimiento célula a célula y de la salida del virus del floema del

tallo hacia las hojas. Los análisis de la carga viral en raíz, corteza y brote de NA de semilla a los 2 años p.i. (momento donde se alcanza un título viral en corteza próximo al máximo, ver Capítulo I) reveló que la pauta de acumulación de CTV en los distintos tejidos analizados era similar para todos los aislados: la menor carga viral se observó en raíz, mientras que en brote y corteza el título viral alcanzado era similar, excepto para T36 que mostró en brote una carga viral menor que en corteza, sugiriendo una posible limitación de este aislado en el movimiento a zonas más distales o un silenciamiento más intenso en el brote joven. También resultó llamativo que el aislado T385, que había mostrado una acumulación viral en corteza más lenta que los demás (ver Capítulo I), alcanzase en raíz la carga viral más elevada, lo que podría ser debido a que este órgano sirviese de reservorio viral para este genotipo específico. Gafny *et al.*, (1995) estudiaron mediante ELISA la distribución y movimiento de CTV en NA y observaron que existía un retraso entre la inoculación y el movimiento del virus fuera de la zona de injerto y su entrada en el sistema vascular. El patrón de movimiento de los distintos aislados de CTV era el mismo: un movimiento inicial a las zonas basales y raíz, seguido de un movimiento más tardío a las zonas altas de la planta, si bien los aislados de CTV se diferenciaban en la velocidad de este movimiento.

Para examinar la posible influencia de los patrones con distinta sensibilidad a CTV en la acumulación viral en la copa de NA y la posibilidad de que la raíz pudiese actuar como reservorio viral para T385, se analizó la carga viral en plantas de NA propagadas sobre el patrón resistente CC, el patrón tolerante ND o sobre NA. Estos análisis mostraron la presencia de todos los aislados de CTV en raíz a las 3 semanas p.i. y un incremento en el título viral a las 6 semanas p.i., variable según el patrón y el aislado de CTV, siendo éste más acentuado en el patrón tolerante ND que en el resistente CC o en NA. La detección tan temprana de CTV en raíz sugiere, en concordancia con las observaciones de Gafny *et al.*, (1995), que una vez el virus alcanza el sistema vascular de la planta, el movimiento inicial del mismo es hacia la raíz, desde donde pasaría posteriormente a la copa. La acumulación viral en la corteza de NA varió según el patrón y el aislado de CTV. Para los aislados T318A, T36 y T388 la carga viral en el NA fue mayor en las plantas propagadas sobre CC o ND que en las propagadas sobre NA, mientras que el comportamiento de T385 fue diferente y presentó la carga viral más alta en las plantas propagadas sobre ND, seguidas de las propagadas sobre NA. Más aún, cuando se comparó la carga viral en

NA a los 9 meses p.i. con la detectada en la raíz a las 6 semanas p.i. se observaron dos peculiaridades en el aislado T385: i) este aislado fue el único que presentaba menos carga viral en la copa que en la raíz, lo que es coherente con la acumulación más lenta de este aislado en NA, observada en el Capítulo I, y ii) T385 fue también el único aislado en el que el título viral en la copa aparecía asociado con el observado previamente en la raíz. Estos datos apoyan la idea de que, para el genotipo T385, la raíz podría actuar como reservorio viral para la invasión del NA.

En la combinación NA/ND la acumulación viral también varió en función del sitio de inoculación (en el patrón o en la variedad) y del aislado. La carga viral en raíz a las 6 semanas p.i. siempre fue superior cuando CTV se inoculó en el patrón que cuando se hizo en la variedad, lo que sugiere que la replicación y movimiento del virus en el ND, al menos durante este período, ocurre más rápidamente que a partir de la copa de NA. Dado que la distancia de los puntos de inoculación en una y otra modalidad es de pocos centímetros, la diferencia observada apoya la idea de una limitación para el movimiento de CTV célula a célula en el NA. Por otro lado, el título viral alcanzado por los aislados T318A y T388 en la copa de NA fue mayor cuando la inoculación se hizo en la variedad, mientras que el de los aislados T36 y T385 fue mayor cuando se hizo en el patrón, coincidiendo con una mayor acumulación viral en la raíz. Estos resultados apoyarían el papel de la raíz como reservorio viral para el aislado T385 y sugieren que la acumulación de otros genotipos en NA es menos dependiente de lo que ocurre en la raíz. La raíz como reservorio viral se ha descrito para otros virus como el virus del cribado del melón (*Melon necrotic spot virus*, MNSV), cuya elevada acumulación viral en raíz va acompañada de una alta tasa de replicación en la misma (Gosálvez *et al.*, 2003, 2008). El elevado título viral de MNSV en este tejido parece ser ventajoso para su transmisión por *Oplidium radicale*, un hongo que parasita las raíces (Furuki, 1981). Una elevada carga viral en raíz se ha observado también en virus transmitidos por nematodos (MacFarlane y Popovich, 2000; Ploeg *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren que los mecanismos de defensa en la raíz probablemente varían en intensidad dependiendo de la interacción virus/huésped.

La acumulación viral en distintos tejidos una vez establecida la infección está limitada por el mecanismo de silenciamiento que ejerce la planta sobre el RNA viral. El transporte de la señal del silenciamiento génico mediado por RNA utiliza la misma ruta intercelular que usan los virus para su movimiento célula a célula y a larga

distancia (Voinnet *et al.*, 1998; Carrington *et al.*, 2001), es decir, a través de los plasmodesmos para el primero y a través de los vasos del floema para el segundo (Voinnet *et al.*, 1998). El silenciamiento a corta distancia se relaciona con los siRNAs de 21 nt (Dunoyer *et al.*, 2005), mientras que en el de larga distancia también participan los siRNAs de 24 nt (MacDiarmid, 2005). Puesto que el movimiento y acumulación de algunos aislados de CTV en NA es relativamente lento y la detección de siRNAs necesita una carga viral mínima, los análisis de detección y cuantificación de siRNAs en los distintos tejidos de NA se realizaron a los 2 años p.i. Los valores normalizados de siRNAs para el aislado T318A eran similares en raíz, brote joven y corteza, para el aislado T36 eran similares en brote y raíz pero, más bajo en corteza, para T388 era más bajo en brote que en corteza y raíz y, finalmente, para T385 el nivel más bajo de siRNAs se daba en raíz, siendo éste el único aislado en el que el nivel de silenciamiento en raíz fue más bajo que en brote y corteza. Estos datos sugieren que las pautas de silenciamiento viral en distintos tejidos de NA varían con los aislados. Los valores más altos de siRNAs en las plantas infectadas con T36 en comparación con los otros aislados son coherentes con su menor carga viral en todos los tejidos, y su menor nivel de siRNAs en corteza justificaría en parte la mayor acumulación viral que muestra en este tejido en comparación con la raíz y el brote. A su vez, el menor nivel de siRNAs en la raíz de las plantas infectadas con T385 en comparación con los demás aislados es concordante con su mayor carga viral relativa en este órgano y apoyaría la idea de que la raíz de NA sirve como reservorio viral para este genotipo.

Para ver si la propagación del NA en un patrón resistente a CTV o en uno susceptible también afectaban la intensidad del silenciamiento en la copa de NA, se estimó la acumulación de siRNAs de CTV en las combinaciones NA/CC, NA/ND y NA/NA a los 9 meses p.i. En ninguna de las combinaciones inoculadas con el aislado T385 se detectó la presencia de siRNAs, lo que es coherente con la baja carga viral de este aislado en todas ellas. Estos resultados vienen a confirmar que la acumulación de T385 en la corteza de NA es particularmente lenta, que esta resistencia inicial a la invasión no es producida por una reacción de silenciamiento del NA, y que es necesaria una carga viral mínima para que la producción de siRNAs sea detectable. Tampoco se detectaron siRNAs en NA/NA inoculado con T36, en consonancia con la baja carga viral que presenta esta combinación variedad/patrón

en comparación con las otras dos, lo que sugiere una acumulación viral más lenta en la misma. En las plantas inoculadas con T318A o T388, que a los 9 meses p.i. habían alcanzado una carga viral más alta que T36 o T385, se detectaron siRNAs de CTV en las tres combinaciones, siendo el nivel de silenciamiento de ambos aislados más alto en NA/NA que en NA/CC o NA/ND, lo que resulta coherente con la menor carga viral de estos aislados en NA/NA.

Por último, durante la realización de este trabajo de tesis se obtuvo en el laboratorio del Dr. W.O. Dawson (University of Florida, C.R.E.C., Lake Alfred) un clon infeccioso de CTV (CTV9-GFP-C3), que lleva insertado el gen *gfp* y por tanto produce fluorescencia verde en las células donde se replica (Folimonova *et al.*, 2008; Satyanarayana *et al.*, 2008). Este clon se utilizó para examinar la frecuencia de células infectadas en las combinaciones NA/CC, NA/ND y NA/NA. En la primera brotación se observó que el número de células infectadas era muy bajo en todas las combinaciones, particularmente en la combinación NA/NA, y que éstas aparecían siempre aisladas, indicando que el movimiento célula a célula era nulo o muy limitado. También el movimiento a larga distancia o la salida de los tubos cribosos, parecía estar limitados ya que la distribución de las células infectadas era muy errática a lo largo del tallo. Estas observaciones coinciden con las efectuadas por Folimonova *et al.*, (2008) en plantas infectadas de CM y NA. Nuestra observación de las mismas plantas al cabo de 15 meses p.i. mostró mayor número de células infectadas que en la primera brotación, si bien la infección seguía afectando sólo a células aisladas, lo que indicaba que el movimiento a larga distancia o la salida de los tubos cribosos era muy paulatina y que el movimiento célula a célula seguía siendo nulo o muy limitado. Por otra parte, la frecuencia de células infectadas a lo largo del tallo disminuía a medida que nos acercábamos al brote joven, lo que es coherente con la menor acumulación viral y la mayor intensidad del silenciamiento viral observados en brotes para T36. El examen de las zonas contiguas a la línea de injerto puso de manifiesto pautas de distribución diferente en las tres combinaciones. Mientras en la combinación NA/NA la frecuencia y distribución de las células infectadas fue similar en el patrón y en la variedad, en la combinación NA/ND la frecuencia de células infectadas era mayor en el patrón y en éste se observaban grupos de células infectadas, como sería de esperar en una especie susceptible en la que CTV se replica y se mueve sin restricciones. Por el contrario, en la combinación NA/CC sólo

se detectaron células infectadas en la variedad, lo que sugiere que la pequeña cantidad de virus detectada en la raíz mediante q-RT-PCR debe estar mayoritariamente en los tubos cribosos pero no sale, o lo hace en una proporción mínima a células acompañantes. Esta observación apoya la idea de que la resistencia a CTV de *Poncirus trifoliata* y algunos de sus híbridos se debe a una limitación drástica del movimiento célula a célula, ya que los protoplastos de esta especie replican normalmente el genotipo T36 (Albiach-Martí *et al.*, 2004).

Los virus de plantas se mueven célula a célula a través de los plasmodesmos y a zonas más lejanas de la planta a través del sistema vascular del floema, asegurando así la infección sistémica de todo el huésped (Hull, 1991; Séron y Haenni, 1996; Boevink y Oparka, 2005). Generalmente, los virus de plantas codifican proteínas no estructurales necesarias para el movimiento, que tienen la capacidad de aumentar el diámetro de los plasmodesmos y permitir así el movimiento célula a célula del virus (Hull, 1991; Boevink y Oparka, 2005). Las estrategias desarrolladas para este movimiento son muy variadas y están estrechamente relacionadas con los sistemas de transporte endógenos del propio huésped (Boevink y Oparka, 2005). De esta manera, la interacción de los factores propios del huésped con las proteínas del movimiento del virus es una etapa crítica para la infección sistémica (Boevink y Oparka, 2005) y explica que haya huéspedes que pueden ser infectados por muchos virus y otros por sólo unos pocos (Hull, 1991). La(s) proteína(s) de movimiento de CTV no están identificadas pero en experimentos con clones defectivos de CTV se observó que los genes p6 y p20 eran imprescindibles para la infección sistémica, mientras que los genes p33, p18 y p13 no lo eran para la invasión de CM y LM, pero sí para el movimiento del virus en NA y pomelo (Tatineni *et al.*, 2008, Tatineni y Dawson, comunicación personal). El requerimiento de p33, p18 y p13 para la infección sistémica de NA, pero no para la de LM o CM sugiere interacciones de CTV con factores críticos del huésped diferentes para ambos grupos de huéspedes. La participación de tres proteínas virales diferentes en estas interacciones y las diferencias de secuencia observadas entre T36, T385 y T388 o T318A (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2009) explicarían en parte las distintas pautas de distribución y acumulación viral observadas según el aislado y el huésped.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo indican que el NA presenta una limitación al movimiento viral de CTV, tanto célula a célula como a larga

distancia, que retrasa la invasión sistémica y la acumulación viral en la copa de forma diferencial según los genotipos. El movimiento inicial del virus parece ser hacia la raíz, ya que puede detectarse en ésta a las 3 semanas p.i., incluso cuando el NA está propagado sobre un patrón resistente que impide el movimiento célula a célula de CTV, como es el CC. La raíz afecta la posterior acumulación en la copa de forma variable según los aislados, lo que podría tener relación con la acumulación viral en este órgano y con la señal de silenciamiento que se produciría en el mismo y se desplazaría a la copa. Así, mientras la acumulación de algunos aislados en la copa es independiente de la carga viral previa en la raíz, la del aislado T385 aparece asociada a la misma y parece más lenta que la de otros aislados, lo que sugiere que para este genotipo la raíz actuaría como reservorio viral. El silenciamiento de CTV en NA, estimado por la acumulación relativa de siRNAs específicos, requiere una carga viral mínima y por tanto no parece la causa primaria de la limitación del movimiento viral. La intensidad del silenciamiento en los distintos órganos de la planta varía con los aislados de CTV, siendo igual o mayor en raíz que en corteza o brote para todos los aislados excepto T385, lo que apoyaría el papel de la raíz como reservorio viral para este aislado. La raíz puede afectar el nivel de silenciamiento en la copa y afectar así la acumulación de CTV, como se observó con los aislados T388 y T318A, que presentaron mayor silenciamiento y menor carga viral en la copa cuando estaban propagados sobre NA que cuando estaban propagados en CC o ND.



## **CAPÍTULO IV**

---



## CAPÍTULO IV. CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE NARANJO AMARGO TRAS LA INFECCIÓN CON DOS AISLADOS DE CTV

### 1. INTRODUCCIÓN

La infección sistémica de la planta por parte del virus requiere modificaciones en las células del huésped que faciliten la utilización de la maquinaria celular y de transporte por parte del virus. Estas modificaciones incluyen la inducción de los factores del huésped necesarios para la replicación y movimiento viral, así como la represión de la respuesta de defensa de la planta. Todas estas modificaciones van asociadas a cambios en la expresión del genoma del huésped. La tecnología de las micromatrices de cDNA proporciona un método sensible y fiable para evaluar los efectos de la infección viral en la expresión de los genes del huésped (Whitham *et al.*, 2003). Esta tecnología facilita el análisis del transcriptoma de la planta infectada en comparación con el de una planta sana y permite detectar los genes con expresión modificada y por tanto, directa o indirectamente, implicados en la interacción virus-planta durante el proceso de infección.

Gandía *et al.*, (2007) estudiaron la respuesta transcripcional de lima Mexicana (LM) a la infección por un aislado virulento y otro no virulento de CTV y concluyeron que sólo el primero inducía cambios significativos en la expresión génica. Esta reacción diferencial de LM frente a dos aislados de CTV con distinta virulencia podría ser debida, en parte, a una interferencia más amplia de las proteínas codificadas por el aislado virulento en los procesos de desarrollo del huésped. Los genes relacionados con la defensa y respuesta de la planta al estrés constituían la principal categoría funcional cuya expresión aparecía modificada tras la infección. Sin embargo, casi un 50% de los genes inducidos por ésta no mostraban similitud significativa con otras secuencias disponibles en las bases de datos, lo que sugiere que la interacción CTV-cítricos podría ser altamente específica. El tamaño inusual del genoma de CTV, con capacidad para codificar al menos 17 proteínas (Karasev *et al.*, 1995), tres de ellas supresoras del silenciamiento (Lu *et al.*, 2004), y su estrecha relación con los cítricos (de forma natural el virus está restringido al floema de unos cuantos géneros de las rutáceas) apoyarían una interacción particularmente sofisticada e incluso la co-evolución del virus y el huésped (Gandía *et al.*, 2007).

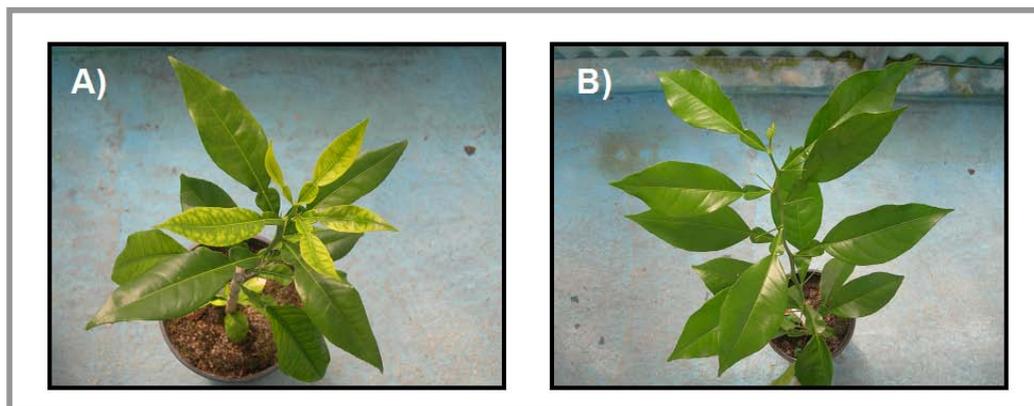
En los capítulos anteriores se ha observado que la interacción de CTV con el naranjo amargo (NA) es distinta a la observada en el caso de LM y otros huéspedes cítricos. Igualmente se ha observado un comportamiento diferente entre los aislados de CTV en cuanto a sus pautas de acumulación viral, la producción de siRNAs en NA y la capacidad para inducir síntomas en este huésped. En este capítulo se utilizó la hibridación con micromatrices de cDNA para analizar a nivel transcriptómico la respuesta del NA a la infección por dos aislados de CTV: uno inductor del síndrome de *seedling yellows* (SY) (T318A) y otro asintomático (T385). De este modo, los objetivos de este capítulo son:

- Analizar los cambios de expresión génica en el transcriptoma de NA asociados a la infección por un aislado de CTV inductor de SY (T318A) y otro asintomático (T385).
- Comparar los perfiles de expresión génica al comienzo de la infección antes de la aparición del síndrome de SY y tras la aparición de SY.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y aislados de CTV

Para este estudio se utilizaron tres tipos de materiales: (i) una mezcla de hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas de NA inoculadas con el aislado T318A y muestreadas antes de la aparición del síndrome de SY (2 meses p.i., pre-SY), (ii) una mezcla de hojas sintomáticas de plantas similares muestreadas tras la aparición de SY (4 meses p.i., SY), y (iii) una mezcla de hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas de NA inoculado con el aislado T385 (y por tanto asintomáticas), tomadas a los 4 meses p.i. (Fig. 4.1). La inoculación de las plantas de NA se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I, apartado 2.1. Como control se utilizó una mezcla de hojas jóvenes totalmente expandidas de 4 plantas de NA sin inocular.

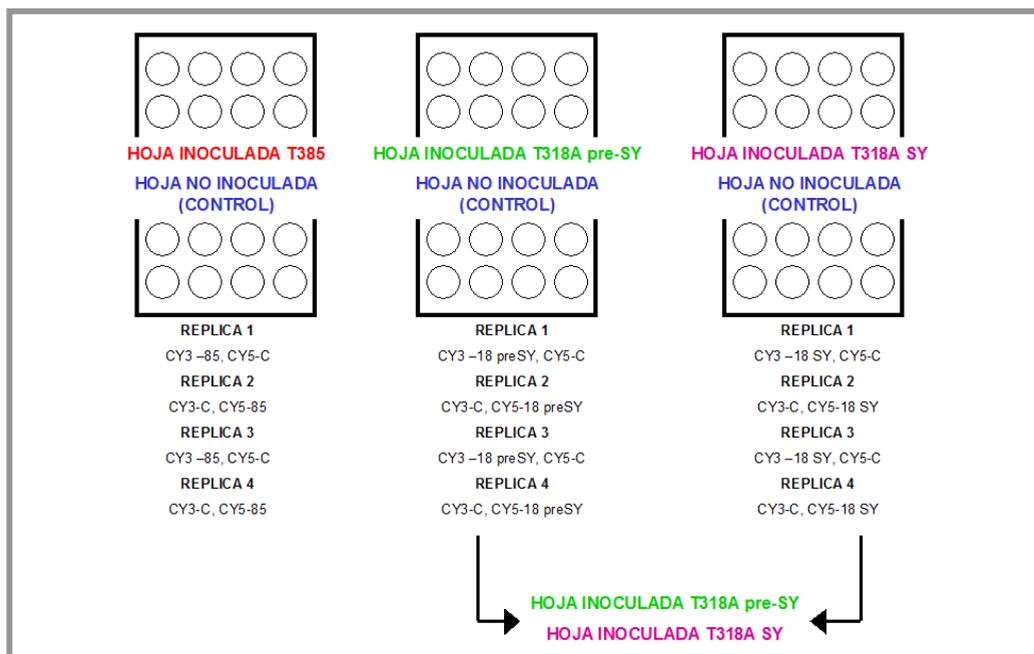


**Fig. 4.1** Sintomatología inducida en plantas de naranjo amargo a los 4 meses p.i. por (A) el aislado T318A: síndrome de SY caracterizado por clorosis de la nueva brotación y enanismo, o por (B) el aislado T385 el cual no induce ninguna sintomatología.

## 2.2 Diseño experimental

En el proceso de hibridación de las micromatrices, los mRNAs de la planta infectada y de la planta sana se marcan con dos fluoróforos diferentes (CY3 y CY5), pero se ha observado que algunos mRNAs se unen a ambos fluoróforos con distinta eficiencia (Dobbin *et al.*, 2003). Para evitar errores derivados de este efecto se utilizó un diseño *Dye-Swap*, en el que se marcaron los mRNAs de cada planta con un fluoróforo diferente en cada hibridación. Para cada comparación se analizaron 4 réplicas biológicas (plantas diferentes), por lo que se utilizaron en total 12 micromatrices, en la mitad de las réplicas las muestras problema iban marcadas con Cy3 y el control negativo con Cy5, y en la otra mitad se realizó el marcaje contrario (Fig. 4.2).

En primer lugar se comparó la expresión diferencial de los genes de cada uno de los tratamientos (hojas de NA inoculado con el aislado T385, hojas de NA inoculado con el aislado T318A pre-SY y hojas de plantas similares con SY) con el control sano. El hecho de hibridar cada muestra problema con la misma muestra control (Dardichk, 2007) permitió posteriormente la comparación de los genes que se expresaban diferencialmente en plantas inoculadas con T318A antes y después de la aparición del síndrome de SY (Fig. 4.2).



**Fig. 4.2** Esquema de las comparaciones efectuadas para analizar los efectos de CTV en el transcriptoma de naranjo amargo.

## 2.3 Preparación de muestras de cDNA marcadas

### 2.3.1 Extracción del RNA

La extracción de RNA total a partir de hojas de NA se hizo siguiendo la metodología descrita por Ancillo *et al.*, (2007) (Ver Capítulo 1, apartado 2.3.1).

### 2.3.2 Marcaje del cDNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 30  $\mu\text{g}$  de RNA<sub>t</sub>, tratado 10 min a 70°C para relajar la estructura secundaria, usando 400U de la retrotranscriptasa *SuperScript II* (Invitrogen), 334  $\mu\text{M}$  de aa-dUTP (5-(3-aminoalil)-2'-deoxy-UTP), 6  $\mu\text{M}$  oligo(dT), 500  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP, 166  $\mu\text{M}$  dTTP y 10  $\mu\text{M}$  DTT en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$ . La reacción tuvo lugar a 42°C durante 5 h y posteriormente las muestras se incubaron con 250  $\mu\text{M}$  NaOH y 125  $\mu\text{M}$  EDTA durante 15 min a 65°C y se neutralizaron con 250  $\mu\text{M}$  HCl. El cDNA se purificó con el estuche comercial *Qiagen PCR Purification Kit* según las indicaciones del fabricante y se resuspendió con 10  $\mu\text{l}$  NaHCO<sub>3</sub> 100  $\mu\text{M}$ , pH 9. El acoplamiento de los fluoróforos se llevó a cabo

durante 1 h a temperatura ambiente y en la oscuridad con los fluoróforos Cy3 o Cy5 (GE Healthcare) y posteriormente el cDNA marcado se purificó nuevamente con el mismo estuche comercial.

La calidad del cDNA marcado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tampón TAE 1x (40mM Tris-acetato pH 8.3, 1mM EDTA). Para ello, el cDNA marcado se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua destilada estéril y una alícuota (1/10) se cargó en el gel junto a 5  $\mu$ l de glicerol al 15%. Tras la electroforesis el gel se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, se deshidrató y se escaneó utilizando el escáner GenePix 4000B y el programa asociado GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices).

## 2.4 Hibridación de las micromatrices

En estos experimentos se utilizó la micromatriz de cDNA de cítricos generada en el marco del proyecto CFGP, formada por 85.965 clones que corresponden a 21.081 unigenes de cítricos (Martínez-Godoy *et al.*, 2008).

La hibridación de las micromatrices se realizó de forma manual utilizando cámaras de hibridación (Olympus). En primer lugar se prehibridaron los portas en una solución de 3 x SSC, 0.1 % SDS y 0.1 mg/ml de BSA durante una hora a 42°C, tras la cual se lavaron 2 veces durante 5 min con 0.1 x SSC y una última con agua destilada. Tras secar los portas por centrifugación a 500 g durante 5 min la hibridación se realizó con 100  $\mu$ l de solución de hibridación [50 % formamida, 5 x SSC, 0.1 % SDS, 1% solución Denhardt (2% (p/v) BSA, 2% (p/v) Ficoll y 2% (p/v) PVP)] conteniendo las sondas (cDNA marcado) previamente desnaturalizadas a 95°C durante 1 min. Las cámaras bien cerradas se sumergieron en un baño a 42°C durante 16 horas y a continuación los portas se lavaron con agitación dos veces en 2 x SSC y 0.1 % de SDS durante 5 min a 42°C y a 25-28°C, respectivamente, dos veces en 0.1 x SSC y 0.1 % de SDS durante 5 min a temperatura ambiente, seis veces en 0.1 x SSC durante 5 min a temperatura ambiente, y una vez en 0.01 x SSC durante 10 s, y se secaron por centrifugación durante 5 min a 600 g.

## 2.5 Obtención de los datos de las micromatrices

Las micromatrices se escanearon utilizando un escáner GenePix 4000B y para cada micromatriz se captaron las imágenes de cada fluoróforo por separado,

escaneando a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5), a una resolución de 10  $\mu\text{m}$  y una potencia de láser del 100%. El programa GenePix Pro 6.0 permitió realizar un ajuste automático de los valores de ganancia del tubo fotomultiplicador (PMT) una vez fijada la proporción de pixels saturados. La intensidad de cada punto se cuantificó utilizando este paquete informático y la extracción de los datos de cada punto se realizó usando una gradilla predefinida, generada durante el proceso de impresión de la micromatriz y organizada en bloques que contenía entre otros campos la información referente a la posición de cada punta, su identificador y su descripción. Los puntos de mala calidad (con partículas de polvo, morfología irregular, rayas o manchas de tampón, sin hibridación o situados en áreas con elevado fondo local) o aquellos con valores de intensidad menores que dos veces el fondo local en los dos canales fueron eliminados. El valor de intensidad de cada canal para cada punto y para el fondo local se determinó como la mediana de la intensidad de los píxeles dentro del círculo que incluía el punto (mediana F635 y mediana F532) y de los píxeles alrededor del mismo (mediana B635 y mediana B532), respectivamente. En cada punto se calculó el cociente de las intensidades entre Cy5 y Cy3 tras la sustracción de las respectivas intensidades del fondo local de cada canal:

$$\text{Cociente de expresión} = \frac{(\text{Mediana F635} - \text{Mediana B635})}{(\text{Mediana F532} - \text{Mediana B532})}$$

El cociente de expresión se transformó en el valor M (logaritmo en base dos del cociente de expresión), que da una idea de la intensidad de expresión de cada gen en la planta inoculada en comparación con la planta control. Los datos de GenePix Pro 6.0 se normalizaron aplicando el método de regresión lineal local y se importaron al paquete informático de análisis de micromatrices Limma (*Linear Model for Microarrays Data*) para su pre-procesamiento, visualización y análisis estadístico.

Se identificaron las categorías funcionales expresadas diferencialmente mediante el programa informático FatiScan (Al-Shahrour *et al.*, 2007), que permite observar el comportamiento de los bloques de genes relacionados funcionalmente en lugar de centrarse en los genes individuales. A partir de una lista de genes ordenados por su intensidad de expresión relativa, FatiScan detecta categorías funcionales en las que los genes que la integran están distribuidos asimétricamente en la lista. Cuando no existe ninguna razón biológica que altere dicha distribución, los genes de cada categoría deberían distribuirse simétricamente en la lista.

## 2.6 Validación de los datos de expresión de las micromatrices mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Se seleccionaron cuatro de los genes expresados diferencialmente en alguno de los tratamientos analizados para validar su expresión mediante q-RT-PCR. Los cebadores se diseñaron sobre la secuencia disponible en la base de datos del CFGP (Tabla 4.1) utilizando el programa Probe Design 2 (Light Cycler, Roche) y la reacción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo I, apartado 2.3. Para cuantificar la expresión de cada gen en las muestras problema en relación con la planta control, se construyó una recta de calibración utilizando diluciones seriadas de un producto de RT-PCR de dicho gen y midiendo la fluorescencia producida en un análisis de q-RT-PCR. La fluorescencia obtenida en las muestras problema y control se compararon mediante esta recta de calibración.

**Tabla 4.1** Cebadores utilizados para cuantificar la expresión relativa de los genes seleccionados mediante q-RT-PCR con el fin de validar los resultados de los experimentos con micromatrices.

CEBADOR	secuencia nucleotídica (5' – 3')
peroxidasa – F	5'- GAGCTTTGGTATGAGGAACT -3'
peroxidasa – R	5'- ATTGTGATCTGGGAGATAGTG -3'
metalotionina – F	5'- AGCTCAATCAACATGTGCGGA -3'
metalotionina – R	5'- GCTGCATGTGTTTGCTTAT -3'
glicosil - F	5'-CAAATGGGGACGTTTCAGTTT-3'
glicosil – R	5'-AGTGCAAGAGCTCCCAGTGT-3'
xiloglucan – F	5'-ACCTCTGGTTTGACCCTCT-3'
xiloglucan – R	5'- GGTCTTTGGGAAGGAATCT -3'

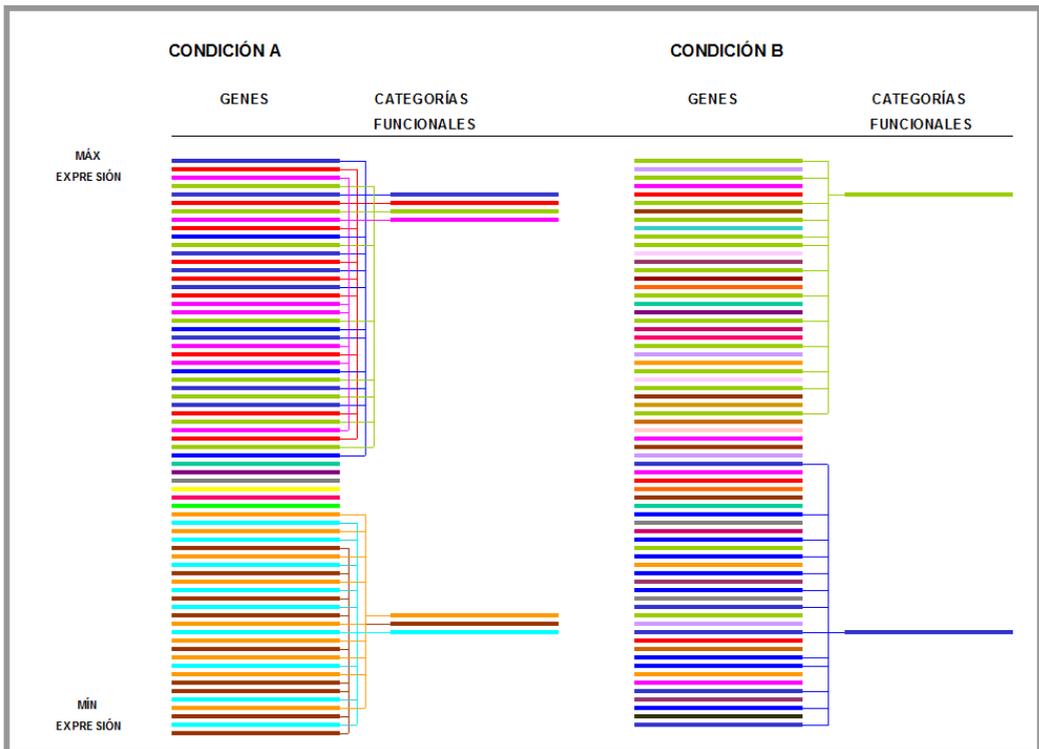
## 2.7 Tinción histológica

Para observar posibles alteraciones histológicas en la corteza de las plantas de NA infectada con el aislado T318A antes y después de la expresión del síndrome de SY se siguió la metodología general descrita por Jensen (1962). Segmentos de tallo de NA sano o inoculado con T318A, en la etapa pre-SY o en la etapa SY (50 mm) se fijaron en FAA (solución de formol, ácido acético glacial, alcohol) durante 5 días, se deshidrataron empleando una serie creciente de alcoholes etílico y ter-butílico (TBA) TBA 50 (50% agua, 40% alcohol etílico y 10% de TBA), TBA 70 (30% agua, 50% alcohol etílico y 20% de TBA), TBA 85 (15% agua, 50% alcohol etílico y 35% de TBA), TBA 95 (45% alcohol etílico y 55% de TBA) y TBA 100 (6-24 h en cada solución a

28°C), posteriormente se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en secciones transversales de 10 µm de espesor con la ayuda de un microtomo de rotación (Jung, modelo 1130). Las secciones se montaron en portaobjetos con el adhesivo de Haupt y se tiñeron con el método del ácido peryódico-Schiff para carbohidratos (Jensen, 1962). Los cubreobjetos se montaron con bálsamo de Canadá y las preparaciones se dejaron secar durante dos días en placa caliente a 55°C. Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica (Leitz-Orthoplan) equipado con una cámara fotográfica Leica DFC 490.

### **3. RESULTADOS**

El algoritmo matemático utilizado por Limma para analizar las micromatrices no identificó genes con expresión significativamente alterada en las plantas de NA inoculadas con T385 o T318A (pre-SY o SY) en comparación con las plantas sanas. Por este motivo se procedió a realizar un análisis FatiScan (Al-Shahrour, *et al.*, 2007) que permitió identificar las categorías funcionales expresadas diferencialmente en las plantas inoculadas. En primer lugar, para cada condición se elaboró un listado de genes ordenados de mayor a menor expresión en la muestra problema en comparación con el control. A continuación, el análisis FatiScan permitió agrupar estos genes en categorías funcionales e identificar cuales de ellas estaban sobre-expresadas o reprimidas. El hecho de que en una condición se obtenga mayor número de categorías funcionales diferencialmente expresadas que en otra, no significa que la primera presente un mayor número de genes diferencialmente expresados, sino que muchos de los genes expresados se pueden agrupar en las mismas categorías funcionales, y por tanto éstas están diferencialmente expresadas en comparación con el control (Fig. 4.3).



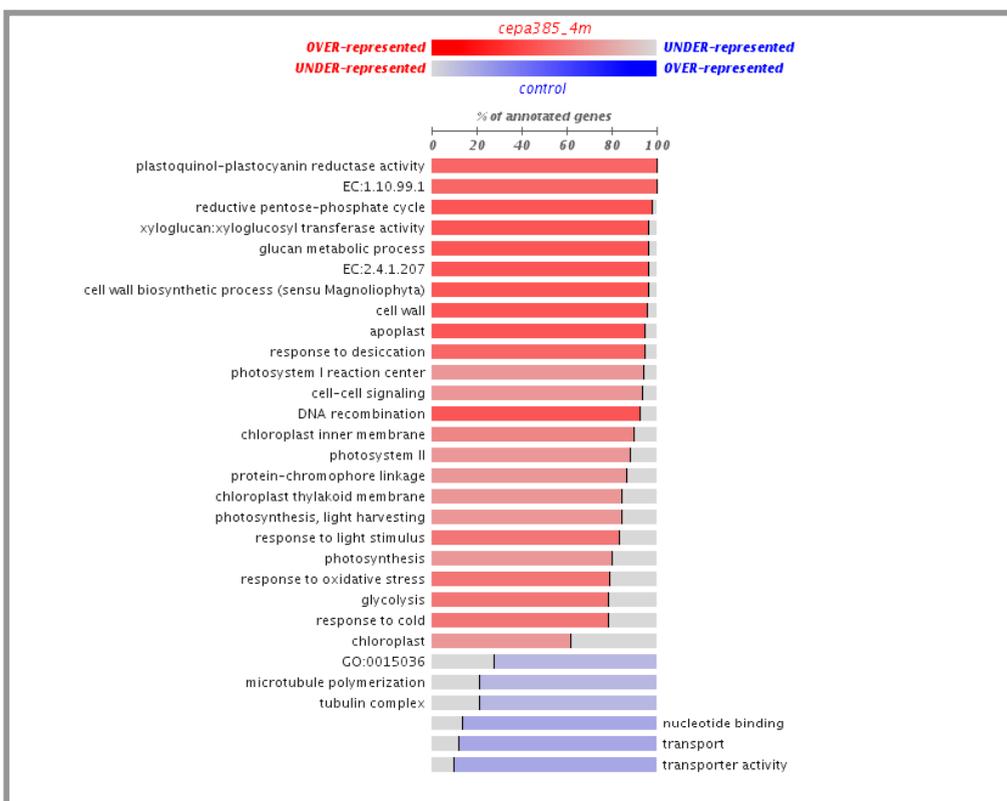
**Fig.4.3** Esquema del funcionamiento del programa informático FatiScan: listado ordenado de genes inducidos y reprimidos en la condición problema en comparación con el control. El color del gen indica la categoría funcional a la que pertenece. Las categorías funcionales con un mayor número de genes sobre-expresados o reprimidos se considera que presentan una expresión diferencial.

### 3.1 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado asintomático T385

En las plantas de NA inoculadas con el aislado asintomático T385, a los 4 meses p.i. se determinaron veinticuatro categorías funcionales sobre-expresadas y seis categorías reprimidas (Fig. 4.4). Estas categorías funcionales se podían agrupar como se indica en la tabla 4.2.

Dentro de las categorías funcionales asociadas con la **fotosíntesis** observamos cuatro genes inducidos que codifican para proteínas de la familia de unión a clorofilas A y B ( $M = 1.58$ ,  $M = 1.59$ ,  $M = 1.43$ ,  $M = 1.41$ ), que son constituyentes de los complejos captadores de luz, y tres genes tipo apoproteína A1 del Fotosistema P700 ( $M = 1.55$ ,  $M = 1.32$ ,  $M = 1.16$ ) que actúan como donantes de electrones. Relacionado también con la fotosíntesis, el **metabolismo de los azúcares** se encuentra inducido en las hojas de NA inoculado con el aislado T385. Dentro de la categoría funcional de la **glucólisis** encontramos sobre-expresados los genes que codifican la gliceraldehido-

3-fosfato deshidrogenasa ( $M = 2.04$ ) y la malato deshidrogenasa ( $M = 1.89$ ), y en la de la ruta de reducción de las **pentosas fosfato** se hallan inducidos los genes de la transcetolasa ( $M = 1.63$ ) y el precursor de la sedoheptulosa-1,7-bis fosfatasa ( $M = 2.38$ ), enzima del ciclo de Calvin cuya sobre-expresión estimula la fotosíntesis (Lefebvre, *et al.*, 2005).



**Fig. 4.4** Categorías funcionales diferencialmente expresadas en plantas de naranjo amargo infectadas con el aislado T385 en comparación con las plantas control a los 4 meses p.i. El análisis se efectuó mediante el programa informático FatiScan. En rojo se muestran las categorías funcionales sobre-expresadas y en azul las reprimidas.

Dentro de las categorías funcionales relacionadas con la pared celular se encuentran sobre-expresados genes de proteínas que participan en la **biosíntesis de la pared celular** como la familia de xiloglucan endotransglicosilasas ( $M = 3.58$  hasta  $M = 1.1$ ), las proteínas tipo 19-1-5 inducidas por siringólido ( $M = 2.92$ ,  $M = 5.54$ ), o genes que codifican para proteínas multifuncionales como las proteínas tipo germina ( $M = 1.35$ ). Finalmente, entre las categorías funcionales relacionadas con la

**respuesta al estrés** que se hallan inducidas, la más interesante para nuestro estudio es la relacionada con el estrés oxidativo, ya que ésta se activa como respuesta directa a la infección viral. Los genes más destacados en esta categoría son los que codifican para las proteínas tipo peroxidasas (M = 2.55, M = 1.42), triptófano sintasas (M = 2,49), alil-alcohol deshidrogenasas (M = 1.93, M = 1.69, M = 1.11) y calreticulinas (M = 1.17, M = 1.10).

Por otro lado, las categorías funcionales relacionadas con el **citoesqueleto** y el **transporte** en general se encuentran reprimidas. Genes que codifican proteínas constituyentes del complejo de la tubulina (alfa y beta tubulina) se encuentran ligeramente reprimidos, al igual que los que codifican proteínas relacionadas con el transporte en general como es el caso de la familia de las copinas (M = - 1.11).

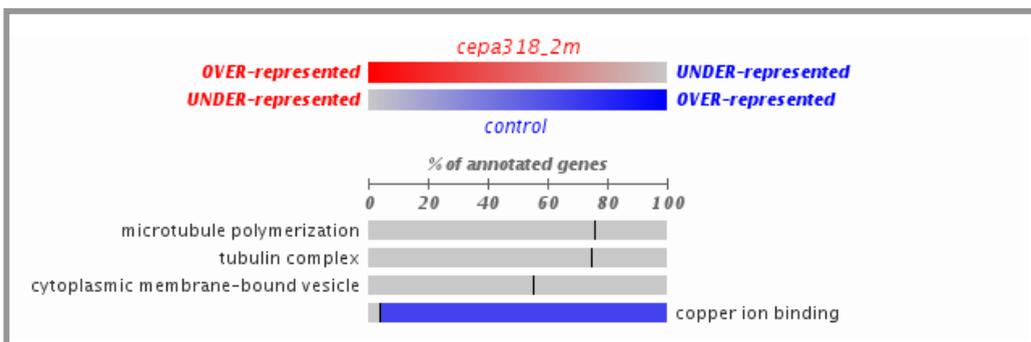
**Tabla 4.2** Agrupación de las categorías funcionales diferencialmente expresadas en plantas de naranja amargo inoculadas con el aislado T385 de CTV

CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBRE-EXPRESADAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T385:	CATEGORÍAS FUNCIONALES REPRIMIDAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T385:
<b>METABOLISMO AZUCARES</b>	<b>CITOESQUELETO</b>
Glicólisis	Polimerización microtúbulos
Ciclo reductor de la pentosa fosfato	Complejo tubulina
<b>FOTOSÍNTESIS</b>	<b>TRANSPORTE</b>
Fotosíntesis, captación de la luz	Transporte
Proteínas de enlace a cromóforos	Actividad de transporte
Membrana interna del cloroplasto	<b>OTROS</b>
Membrana tilacoidal del cloroplasto	Unión a nucleótidos
Fotosíntesis	
Fotosistema I	
Fotosistema II	
Actividad <i>plastoquinol/plastocianina</i>	
<i>Cloroplasto</i>	
<b>PARED CELULAR</b>	
Pared celular	
Procesos del metabolismo de los glucanos	
Actividad xiloglucan-xiloglucosil transferasa	
Apoplasto	
Biogénesis de la pared celular	
<b>RESPUESTA A ESTRÉS</b>	
Desecación	
Frío	
Estímulos luminosos	
Estrés oxidativo	
<b>OTROS</b>	
Recombinación DNA	
Señalización célula a célula	

## 3.2 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo tras la infección con el aislado sintomático T318A

### 3.2.1 Antes de la expresión del síndrome de SY (pre-SY)

Los grupos funcionales expresados diferencialmente en las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A antes de la producción del síndrome de SY se representan en la figura 4.5 y en la tabla 4.3.



**Fig. 4.5** Categorías funcionales diferencialmente expresadas en las plantas de naranjo amargo infectadas con el aislado T318A antes de la expresión del síndrome de SY (2 meses p.i.) en comparación con las plantas control. El análisis se efectuó mediante el programa informático FatiScan. En azul se representa la categoría funcional reprimida.

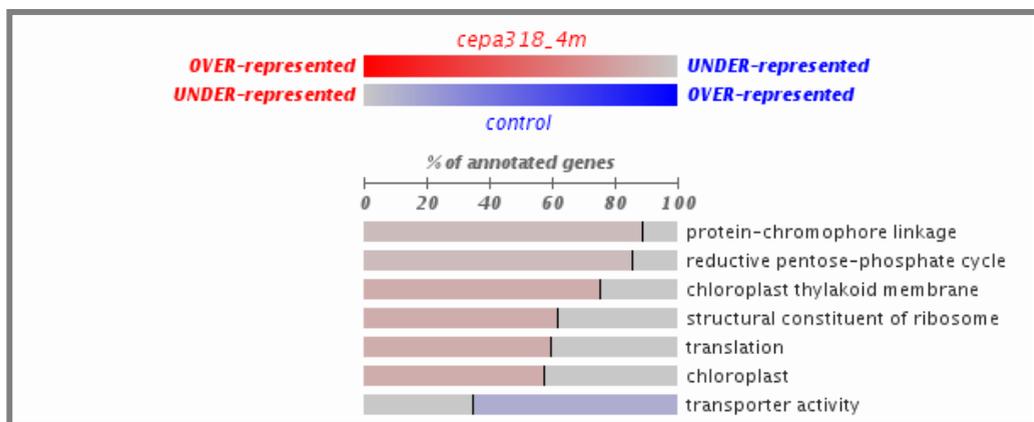
Se observó una ligera inducción de tres categorías funcionales y una acentuada reducción del nivel de expresión de la categoría funcional relacionada con la unión al ión cobre. Las categorías funcionales que se encuentran ligeramente inducidas están relacionadas con el citoesqueleto, y por lo tanto con el movimiento del RNA viral. Estas categorías incluyen genes que codifican componentes del complejo de la tubulina tipo tubulina alfa ( $M = 1.3$  hasta  $M = 1.14$ ) y tubulina beta ( $M = 1.52$  hasta  $M = 1.29$ ). Por el contrario, seis genes que codifican proteínas tipo metalotionina ( $M = -2.6$  hasta  $M = -1.12$ ) y otros tres que codifican proteínas componentes del complejo de ataque a membranas tipo perforina y complemento C9 ( $M = -2.04$  hasta  $M = -1.31$ ) se encuentran dentro de la categoría funcional reprimida.

**Tabla 4.3** Agrupación de las categorías funcionales diferencialmente expresadas en plantas de naranjo amargo inoculadas con el aislado T318A de CTV antes de la expresión de SY

CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBRE-EXPRESADAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T318A PRE-SY:	CATEGORÍAS FUNCIONALES REPRIMIDAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T318A PRE-SY:
<b>CITOESQUELETO</b>	<b>OTROS</b>
Polimerización microtúbulos	Unión al ión cobre
Complejo tubulina	
<b>OTROS</b>	
Membrana de las vesículas citoplasmáticas	

### 3.2.2 Tras la expresión del síndrome de SY (4 meses p.i)

Las plantas de NA con el síndrome de SY muestran hojas cloróticas de tamaño reducido y detención del crecimiento. En esta etapa de la infección se identificaron siete categorías funcionales con expresión diferenciada en comparación con las plantas control (Fig. 4.6 y Tabla 4.4).



**Fig. 4.6** Categorías funcionales expresadas diferencialmente en plantas de naranjo amargo infectadas con el aislado T318A mostrando el síndrome de SY (4 meses p.i.) en comparación con las plantas control. El análisis se efectuó mediante el programa informático FatiScan. En rojo-morado se muestran las categorías funcionales sobre-expresadas y en azul-morado las reprimidas.

Se observó inducción de las categorías funcionales relacionadas con la **fotosíntesis** y la **traducción** y una represión de las relacionadas con el **transporte**. Dentro de las categorías relacionadas con la fotosíntesis se observó la inducción de genes que codifican proteínas tipo apoproteína A1 del fotosistema I P700 ( $M = 1.47$  hasta  $M = 1.28$ ), proteínas tipo unión a clorofila A y B ( $M = 1.57$  hasta  $M = 1.34$ ) y precursor de la sedoheptulosa-bifosfatasa ( $M = 1.98$ ). Asimismo, se identificaron genes inducidos relacionados con los ribosomas y la traducción de proteínas, siendo

los más destacados los que codifican la ubiquitina ( $M = 2.25$ ) y proteínas de extensión y de fusión con la ubiquitina ( $M = 1.36$ ,  $M = 1.22$ ). Por otro lado, entre los genes reprimidos relacionados con el transporte en general se observaron algunos que codifican proteínas tipo longinas y copinas ( $M = -1.74$ ,  $M = -1.18$ ).

**Tabla 4.4** Agrupación de las categorías funcionales diferencialmente expresadas en plantas de naranjo amargo inoculadas con el aislado T318A de CTV mostrando SY

CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBRE-EXPRESADAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T318A SY:	CATEGORÍAS FUNCIONALES REPRIMIDAS EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON EL AISLADO T318A SY:
<b>FOTOSÍNTESIS</b>	<b>TRANSPORTE</b>
Ciclo reductor de la pentosa fosfato	Transporte
Proteínas de enlace a cromóforos	
Membrana tilacoidal del cloroplasto	
Cloroplasto	
<b>TRADUCCIÓN</b>	
Constituyentes estructurales de los ribosomas	
Traducción	

### 3.2.3 Cambios en el transcriptoma de naranjo amargo inoculado con el aislado T318A asociados con la expresión del síndrome de SY

En primer lugar se realizó un contraste mediante el paquete informático Limma para determinar los genes que se expresaban diferencialmente antes y después de manifestar el síndrome de SY en plantas de NA inoculadas con el aislado T318A. No se detectó ningún gen cuya expresión fuera significativamente distinta en el contraste de las dos condiciones. Por ello se procedió a analizar con el programa FatiScan las categorías funcionales que se expresaban diferencialmente en las dos etapas de la infección. Se identificaron un total de 15 categorías funcionales expresadas diferencialmente en las etapas pre-SY y SY (Tabla 4.5). Las 13 categorías funcionales sobre-expresadas en la etapa pre-SY en comparación con la etapa SY estaban principalmente relacionadas con el **metabolismo** y **producción de energía**, **biosíntesis de la pared celular** y **transporte**; mientras que la principal categoría funcional sobre-expresada en la etapa SY era la de **unión al ión cobre**.

**Tabla 4.5** Agrupación de las categorías funcionales diferencialmente expresadas en las etapas pre-SY y SY de plantas de NA infectadas con el aislado T318A de CTV.

CATEGORÍAS FUNCIONALES MÁS EXPRESADAS EN LA ETAPA PRE-SY QUE EN LA ETAPA SY	CATEGORÍAS FUNCIONALES MÁS EXPRESADAS EN LA ETAPA SY QUE EN LA ETAPA PRE-SY
<b>METABOLISMO</b>	<b>OTROS</b>
Actividad GTPasa	Unión al ion cobre
Actividad racemasa y epimerasa sobre los carbohidratos y derivados	Respuesta a las proteínas de floración
Actividad UDP-glucosa 6-deshidrogenasa	
<b>PARED CELULAR</b>	
Pared celular	
Procesos del metabolismo de los glucanos	
Actividad xiloglucan-xiloglucosil transferasa	
Apoplasto	
Biogénesis de la pared celular	
<b>TRANSPORTE</b>	
Complejo SNARE	
Complejo tubulina	
<b>OTROS</b>	
Respuesta al agua	
Desarrollo embrionario	
Respuesta al ácido abscísico	

### 3.3 Validación de los resultados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Para validar mediante q-RT-PCR los resultados obtenidos en los experimentos con micromatrices se escogieron los siguientes genes:

- el gen de una peroxidasa, enzima relacionado con el estrés oxidativo, que aparece sobre-expresado en las plantas de NA infectadas por ambos aislados de CTV en comparación con el control sano.
- el gen que codifica una metalotionina, proteína que participa en la unión al ión cobre, que se encuentra reprimido en las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A antes de la inducción del síndrome de SY.
- el gen que codifica una xiloglucan endotransglicosilasa, enzima que participa en la biosíntesis de la pared celular y que se encuentra sobre-expresado en las plantas de NA infectadas con los aislados T385 y T318A cuando no presentan síntomas (T318A pre-SY), pero reprimido en las plantas de NA inoculadas con T318A que presentan el síndrome de SY.
- el gen que codifica una proteína de la familia 17 de las glicosil-hidrolasa, transglicosilasas que participan en la hidrólisis de la pared celular que no presenta ninguna expresión diferencial significativa en ninguna de las condiciones de estudio.

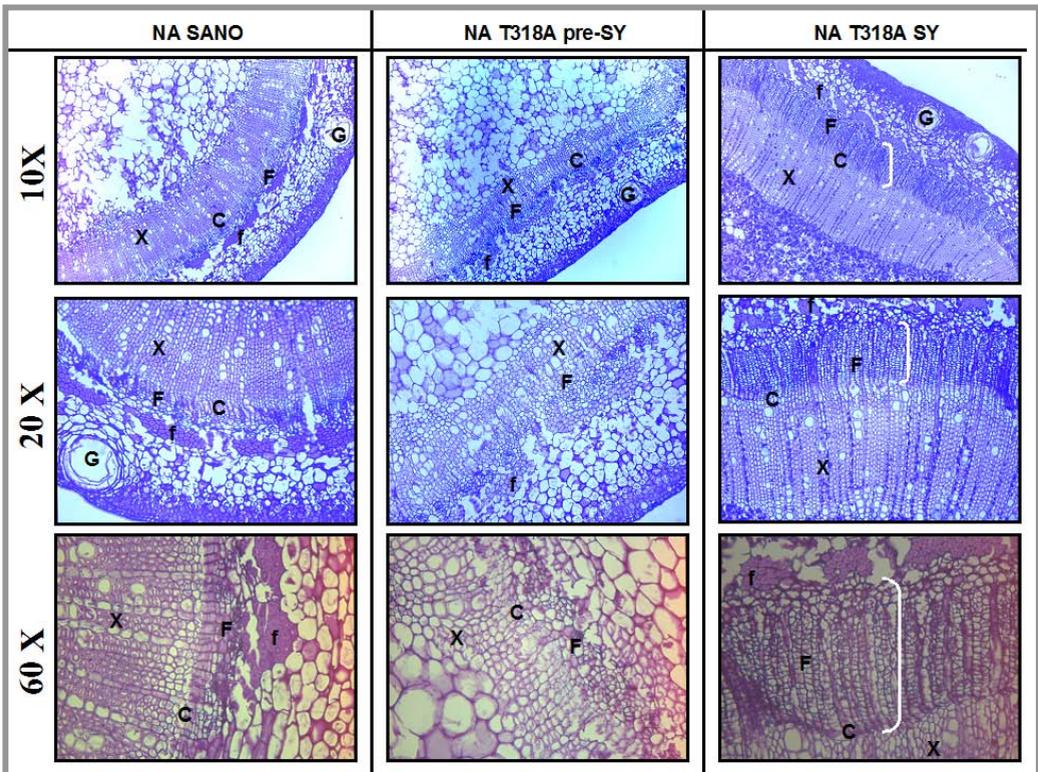
En la tabla 4.6 se indican los valores M obtenidos para cada gen en los respectivos experimentos realizados con micromatrices y los valores de expresión relativa (problema/control) obtenidos mediante q-RT-PCR. Como se puede observar, los genes que estaban inducidos en la micromatriz presentan también una expresión relativa mayor que uno en el experimento de q-RT-PCR (véase el gen de la peroxidasa y el gen de la xiloglucan endotransglicosilasa), mientras que los genes que estaban reprimidos en la micromatriz en comparación con el control, obtenían una expresión relativa inferior a uno (véase gen que codifica para proteína tipo metalotionina). Por otro lado, el gen de la proteína de la familia 17 de las glicosil hidrolasa no presentaba ninguna expresión diferencial significativa ni en la micromatriz ni en los ensayos de q-RT-PCR. En la tabla 4.6 no se indica la expresión relativa de los genes de la peroxidasa y de la proteína de la familia 17 de las glicosil hidrolasa entre las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A pre-SY y SY, ni la expresión relativa del gen de la proteína tipo metalotionina entre las plantas inoculadas con el aislado T385 y las plantas sanas, por no presentar una expresión diferencial en la micromatriz y no disponer de su valor M.

**Tabla 4.6.** Validación de los resultados obtenidos en las micromatrices mediante q-RT-PCR

Nº IDENTIFICACIÓN Citrus EST	Máx. homología Arabidopsis	T385 vs. SANO		T318 PRE SY vs. SANO		T318 SY vs. SANO		T318 PRE SY vs. SY	
		VALOR M	RATIO q-RT-PCR	VALOR M	RATIO q-RT-PCR	VALOR M	RATIO q-RT-PCR	VALOR M	RATIO q-RT-PCR
C31010D03	<i>peroxidasa</i>	2.55	8.34	3.12	14.19	2.75	14.42	-----	-----
C07006D07	<i>proteína tipo metalotionina</i>	-----	-----	-5.50	0,04	-1.67	0,33	-6.2	0,13
ICOAAA26D B08	<i>proteína familia 17glicosilhidrolasa</i>	-1.01	0.69	-1.07	0.67	-1.16	0.77	-----	-----
C05133B06	<i>xiloglucan endotransglicosilasa</i>	3.58	6.21	4.79	2.59	-1.35	0.85	4	3.05

### 3.4 Histopatología de naranjo amargo infectado con el aislado sintomático

Con el fin de observar si la sobre-expresión de los genes relacionados con la síntesis de la pared celular en la etapa pre-SY daba lugar a modificaciones histopatológicas visibles, se realizaron cortes histológicos de corteza de NA infectado con el aislado T318A en ambas etapas (pre-SY y SY) y de NA sano, se hizo una tinción de carbohidratos por el método del ácido peryódico-Schiff (Jensen, 1962) y se observaron al microscopio óptico. En comparación con la etapa pre-SY y las plantas sanas usadas como control, las plantas inoculadas con el aislado T318A que mostraban el síndrome de SY presentaban hiperplasia del floema, que aparecía con mayor espesor, y colapso de las células del parénquima cortical y del floema (Fig. 4.7).



**Fig. 4.7** Cortes histológicos de la brotes de NA sano o infectado con el aislado T318A de CTV, antes (pre-SY) o después (SY) de la expresión de síntomas, teñidos con el reactivo de Schiff. X: xilema, C: cambium, F: floema; f: fibras, G: glándulas de aceite. Se indica con un corchete blanco la hiperplasia del floema observada en la corteza de NA que manifiesta el síndrome de SY.

#### 4. DISCUSIÓN

La infección viral es un fenómeno complejo cuyo desarrollo varía en función del virus y del huésped (incluso en función de la combinación huésped-cepa del virus), estadio de desarrollo de la planta en el momento de la infección y de las condiciones ambientales (Matthews, 1991). El empleo de la genómica funcional supone una nueva herramienta para diseccionar los procesos biológicos que ocurren como consecuencia de la interacción entre la planta y el patógeno en el transcurso de la infección (Ramonell y Somerville, 2002; Koltai y Volpin, 2003). El desarrollo de esta interacción determina finalmente la capacidad del virus para infectar la planta o la resistencia de ésta a la infección.

La inoculación de plantas de semilla de NA con el aislado T385 dio lugar a una infección asintomática con una acumulación viral mucho más lenta que en otras especies huésped (ver Capítulo I). De hecho, la carga viral en la primera brotación estaba en el límite de detección con q-RT-PCR. Pese a la baja carga viral, las micromatrices de cDNA permitieron identificar categorías funcionales sobre-expresadas o reprimidas en hojas de NA inoculado con este aislado. Las categorías funcionales inducidas estaban principalmente relacionadas con la fotosíntesis y el metabolismo de azúcares. En un estudio previo con plantas de LM inoculadas con este mismo aislado de CTV, que también es esencialmente asintomático en este huésped, Gandía *et al.*, (2007) no observaron alteraciones significativas en el transcriptoma de las plantas inoculadas en comparación con las sanas. Esta diferencia de comportamiento entre los dos huéspedes podría ser debida al menos a dos factores: i) el análisis de las plantas de LM se efectuó con una micromatriz mucho más reducida que la utilizada para el NA (6875 frente a 21.081 unigenes) (Forment *et al.*, 2005; Martínez-Godoy *et al.*, 2008), que no contenía algunos de los genes diferencialmente expresados en este trabajo, y ii) como se ha visto en los capítulos anteriores las interacciones del aislado T385 con NA y LM son muy diferentes. Sin embargo, Gandía *et al.*, (2007) observaron que plantas de LM infectadas con un aislado virulento de CTV también mostraban inducción de genes asociados con la fotosíntesis y el metabolismo de azúcares como los que codifican clorofilasa I, proteínas de unión a clorofila A y B o la sucrosa sintasa. Un aumento de la glicólisis y de la ruta de las pentosas fosfato genera un aumento de precursores de la ruta del ácido siquímico, que es la base para la síntesis de aminoácidos aromáticos, muchos

de ellos implicados en la defensa frente a patógenos (Taiz y Zeiger, 2006), por lo que no es de extrañar que se induzca el metabolismo de azúcares como respuesta a la infección viral. Diferencias en los procesos metabólicos entre los tejidos sanos e infectados por virus, incluyendo el metabolismo de lípidos y azúcares, los niveles de fotosíntesis, respiración y transpiración, han sido descritas previamente (Matthews, 1991). Técsi *et al.* (1994) observaron que después de la infección viral aumentaba la capacidad fotosintética de las células contiguas a las células infectadas, lo que iba acompañado de una acumulación de almidón inmediatamente detrás del frente de la infección. Estos autores concluyeron que el aumento en la capacidad de fotosíntesis proporcionaba la fuente necesaria de carbono para soportar la síntesis de los productos virales y observaron que categorías funcionales relacionadas con la biosíntesis de la pared celular también se encontraban activadas (Técsi *et al.*, 1996). El reforzamiento y engrosamiento de la pared celular como respuesta a la infección de patógenos ha sido observado por otros autores (Kawasaki *et al.*, 2006). Cristofani-Yaly *et al.*, (2007) observaron que genes relacionados con la pared celular, concretamente con la síntesis de lignina estaban inducidos en plantas de *Poncirus trifoliata*, una especie resistente a CTV, inoculadas con un aislado virulento de este virus. En nuestros análisis también se observó que genes que codifican para proteínas multifuncionales tipo germinas, incluidas en la categoría funcional de pared celular, estaban sobre-expresados. Estas proteínas participan en la remodelación de la pared celular, pero a la vez pueden actuar directamente contra los patógenos y tener un papel protector (Park *et al.*, 2004). Distintos estudios han demostrado la activación de estas proteínas como respuesta a la infección por virus (Park *et al.*, 2004; Cristofani-Yali *et al.*, 2007; Gandía *et al.*, 2007; Irian *et al.*, 2007; Elivira *et al.*, 2008; Gasca-González, *et al.*, 2008)

Por último, distintas categorías relacionadas con la respuesta a estrés estaban también inducidas. La inducción de genes relacionados con el estrés biótico y abiótico es un denominador común de las infecciones virales (Dardick *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008). Este es el caso de los genes agrupados en la categoría funcional de respuesta al estrés oxidativo como los que codifican peroxidasas y alil-alcohol deshidrogenasas. Dentro de esta categoría funcional también se encontraron inducidos genes que codifican para proteínas multifuncionales como la calreticulina, cuya sobre-expresión inhibe el movimiento célula a célula de virus (Boevink y Oparka, 2005). La inducción

de este gen parece coherente con la limitación del movimiento célula a célula de CTV observada en NA, especialmente al inicio de la infección.

Por otro lado, las categorías funcionales reprimidas en las plantas de NA inoculadas con T385 se relacionaban con el citoesqueleto y el transporte en general. Diversos estudios (Boyko *et al.*, 2000; Más y Beachy, 2000) identificaron el papel del citoesqueleto en el transporte del RNA viral. Así, la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV), además de unirse al RNA viral, se asocia a componentes del citoesqueleto (microfilamentos y microtúbulos) y retículo endoplásmico de la célula infectada (Reichel *et al.*, 1999; Oparka, 2004; Waigmann *et al.*, 2004; Voinnet, 2005, Boevink y Oparka, 2005). Boyko *et al.*, (2007) describieron un modelo donde inicialmente las proteínas de movimiento virales formaban un complejo con los microtúbulos y en etapas posteriores se acumulaban en éstos para su estabilización (Boyko *et al.*, 2000; Ashby *et al.*, 2006). De nuevo, la represión de esta categoría funcional en plantas de NA infectadas con T385 es coherente con la limitación del movimiento viral al inicio de la infección observada en capítulos anteriores. También se observó una expresión reducida de genes que codifican proteínas de la familia de las copinas. Estas proteínas participan en el control del crecimiento, en la respuesta al descenso de la humedad y frente a patógenos y se ha descrito su papel en el control negativo de la muerte celular y la defensa mediada por los genes de resistencia (R) (Hua *et al.*, 2001; Jambunathan *et al.*, 2001; Yang y Hua 2004; Yang *et al.*, 2006).

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que, aunque el aislado T385 es asintomático en NA, la infección en dicho huésped altera procesos biológicos relacionados con la defensa frente a estreses bióticos y abióticos y con el movimiento célula a célula. Este resultado contrasta con observaciones anteriores en otros sistemas virus-huésped o en el sistema CTV-LM en los que el número de genes diferencialmente expresados aumentó con la intensidad de los síntomas inducidos (Dardick, 2007; Gandía *et al.*, 2007), lo que ilustra de nuevo la distinta interacción observada en capítulos anteriores entre CTV y NA en comparación con otros huéspedes cítricos.

En las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A, antes y después de la manifestación del síndrome de SY, las categorías funcionales inducidas o reprimidas no fueron tan numerosas como en las plantas infectadas con el aislado asintomático

T385. No obstante, como ya se ha mencionado, el hecho de que un tratamiento altere un número menor de categorías funcionales no significa que existan pocos genes inducidos o reprimidos, sino que los genes diferencialmente expresados no se agrupan en las mismas categorías funcionales.

En la etapa pre-SY de la infección con T318A, la categoría funcional de genes que codifican proteínas relacionadas con la de unión al ión cobre aparece reprimida en comparación con las plantas sanas y con las que manifestaban el síndrome de SY. Los genes predominantes en esta categoría codifican metalotioninas (MT), que son un grupo de proteínas caracterizadas por tener un alto contenido en cisteínas capaces de unir metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002). La presencia de varios metales, así como diversos factores fisiológicos y patológicos inducen la síntesis de estas proteínas. Choi *et al.*, (1996), sugirieron que las MT inducidas por heridas o por patógenos podían tener un papel en la regulación de los iones metálicos, que afectan la acumulación de radicales libres derivados del estrés oxidativo. Diversas observaciones indican que tras el reconocimiento de un patógeno por la planta, la señalización de defensa celular conlleva la acumulación inicial de formas reactivas de oxígeno (ROS) y en esta fase inicial la producción de MT está reprimida. De hecho Wong *et al.*, (2004) observaron que plantas de arroz en las que se sobre-expresaba la MT OsMT2b o en las que se suprimía la represión de este gen por otra proteína presentaban mayor susceptibilidad frente a varios patógenos. Estos resultados sugieren que la represión de metalotioninas en la etapa pre-SY de las plantas inoculadas con el aislado T318A podría ir dirigida a facilitar la señal de defensa de la planta mediante inducción del estrés oxidativo tras el reconocimiento de CTV. En fases posteriores de la infección esta represión inicial se atenuaría o desaparecería para limitar la acumulación de ROS. La misma categoría funcional incluye genes que codifican proteínas componentes del complejo de ataque a membranas tales como perforinas o el complemento 9 (MACPF). Estudios con mutantes del gen CAD1 de *Arabidopsis*, que contiene un dominio MACPF, mostraron que además de regular negativamente la muerte celular mediada por el ácido salicílico, este gen controlaba el movimiento viral a larga distancia, ya que los mutantes de este gen presentaban restricciones a dicho movimiento (Morita-Yamamuro, 2005). Por tanto, la represión de estos genes en NA podría explicar en parte las limitaciones observadas en el movimiento de CTV.

En contraste con las plantas infectadas con el aislado T385, las plantas de NA infectadas con T318A presentaban en la etapa pre-SY de la infección una ligera sobre-expresión de las categorías funcionales relacionadas con el citoesqueleto. Como se ha indicado anteriormente, dentro de esta categoría se incluyen genes que participan en la formación del citoesqueleto y por lo tanto relacionados con el movimiento del RNA viral. Esta diferencia de reacción del NA frente a los dos aislados de CTV es coherente con las observaciones del Capítulo I que mostraban que la acumulación de T318A en las plantas infectadas era más rápida que la del aislado T385.

En la etapa de expresión del síndrome SY las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A mostraban las categorías funcionales relacionadas con la fotosíntesis y la traducción de proteínas sobre-expresadas, y reprimidos los genes relacionados con el transporte en general. Gandía *et al.*, (2007) también observaron que las plantas de LM infectadas con un aislado virulento de CTV tenían inducidos genes relacionados con la fotosíntesis, como los que codifican proteínas de unión a clorofila A y B, y relacionadas con la síntesis y degradación de las proteínas, como los que codifican proteínas ribosomales, proteasas y ubiquitinas. Un análisis del transcriptoma de soja después de la infección viral sugirió que el aumento en la expresión de proteínas ribosomales podría ser una respuesta de las células del huésped para compensar los componentes que utiliza el virus para la replicación y traducción de su genoma (Babu *et al.*, 2008).

El contraste entre las categorías funcionales diferencialmente expresadas antes y después de la manifestación del síndrome de SY en hojas de NA infectadas con el aislado T318A permitió identificar categorías funcionales potencialmente relacionadas con la inducción de este síndrome. Así, las categorías funcionales relacionadas con la pared celular estaban más expresadas en la etapa pre-SY que en la etapa SY. Esta observación sería coherente con el desarrollo de síntomas de hiperplasia en el floema tal y como se observó en cortes histológicos de brotes con SY, ya que esta hiperplasia podría ser consecuencia de una sobre-expresión de los genes relacionados con la pared celular en la primera etapa de la enfermedad. En distintos estudios se ha observado que el desarrollo de la sintomatología va asociado con una represión de los genes relacionados con la pared celular (Shimizu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008). La clorosis característica de las hojas con el síndrome

de SY podría ser debida en parte a una reducción en esta etapa de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los azúcares e indirectamente con la fotosíntesis (Técsi *et al.*, 1994, 1996; Maule *et al.*, 2002; Pompe-Novak *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008).

Curiosamente en ninguna de las plantas infectadas de NA se observó sobre-expresión de genes relacionados con el silenciamiento, lo que apoya la idea expuesta en los capítulos anteriores de que en NA la activación de la defensa frente a CTV mediada por el silenciamiento de RNA no se activa hasta etapas tardías de la infección viral. Las categorías funcionales que incluyen otros genes relacionados con la defensa y la virulencia, que en muchos estudios se encuentran sobre-expresados tras la infección viral (Golem y Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003, 2006; Babu *et al.*, 2008), como los que codifican las proteínas de choque térmico (*heat shock protein*, HSP) relacionadas con el estrés, las proteínas relacionadas con la patogenicidad PR1, PR2 ( $\beta$ -1,3- glucanasa), PR3 (quitinasa), PR4, PR5 (proteínas tipo taumatina), o los factores de transcripción de la familia WRKY, tampoco estaban activados en las plantas infectadas de NA, lo que sugiere un retraso en la activación de los mecanismos generales de defensa, o que dicha activación tuvo lugar a niveles no significativos en nuestras condiciones.

Se ha observado que algunas proteínas asociadas a la repuesta de defensa de la planta como  $\beta$ -1,3-glucanasa o las proteínas de choque térmico (HSP) tienen un papel beneficioso en el ciclo viral y una sobre-expresión de los genes correspondientes puede incrementar el movimiento viral (Boevink y Oparka, 2005; Dardick, 2007;). También se ha observado que durante la respuesta hipersensible (HR) se deposita callosa (1-3 glucanos) para cerrar los plasmodesmos y evitar la diseminación viral (Wolf *et al.*, 1991; Beffa *et al.*, 1996; Iglesias y Meins, 2000; Bucher *et al.*, 2001). De hecho la proteína TGB2 del virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) interactúa con la  $\beta$ -1,3-glucanasa, una enzima que degrada de callosa para acelerar su degradación y permitir el paso de PVX por los plasmodesmos (Fridborg *et al.*, 2003). Por tanto, la no activación de estos genes sería coherente con la limitación al movimiento viral advertida en los capítulos anteriores.

La micromatriz utilizada contenía los potenciales genes de resistencia a CTV identificados en *Poncirus trifoliata*, que confieren a este huésped resistencia frente a un amplio espectro de genotipos de CTV (Gmitter *et al.*, 1996). Esta resistencia se

localizó en una región de 282.699 pb del genoma que incluía 22 genes (Ctv.1 al Ctv.22) (Yang *et al.*, 2003). En ninguna de las plantas de NA infectadas se observó expresión diferencial de estos genes.

Una limitación metodológica de los experimentos desarrollados es que en ellos se utilizó RNA de una mezcla de hojas que, dada la lenta invasión del NA por CTV y la distribución del virus en células aisladas (Capítulo III de esta memoria; Folimonova *et al.*, 2008), contenían células no infectadas y otras en distintas etapas del ciclo infectivo. Esto implica que el mRNA de genes que están alterados solamente en una zona determinada de la hoja, en un estado específico del desarrollo o en un tipo concreto de células, aparecerá diluido y se detectará como un cambio pequeño o inapreciable (Dardick, 2007; Babu *et al.*, 2008). A pesar de estas limitaciones, las micromatrices de cDNA permitieron determinar categorías funcionales diferencialmente expresadas en NA como resultado de la infección de un aislado asintomático de CTV (T385) y otro inductor de SY (T318A), y en este último caso detectar diferencias en la expresión de genes en la etapa inicial de la infección y tras la aparición del síndrome de SY. Los cambios observados en el transcriptoma del NA tras la infección son coherentes con las observaciones previas de que i) hay una limitación del movimiento viral en las etapas iniciales de la infección, y ii) en el huésped NA existe un retraso en la activación de los mecanismos de defensa y silenciamiento del RNA viral. También pueden explicar en parte la clorosis foliar y los efectos citopáticos observados en brotes con síntomas de SY.





## **DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

La diversidad de síntomas que CTV es capaz de inducir en función de las especies infectadas y de los aislados virales indican que probablemente hay muchos factores implicados en la interacción CTV-cítricos. A largo plazo, el control de los daños causados por el virus requiere un conocimiento detallado de esta interacción que permita en su caso una manipulación apropiada de la misma para reducir los efectos indeseados. En particular, el conocimiento de las interacciones de CTV con el naranjo amargo podrían ser la base para una hipotética recuperación de su uso como patrón, ya que ninguno de los patrones tolerantes al decaimiento iguala sus cualidades agronómicas. Como primera etapa para el estudio de dichas interacciones en este trabajo se compararon las pautas de distribución y acumulación viral, la actividad replicativa y el silenciamiento del virus en naranjo amargo (NA) y en varias especies susceptibles [lima Mexicana (LM), *Citrus macrophylla* (CM) y naranjo dulce (ND)] infectadas con aislados de CTV de distinta virulencia. Se incluyó un aislado prácticamente asintomático (T385), uno que induce los síndromes de decaimiento (D) sobre patrón NA y *seedling yellows* (SY) (T36), y dos que además de D y SY inducen el síndrome de acanaladuras en la madera (AM) en pomelo y ND. El estudio se completó con un análisis preliminar de los cambios que ocurren en el transcriptoma del NA tras la infección con un aislado asintomático o uno inductor de SY.

La cuantificación de la carga viral de cada aislado en los distintos huéspedes puso de manifiesto que ésta no va asociada con la intensidad de los síntomas inducidos. Así, la carga viral en ND del aislado asintomático T385 fue similar a la del aislado T388, que induce AM en este huésped, y a su vez, aunque el aislado T388 induce en LM síntomas mucho más intensos que en ND, la carga alcanzada en este último huésped fue mayor que en el primero. La acumulación de T36 en cualquiera de los huéspedes fue menor que la de los demás aislados incluido T385, pese a que este último es asintomático y T36 induce los síndromes D y SY. Estos datos sugieren que la virulencia de CTV no es una consecuencia directa de la acumulación viral.

Asimismo, la evaluación temporal de la carga viral mostró que la cinética de acumulación era distinta en NA y en los demás huéspedes. En LM, CM y ND la máxima carga viral para todos los aislados se observó al final de la primera brotación, mientras que la acumulación en NA aumentó de forma progresiva durante la infección con una rapidez variable según los aislados. Estos resultados indicaban que NA

ofrecía una resistencia inicial a la invasión por CTV que se superaba en el curso de la infección.

Estas diferencias en la cinética de acumulación viral podían ser consecuencia, entre otros factores, de diferencias en la tasa de replicación del virus o en la intensidad del silenciamiento génico mediado por RNA por parte del huésped. La evaluación de la actividad replicativa basada en la acumulación de los sgRNAs de los genes *p20* y *p23* puso de manifiesto que las pautas de acumulación viral de los aislados en los distintos huéspedes estaban asociadas con las de acumulación de sgRNAs. Así, en los huéspedes más susceptibles (ND, CM y LM) se observó la mayor actividad replicativa en la primera brotación, y la estabilización de la carga viral se asoció con una menor actividad replicativa, mientras que en NA la actividad replicativa aumentó durante la infección viral a medida que se incrementaba la carga viral. En LM, que mostró una acumulación de sgRNAs más baja que los otros huéspedes susceptibles al final de la primera brotación, se observó que la máxima carga viral se alcanzaba en un estadio más temprano de la brotación que en NA o ND.

El análisis de la acumulación de siRNAs derivados de CTV, normalizada con respecto a la carga viral, también reveló diferencias entre NA y los otros huéspedes estudiados. Mientras en LM, CM y ND la presencia de siRNAs de CTV se detectaba en la primera brotación y en algunos huéspedes alcanzaban su nivel máximo de acumulación, en NA sólo se detectaban más tarde y en el caso del aislado T385 no se detectaron hasta dos años después de la inoculación, lo que sugería: i) que para activar el silenciamiento de CTV sería necesario alcanzar un umbral mínimo de carga viral que en NA se alcanza más tarde que en los otros huéspedes, y ii) que la resistencia inicial observada en NA no sería consecuencia de procesos relacionados con el silenciamiento viral. Los valores normalizados de siRNAs mostraron una mayor intensidad del silenciamiento para el aislado T36 en todos los huéspedes estudiados, lo que explicaría la baja acumulación viral alcanzada para este aislado en todos los casos.

Para contrarrestar los mecanismos de silenciamiento de la planta, los virus expresan proteínas supresoras del silenciamiento que les permiten efectuar una invasión sistémica. Las diferencias de acumulación viral observadas en las distintas combinaciones aislado/huésped, y en particular la baja acumulación de T36 en todos

los huéspedes, podrían ser resultado de diferencias en la eficiencia de supresión del silenciamiento por parte de estas proteínas. De las tres proteínas de CTV con actividad supresora en *N. benthamiana* y *N. tabacum* (p25, p20 y p23) (Lu *et al.*, 2004), p23 es un posible determinante de patogenicidad en cítricos (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005; Albiach-Martí *et al.*, 2009), por lo que probablemente también actúa como supresor de silenciamiento en estas especies. Los ensayos de expresión transitoria de p23 en hojas de *N. benthamiana* 16c no mostraron diferencias en la capacidad supresora de los distintos aislados, por lo que el comportamiento diferencial de los mismos aislados no pudo asociarse con diferencias en la proteína p23. Sin embargo, tampoco puede excluirse esta posibilidad, ya que la actividad supresora en *N. benthamiana* 16c y en un huésped cítrico podría no ser la misma (Fagoaga *et al.*, 2005).

Los análisis de replicación, acumulación y silenciamiento viral mostraron un comportamiento diferencial de CTV en NA caracterizado por una resistencia inicial a la infección que no es consecuencia del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA. Por otra parte, se sabe que al menos el aislado T36 replica normalmente en protoplastos de NA (Albiach-Martí *et al.*, resultados no publicados), lo que sugiere que dicha resistencia no ocurre a nivel celular sino probablemente a nivel del movimiento del virus. Los análisis de la distribución de CTV en los distintos tejidos de NA de semilla mediante inmunopresión-ELISA y q-RT-PCR, mostraron una distribución errática que apoya la idea de una limitación en el movimiento del virus, tanto célula a célula como a larga distancia, que retrasa la invasión sistémica. En general, el tejido con menor carga viral fue la raíz, mientras que el título viral en brote y corteza fue similar, excepto en el caso de T36 que mostró en brote menor carga viral que en corteza, que podría ser debido a una limitación de este aislado para alcanzar zonas más distales o un silenciamiento más intenso en el brote joven. De hecho este fue el único aislado en el que la intensidad del silenciamiento en brote fue mayor que en corteza o raíz. Curiosamente el aislado que alcanzó en raíz la mayor carga viral fue T385, pese a que fue el más lento en invadir la copa, lo que podría indicar que al menos para este genotipo la raíz podría actuar como reservorio viral. Esta posibilidad se vería reforzada por el hecho de que este fue el único aislado en el que la intensidad del silenciamiento era menor en raíz que en corteza o brote.

Para caracterizar mejor el posible papel de la raíz como reservorio viral se propagó el NA sobre un patrón resistente (citrange Carrizo) y otro tolerante a CTV (ND) y se analizó la acumulación viral en la copa y en la raíz. El movimiento inicial del virus fue hacia la raíz, incluso cuando el NA estaba propagado sobre citrange Carrizo, un patrón que limita o impide el movimiento célula a célula de CTV. La carga viral de la mayoría de los aislados en la copa resultó independiente de la alcanzada previamente en la raíz, mientras que la del aislado T385 estaba asociada a la misma y su acumulación fue más lenta que en otros aislados, lo que sería coherente con una actuación de la raíz como reservorio viral para este genotipo. El examen histológico de plantas de estas combinaciones infectadas con el clon recombinante de CTV CTV9-GFPC3 (Satyanarayana *et al.*, 2008), que expresa GFP en las células infectadas, puso de manifiesto que, con independencia del patrón utilizado, el NA impone una fuerte limitación al movimiento de CTV, en particular al movimiento célula a célula, confirmando así observaciones publicadas durante el desarrollo de esta tesis (Folimonova *et al.*, 2008).

La infección sistémica de la planta por parte del virus conlleva modificaciones en la expresión del genoma del huésped con el fin de facilitar la infección. La tecnología de las micromatrices de cDNA permitió identificar categorías funcionales sobre-expresadas o reprimidas en hojas de NA inoculadas con el aislado asintomático de CTV T385 a los 4 meses p.i. o con el aislado T318A antes y durante la inducción del síndrome de SY (2 meses y 4 meses p.i.). Las categorías funcionales inducidas tras la infección por el aislado asintomático T385 se relacionaban mayoritariamente con la fotosíntesis, el metabolismo de azúcares, biosíntesis de la pared celular y con la respuesta a estrés. Un aumento de la capacidad de fotosíntesis proporcionaría la fuente necesaria de carbono para soportar la síntesis de los productos virales y podría ayudar al reforzamiento de la pared celular como se ha observado en otros sistemas como respuesta a la infección de patógenos. Por el contrario, las categorías funcionales reprimidas estaban relacionadas con el citoesqueleto y el transporte en general, apoyando las observaciones de que el NA ejerce una limitación inicial al movimiento viral, más acentuada en el caso del aislado T385. Por lo tanto, aunque el aislado T385 no induce síntomas en las plantas de NA, sí altera procesos biológicos en dicho huésped que podrían facilitar su infección.

Por otra parte, la categoría funcional más alterada en las plantas de NA inoculadas con el aislado T318A antes de la aparición del síndrome SY fue la de las proteínas de unión al ión cobre, que incluye genes que codifican metalotioninas y proteínas componentes del complejo de ataque a membranas tipo perforina y complemento C9 (MACPF). Estas últimas controlan el movimiento viral a larga distancia sugiriendo que la represión de estos genes podría limitar el movimiento viral en las plantas de NA. Una vez estas plantas manifestaban el síndrome de SY las categorías funcionales inducidas estaban relacionadas con la fotosíntesis y la traducción de proteínas, mientras que se reprimían genes relacionados con el transporte en general.

El contraste entre las categorías funcionales diferencialmente expresadas antes y después de la aparición del síndrome de SY mostró una represión de los genes relacionados con la síntesis de la pared celular (síntomas foliares), el metabolismo de los azúcares e indirectamente con la fotosíntesis. Estos datos son coherentes con los síntomas de hiperplasia en el floema, detención del crecimiento y clorosis que caracterizan el síndrome SY.

Finalmente, en ninguna de las condiciones estudiadas se observó una expresión diferencial de las categorías funcionales relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta, incluyendo el silenciamiento génico, lo que concuerda con el hecho de que en las plantas infectadas no se observasen siRNAs incluso 1 año después de la inoculación. Por lo tanto, los cambios observados en el transcriptoma del NA tras la infección apoyarían las observaciones previas de que hay una limitación del movimiento viral en las etapas iniciales de la infección y existe un retraso en la activación de los mecanismos de defensa y silenciamiento del RNA viral hasta que se alcanza una carga viral umbral.

Resumiendo, los datos aportados por esta tesis indican que i) la intensidad de los síntomas inducidos por distintos aislados de CTV no está directamente asociada con la acumulación viral en los tejidos infectados, ii) el NA presenta un pauta de replicación y acumulación viral diferente a la de los huéspedes más susceptibles estudiados, iii) el umbral de carga viral necesario para activar el mecanismo de silenciamiento se alcanza más lentamente en NA en comparación con los otros huéspedes, iv) la resistencia observada en NA no es consecuencia del mecanismo de silenciamiento sino a de una limitación de la planta al movimiento viral y vi) esta

limitación que varía con los aislados, debe ser consecuencia de interacción distinta entre los factores del huésped y los de cada aislado de CTV.





## **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

- La intensidad de los síntomas inducidos por distintos aislados de CTV en una especie huésped, o por un determinado aislado en distintas especies huéspedes no está asociada con la acumulación viral. Esta es la primera evidencia de ausencia de correlación entre virulencia y carga viral para un closterovirus en su huésped leñoso.
- Las pautas de acumulación viral de CTV en plantas de semilla de huéspedes susceptibles como lima Mexicana, *Citrus macrophylla* o naranjo dulce difieren de la observada en naranjo amargo. Mientras en los primeros la máxima carga viral se alcanza en la primera brotación, la acumulación en naranjo amargo es generalmente más lenta y la acumulación máxima puede requerir dos o más años.
- La actividad replicativa de los aislados de CTV en los distintos huéspedes aparece asociada a su cinética de acumulación viral, y mientras en los huéspedes susceptibles LM, ND y CM es máxima en la primera brotación, en NA va aumentando en el transcurso de la infección durante 1 año o más.
- La detección de siRNAs de CTV requiere una carga viral umbral, que huéspedes susceptibles LM, ND y CM se alcanza en la primera brotación, mientras que en NA se alcanza muy lentamente.
- El distinto nivel de acumulación viral de los aislados de CTV no pudo asociarse con una capacidad supresora distinta de la proteína p23 en ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*.
- La resistencia inicial del NA a la invasión, acumulación por CTV no es consecuencia del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA, sino de una limitación al movimiento viral, tanto célula a célula como a larga distancia, que retrasa la invasión sistémica y la acumulación viral.

## CONCLUSIONES

---

- La intensidad del silenciamiento en los distintos tejidos de NA varía con los aislados de CTV y afecta la distribución de los mismos en la planta.
- El movimiento inicial de CTV en NA es hacia la raíz y la carga viral alcanzada en este órgano afecta la posterior acumulación en la copa de forma variable según los aislados. Para el genotipo T385 la raíz parece actuar como reservorio viral.
- Los cambios en el transcriptoma de NA durante la infección por CTV confirman la no activación del silenciamiento viral en las etapas iniciales de la infección y apoyan la existencia de una limitación al movimiento viral. Esta resultaría de una interacción ineficiente entre factores del huésped necesarios para el movimiento y otros del virus que varían con los aislados .





## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., Vaucheret, H. (2006) Uncoupled production of ta-siRNAs in hypomorphic  *rdr6* and  *sgs3* mutants uncovers a role for TAS3 in AGO7-DCL4-DRB4-mediated control of leaf morphology.  *Curr. Biol.* **16**: 927–32.

Agranovsky, A.A. (1996) Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers.  *Adv. Virus Res.* **17**: 119-58.

Alba, R., Fei, Z., Payton, P., Liu, Y., Moore, S.L., Debbie, P., Cohn, J., D'Ascenzo, M., Gordon, J.S., Rose, J.K., Martin, G., Tanksley, S.D., Bouzayen, M., Jahn, M.M., Giovannoni, J. (2004) ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development.  *Plant J.* **39**: 697-714.

Albertini, D., Vogel, R., Bové, C., Bové, J.M. (1988) Transmission and preliminary characterization of citrus tristeza virus strain K.  *Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 17-21.

Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F., Moreno, P. (2000a) Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of  *Citrus tristeza virus* isolates.  *Phytopathology* **90**: 134-8.

Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., López, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. (2000b) Sequences of  *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical.  *J. Virol.* **74**: 6856–65.

Albiach-Martí, M.R., Grosser, J.W., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. (2004)  *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplast of resistant citrus relatives.  *Mol. Breeding* **14**: 117–28.

Albiach-Martí, M.R., Robertson, C., Gowda, S., Tatineni, S., Belliure, B., Garnsey, S., Folimonova, S., Moreno, P., Dawson, W.O. (2009) The pathogenicity determinant of  *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome is located at the 3' terminal region of the viral genome.  *Molec. Plant Pathol.* DOI:10.1111/j.1364-3703.2009.00572

Al-Shahrour, F., Arbiza, L., Dopazo, H., Huerta-Cepas, J., Mínguez, P., Montaner, D., Dopazo, J. (2007) From genes to functional classes in the study of biological systems.  *BMC Bioinformatics* **8**: 114-31.

Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V. (2000) Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus.  *Virology* **267**: 192-200.

**Alzhanova, D.V., Napuli, A., Creamer, R., Dolja, V.V.** (2001) Cell-to-cell movement and assembly of plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *The EMBO J.* **20**: 6997-7007.

**Ancillo, G., Gadea, J., Forment, J., Guerri, J., Navarro, L.** (2007) Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J. Exp. Bot.* **58**: 1927-33.

**Arregui, J. M., Ballester, J. F., Pina, J. A., Navarro, L.** (1982) Influencia del sustrato y de la fertilización en el crecimiento de plantas de lima Mejicana (*Citrus Aurantifolia* (Christm.) Swing) cultivadas en invernadero. *An. INIA / Ser. Agric.* **19**: 61-82.

**Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Groner, A., Sambade, A., Ritzenthaler, C., Heinlein, M.** (2006) Tobacco mosaic virus movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. *J. Virol.* **80**: 8329-44.

**Asins, M.J., Bernet, G.P., Ruiz, C., Cambra, M., Guerri, J., Carbonell, E.A.** (2004) QTL analysis of *Citrus tristeza virus*-citradia interaction. *Theo. Appl. Gene* **108**: 603-11.

**Aubert, B. y Bové, C.** (1984) Mild and severe strains of citrus tristeza virus in Reunion Island. *Proc. 9<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 57-61.

**Ayllón, M.A., López, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W.O., Guerri, P., Flores, R., Moreno, P.** (1999) New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation. *J. Gen. Virol.* **80**: 871-81.

**Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanayana, T., Karasev, A.V., Adkins, S., Mawassi, M., Guerri, J., Moreno, P., Dawson, W.O.** (2003) Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **77**: 9232-43.

**Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanarayana, T., Dawson, W.O.** (2004) Cis-acting elements at opposite ends of the *Citrus tristeza virus* genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology* **322**: 41-50.

**Ayllón, M.A., Rubio, L., Sentendreu, V., Moya, A., Guerri, J., Moreno, P.** (2006) Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes* **32**: 119-28.

**Babu, M., Gagarinova, A.G., Brandle, J.E., Wang, A.** (2008) Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *J. Gen. Virol.* **89**: 1069-80.

**Ballester-Olmos, JF., Pina, JA., Navarro, L.** (1988) Detection of a tristeza-seedling yellows strain in Spain. *Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 28-32.

**Ballester-Olmos, JF., Pina, JA., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M., Navarro, L.** (1993) Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathol.* **42**: 219-29.

**Barbarossa, L. y Savino, V.** (2006) Sensitive and specific digoxigeninlabelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dotblot hybridization. *J. Phytopathol.* **154**: 329–35.

**Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., Cohen, J.** (1970) Partial purification of virus-like particules associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology* **60**: 75-78.

**Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., Cohen, J.** (1972) Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. *Virology* **50**: 821-8.

**Bar-Joseph, M. y Loebenstein, G.** (1973) Effects of strain, source plant, and temperature on transmissibility of *Citrus tristeza virus* by melon aphid. *Phytopathology* **63**: 716–720.

**Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D.** (1979) The Closteroviruses: A distinct group of elongated plant viruses. *Ad. in Virus Res.* **25**: 93-168.

**Bar-Joseph, M. y Lee, R.F.** (1989) Citrus tristeza virus. *AAB Descriptions of plant viruses* **353**: 7.

**Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-97.

**Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **451**: 356-463.

**Beachy, R.N., Loesch-fries, S.L., Turmer, N.E.** (1990) Coat protein mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 451-74.

**Beffa, R.S., Hofer, R.m., Thomas, M., Meins, F.Jr.**(1996) Decreased susceptibility to viral disease of [beta]-1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* **8**: 1001-11.

**Ben Ze'ev, I.S., Bar-Joseph, M., Nitzan, Y., Marcus, R.** (1989) A severe *Citrus tristeza virus* isolate causing collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Ann. Appl. Biol.* **114**: 293–300.

**Bent, A.F.** (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell* **8**:1757-71.

**Bergstrom, C., McKittrick, E., Antia, R.** (2003) Mathematical models of RNA silencing: Unidirectional amplification limits accidental self-directed reactions. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **100**: 11511-16.

**Bernet, G.P., Gorris, M.T., Carbonell, E.A., Cambra, M., Asins, M.J.** (2008) *Citrus tristeza virus* resistance in a core collection of sour orange based on a diversity study of three germplasm collection using QTL-liked markers. *Plant Breeding* **127**: 398-406.

**Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**:363–66.

**Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., de Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., Cambra, M.** (2008) Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **120**: 177-88.

**Bitters, W.T.** (1972) Reaction of some new citrus hybrids and citrus introductions as rootstocks to inoculations with tristeza virus in California. Proc. 5<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.: 14-16.

**Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.I., Gotschlich E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**: 175-79.

**Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., Pooggin, M.M.** (2007) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6233-46.

**Boevink, P. y Oparka, K.J.** (2005) Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiology* **138**: 1815-21.

**Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., Vaucheret, H.** (2006) An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.* **25**: 3347-56.

**Bové, C., Vogel, R., Albertini, D., Bové, J.M.** (1988) Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.: 14-21.

**Boyko, V., Karasev, A.V., Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Dolja V.V.** (1992) Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9156-60.

**Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P., Heinlein, M.** (2000) Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat. Cell Biol.* **2**: 826-32.

**Boyko, V., Hu, Q., Seemanpillai, M., Ashby, J., Heinlein, M.** (2007) Validation of microtubule-associated tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. *Plant J.* **51**: 589–603

- Bucher, G.L., Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F. Jr, Iglesias, V.A.** (2001) Local expression of enzymatically active class I beta-1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J.* **28**:361-9.
- Bull, J.J.** (1994) Perspective virulence. *Int. J. Org. Evol.* **48**: 1423-37.
- Bülow, L., Schindler, M., Hehl, R.** (2007) PathoPlant: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses. *Nucleic Acid Res.* **35**: D841-5.
- Busch, W. y Lohmann, J.U.** (2007) Profiling a plant: expression analysis in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 136-41.
- Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Grumpf, D.J., Vela, C.** (1990) Detecction of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* **80**: 1034.
- Cambra, M. y Moreno, P.** (2000) Tristeza. Enfermedades de los cítricos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa: 44-81.
- Carbonell, A., Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Gago, S.** (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**, 44-53.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Majan, S.K., Schaad, M.C.** (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**:1669-81.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Johansen, L.K.** (2001) Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**: 1-5.
- Carrington, J. C. y Ambros, V.** (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**: 336-38.
- Carthew, R. W.** (2006) Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 203-8.
- Chan, S.W., Zilberman, Z., Xie, L., Johansen, L. K., Carrington, J. C., Jacobsen, S. E.** (2004) RNA silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* **303**: 1336.
- Chapman, E. y Carrington, J. C.** (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 884-96.
- Chen, X.** (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* **579**: 5923-31.

**Che, X., Piestum, D., Mawassi, M., Satyanayana, T., Gowda, S., Dawson W.O., Bar-Joseph, M.** (2001) 5' coterminal subgenomic RNAs in citrus tristeza virus-infected cells. *Virology* **283**: 374–81.

**Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T., Bok S.H.** (1996). Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **112**: 353-59.

**Cobbett, C. y Goldsbrough, P.** (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:159-82.

**Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., Jobet, E. Brugidou, E., Echeverria, M., Sáez-Vásquez J.** (2007) Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 1–13.

**Costa, A.S., Müller, G.W., Costa, C.L.** (1968) Rearing the tristeza ceter *Toxoptera citricidus* on squash. *Proc 4<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 32-35.

**Costa, A.S. y Müller, G.W.** (1980) Tristeza control by cross protection: a US–Brazil cooperative success. *Plant Dis.* **64**: 538–541.

**Cristofani-Yaly, M., Berger, I.J., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., Dorta S.O., Freitas-Astúa, J., Souza, A.A., Boscaroli-Camargo, R.L., Reis, M.S., Machado, M.A.** (2007) Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico hybridization. *Genetics and Molecular Biology* **30**: 972-9.

**Dangl, J. L., y Jones, J. D. G.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-33.

**Dardick, C.** (2007). Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 1004–17.

**Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O.** (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like protein in antiviral defense. *Science* **313**: 68-71.

**Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Yu, C., Tao, Q., Chen, C., Wendell, M.K., Zhang, H.-B., Gmitter, F.G. Jr.** (2001) Fine genetic mapping and BAC contig development for the *Citrus tristeza virus* resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Mol. Gen. Gen.* **265**: 739–47.

**Díaz-Pendón, J.A. y Ding, S.W.** (2008) Direct and Indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 303-26.

- Ding, S.W., Shi, B.J., Li W.X., Symons R.H.** (1996) An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **93**: 7470-4.
- Ding, S. W., Li, H., Lu, R., Li, F., Li, W. X.** (2004) RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* **102**: 109-15.
- Ding, S. W. y Voinnet, O.** (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**: 413-26.
- Dobbin, K., Shih, J.H., Simon, R.** (2003) Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics* **19**: 803-10.
- Dodds, J.A. y Bar-Joseph, M.** (1983) Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology* **73**: 419-23.
- Dodds, J.A., Morris, T.J., Jordan, R.L.** (1984) Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* **22**: 151-64.
- Dodds, J.A., Jarupat, T., Lee, J.G., Roistacher, C.N.** (1987a) Effects of strains, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **77**: 442-7.
- Dodds, J.A., Jordan, R.L., Roistacher, C.N., Jarupat, T.** (1987b) Diversity of *Citrus tristeza virus* isolates indicated by dsRNA analysis. *Intervirology* **27**: 177-88.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T.** (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* **117**: 38–51.
- Domínguez, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L.** (2002) Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Mol. Breeding* **10**: 1–10.
- Du, Q.S., Duan, C.G., Zhang, Z.H., Fang, Y.Y., Fang, R.X., Xie, Q., Guo, H.S.** (2007) DCL4 targets cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures. *J. Virol.* **81**: 9142-51.
- Dugas, D. V. y Bartel, B.** (2004) MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 512-20.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O.** (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**: 1235-50.
- Dunoyer, P. y Voinnet, O.** (2005) The complex interplay between plant viruses and host RNA silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 415-23.

- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballester, J.F., Juárez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., Semancik, J.S.** (1988) The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 152-164.
- Duran-Vila, N. y Moreno, P.** (2000) Enfermedades de los Cítricos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Ebert, D., y Bull, J.J.** (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: Is virulence management feasible? *Trends Microbiology* **11**: 15-20.
- Ekwall, K.** (2004) The RISC complex a direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol. Cell* **13**: 304 -5.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T.** (2000) The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci.* **5**: 373-9.
- Elvira, M. I., Galdeano, M. M., Gilardi, P., García-Luque, I., Serra, M.T.** (2008) Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *J. Exp. Bot.* **59**: 1253–65.
- Escriu, F., Fraile, A., García-Arenal, F.** (2003) The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution* **57**: 755-65.
- Espinoza, C., Vega, A., Medina, C., Schlauch, K., Cramer, G., Arce-Johnson, P.** (2007) Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Funct. Integr. Genomics* **7**: 95–110.
- Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuzet, L., Riault, A.V., Jacquot, E.** (2003) Improvement of *Barley yellow dwarf virus-PAV* detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **110**: 51-60.
- Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L.** (2005) Ectopic expresión of p23 gene from mild and severe strains of *Citrus Tristeza virus* induces in different citrus species host-specific sequence-independent aberrations resembling viral leaf symptoms. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **18**: 435-45.
- Fagoaga, C., López, C., Hermoso de Mendoza, A., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L.** (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 suppressor of *Citrus Tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant. Mol. Biol.* **60**: 153-65.
- Farnham, G. y Baulcombe, D.C.** (2006) Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene in potato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 18828–33.
- Fang, D.Q., Federici, C.T., Roose, M.L.** (1998) A high-resolution linkage map of the *Citrus tristeza virus* resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* **150**: 883–90.

**Fang, D.Q. y Roose, M.L.** (1999) A novel gene conferring *Citrus tristeza virus* resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *HortScience* **34**: 334–5.

**Fargette, D., Pinel, A., Traoré, O., Ghesquière, A., Konaté, G.** (2002) Emergence of resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus during serial inoculations. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 585–91.

**Fawcett, H.S. y Wallace, J.M.** (1946) Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif. Citogr.* **32**: 88-9.

**Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L.** (1996) The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* **86**: 1331–5.

**Flor, H. H.** (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**:653-69

**Flor, H. H.** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-96.

**Flores, R., Garro, R., Conejero, V., Cunat, P.** (1975) Purificación en gradiente de densidad de sulfato de cesio de las partículas nucleoproteicas asociadas a la tristeza de los cítricos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment* **15**: 93-7.

**Folimonova, S.Y., Folimonov, A.S., Satyanarayana, T., Dawson, W.O.** (2008) *Citrus Tristeza Virus*: Survival at the Edge of the Movement Continuum. *J. Virol.* **82**: 6546-56.

**Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agustí, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Berbel, A., Blázquez, M.A., Brumos, J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Conesa, A., Estables, B., Gandia, M., García-Martínez, J.L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gómez, G., Gonzalez-Candelas, L., Granell, A., Guerra, J., Lafuente, T., Madueno, F., Marcos, J.F. Martínez, F., Martínez-Godoy, M.A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallás, V., Perez-Amador, M.A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodríguez, P., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talon, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, C.H., Zacarias, L., Conejero, V.** (2005) Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* **57**: 375-91.

**Forrest, E.C., Cogoni, C., Macino, G.** (2004) The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2123-8.

**Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S.** (2003) TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:132-40.

**Furuiki, I.** (1981) Epidemiological studies on melon necrotic spot. Technical Bulletin **14** Shizuokaken, Japan: Shizuoka Agricultural Experiment Station.

**Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J., Waterhouse, P.M.** (2006) RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep.* **7**: 1168-75.

**Gabriel, D. y Rolfe, B.** (1990) Working models of specific recognition in plant microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 365-91.

**Gafny, R., Mogilner, N., Nitzan, Y., Shalom, J.B., Bar-Joseph, M.** (1995) The movement and distribution of *Citrus tristeza virus* and *citrus exocortis viroids* in citrus seedlings. *Ann. App. Biol.* **126**: 465-70.

**Gal-On, A., Kaplan, I.B., Palukaitis, P.** (1996) Characterization of cucumber mosaic virus. II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology* **226**: 354-61.

**Gandía, M., Conesa, A., Ancillo, G., Gadea, J., Forment, J., Pallás, V., Flores, R., Duran-Vila, N., Moreno, P., Guerri, J.** (2007). Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology* **367**: 298-306.

**Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Purcifull, D.E.** (1977) Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **67**: 965-8.

**Garnsey, S.M., Barrett, H.C., Hutchinson, D.J.** (1987) Identification of *Citrus tristeza virus* resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* **19**: 187-91.

**Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., Henderson, C.T.** (1993) Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *Proc. 12<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 39-50.

**Gasca-González, M. R., Rivera-Herrera, Y., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Guevara-Olvera, L., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-González, R. G.** (2008) Study on the transcriptome in *Capsicum chinense* Jacq. resistant to pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV). *Agrociencia* **42**: 107-17.

**Ghorbel, R., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L.** (2001) Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Mol. Plant. Pathol.* **2**: 27-36.

**Gilbertson, R.L. y Lucas, W.J.** (1996) How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends Plant Sci.* **1**: 260-8.

Gmitter, F.G., Xiao, S.Y., Huang, S., Hu, X.L., Garnsey, S.M., Deng, Z. (1996) A localized linkage map of citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 688-95.

Golem, S. y Culver, J.N. (2003) Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 681-8.

Gonsalves, D., Purcifull, D.E., Garnsey, S.M. (1978) Purification and serology of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **68**: 553-9.

Gosálvez-Bernal, B., Navarro, J.A., Lorca, A., Botella, F., Sánchez-Pina, M.A., Pallás, V. (2003) Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *J. Virol. Methods* **113**: 87-93.

Gosálvez-Bernal, B., Genovés, A., Navarro, J.A., Pallás, V., Sánchez-Pina, M.A. (2008) Distribution and pathway for phloem-dependent movement of *Melon necrotic spot virus* in melon plants. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 447-61.

Goto, K., Kanazawa, A., Kusaba, M., Masuta, C. (2003) A Simple and rapid method to detect plant siRNAs using nonradioactive probes. *Plant Mol. Biol.* **21**: 52-58.

Gottwald, T.R., Polek, M., Riley, K. (2002) History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. *Proc. 15th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 83-94.

Gowda, S., Satyanayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W.O. (2000) The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* **274**: 246-54.

Gowda, S., Satyanayana, T., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Rabindran, S., Dawson, W.O. (2001) Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology* **286**: 134-51.

Gowda, S., Ayllón, M.A., Satyanayana, T., Bar-Joseph, M., Dawson, W.O. (2003a) Transcription strategy in a closterovirus: a novel 5'-proximal control element of *Citrus tristeza virus* produces 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3'-open reading frame control elements. *J. Virol.* **77**: 340-52.

Gowda, S., Satyanayana, T., Ayllón, M.A., Moreno, P., Flores, R., Dawson, W.O. (2003b) The conserved structures of the 5'-nontranslated region of *Citrus tristeza virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology* **317**: 50-64.

**Gowda, S., Satyanarayana, T., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (2005) Infection of citrus plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana* plants agroinfiltrated with binary vector based Citrus tristeza virus. *Proc. 16<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 23–33.

**Gowda, S., Tatineni, S., Folimonova, S.Y., Hilf, M.E., Dawson, W.O.** (2009) Accumulation of a 5' proximal subgenomic RNA of *Citrus tristeza virus* is correlated with encapsidation by the minor coat protein. *Virology* **389**: 122-31.

**Grant, T.J. y Costa, A.S.** (1951) A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* **41**: 114-122.

**Grant, T.J.** (1959) Tristeza virus strains in relation to different citrus species used as test plants. *Phytopathology* **49**: 23-27.

**Grisoni, M. y Riviéri, C.** (1993) Analysis of epidermis of citrus tristeza virus (CTV) in young citrus groves exposed to aphid infestation under different climatic conditions in Reunion Island. *Proc. 12<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 62-68.

**Groenenboom, M.A.C., Marée, A.F.M., Hogeweg, P.** (2005) The RNA silencing pathway: The bits and pieces that matter. *PLoS Comp Biol* **1**(2): e21.

**Groenenboom, M.A.C. y Hogeweg, P.** (2008) The dynamics and efficacy of antiviral RNA silencing: A model study. *BMC Systems Biology* **2**: 28.

**Guerri, J., Moreno, P., Muñoz, N., Martínez, M.E.** (1991) Variability among Spanish citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathol.* **40**: 38-44.

**Hamilton, A. y Baulcombe, D.C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950–52.

**Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D.** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**: 4671–79.

**Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, C.J.** (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146-50.

**Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G.** (2000) Responses to Plant Pathogens. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. BB Buchanan, W Gruissem and RL Jones (eds.), pp. 1102- 1156, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA.

- Harper, S.J., Dawson, T.E., Pearson, M.N.** (2008) Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand Citrus tristeza virus isolates that overcome the resistance of Poncirus trifoliata (L.) Raf. *Aust. Plant Pathol.* **37**: 379–86.
- Harper, S.J., Dawson, T.E., Pearson, M.N.** (2009) Complete genome sequences of two distinct and diverse Citrus tristeza virus isolates from New Zealand. *Arch. Virol.* **154**: 1505-10.
- Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J., Torrance, L.** (2005) Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell* **17**:164-181.
- Heath, M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**: 321-34.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A.** (1984) Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. *Proc. 9<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 23–7.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A.** (1988a) Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. *Proc. 9<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 68–70.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Serra, J.A., Fuertes, C.** (1988b) Difference in transmission efficiency of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin or lemon trees as donor or receptor host plant. *Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 62–4.
- Herranz, M.C. y Pallas, V.** (2004) RNA-binding properties and mapping of the RNA-binding domain from the movement protein of Prunus necrotic ringspot virus. *J. Gen. Virol.* **85**:761-8.
- Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A., Sauri, A., Mingarro, I., Pallas, 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.
- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L., Garnsey, S.M.** (1995) Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**: 576–82.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O.** (2003) Transitivity dependent and - independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**: 4523–33.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T.** (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **57**: 173–88.

**Hua, J., Grisafi, P., Cheng, S.H., Fink, G.R.** (2001) Plant growth homeostasis is controlled by the Arabidopsis BON1 and BAP1 genes. *Genes Dev.* **15**: 2263-72.

**Hull, R.** (1989) The movement of viruses in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **27**: 213-40.

**Hull R** (1991) The movement of viruses within plants. *Semin. Virol.* **2**: 89-95.

**Heijbroek, W., Musters, P.M.S., Schoone, A.H.L.** (1999) Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur. J. Plant. Pathol.* **105**: 397-405.

**Iglesias, V.A. y Meins, F. Jr.** (2000) Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,2-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit an enhanced callose deposition. *Plant J.* **21**:157-66.

**Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R., Alvarez-Alvarez, A.** (2005) First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agron. Lusit.* **51**: 19-21.

**Irian, S., Xu, P., Dai, X., Zhao, P. X., Roossinck, M. J.** (2007) Regulation of a virus-induced lethal disease in tomato revealed by LongSAGE analysis. *Molec. Plant- Microbe Interact.* **20**: 1477-88.

**Jambunathan, N., Siani, J.M., McNellis, T.W.** (2001) A humidity-sensitive Arabidopsis copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell* **13**: 2225-40.

**Jensen, W.A.** (1962) Botanical Histochemistry. Principles and Practice. 198-201.

**Johansen, L.K. y Carrington, J.C.** (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **26**: 930-8.

**Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B.** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 19-53.

**Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., Helm, J. M.** (2008) RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* **100**: 13-26.

**Kang, B.-C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F., Jahn, M.M.** (2005) The pvr1 locus in pepper encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* **41**: 392-405.

**Karasev, A.V., Kashina, A.S., Gelfand, V.I., Dolja, V.V.** (1992) HSP70-related 65K protein of beet yellows virus is a microtubulebinding protein. *FEBS Lett.* **304** 12-14.

- Karasev, A.V., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (1997) Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5'-termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs. *J. Virol.* **71**: 6233–36.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowsky, D.J., Dawson, W.O.** (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**: 511-20.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C.** (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205-17.
- Kawasaki, T., Koita, H., Nakatsubo, T., Hasegawa, K., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Umemura, K., Umezawa, T., Shimamoto, K.** (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:230-35.
- Keen, N.T.** (1990) Gene-for-gene complementarity in plant–pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 447-63.
- Kitajima, E.W. y Costa A.S.** (1968) Electron microscopy of the tristeza virus in citrus leaves. *Proc. 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. Citrus Virol.*: 25-30.
- Koizumi, M.** (1991) *Citrus tristeza virus* field isolates from declined of dwarfed citrus trees in Japan. *Proc. 11<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 146-49.
- Koltai, H. y Volpin, H.** (2003) Agricultural genomics: An approach to plant protection. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**: 101-8.
- Korimbocus, J., Coates, D., Barker, I., Boonham, N.** (2002) Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* **103**: 109-20.
- Kyriakou, A., Ioannou, N., Gavriel, J., Bar-Joseph, M., Papayiannis, Chr., Kapar-Isaia, Th., Savva, G.** (1996) Management of *Citrus tristeza virus* in Cyprus. *Proc. 13<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 172-8.
- Lamb, C. y Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-75.
- Lastra, R., Meneses, R., Still, P.E., Niblett, C.** (1991) The citrus tristeza situation in Central America. *Proc. 11<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 146-49.
- Lazarowitz, S.G. y Beachy, R.N.** (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**:535-48.

**Lazarowitz, S.G.** (2002) Plant Viruses. p. 1–107. DM Knipe, PM Howley, Lippincott Williams y Wilkins (eds.) Fundamental Virology. 4<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, USA.

**Lecellier, C. H. y Voinnet, O.** (2004) RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev.* **198**: 285-303.

**Lefebvre, S., Lawson, T., Zakhleniuk, O.V., Lloyd, J.C., Raines, C.A., Fryer, M.** (2005) Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol.* **138**: 451-60.

**Lehmann, P.** (2002) Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J. Appl. Genet.* **43**: 403-14

**Li, H. W. y Ding, S. W.** (2005) Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* **579**: 5965-73.

**Li, F. y Ding, S.W.** (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-Silencing Immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503-31.

**Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., Nelson, R.S.** (2005) The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol.* **138**:1853-65.

**López, C., Ayllón, M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., Flores, R.** (1998) Molecular variability of the 5' and 3' terminal regions of citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* **88**: 685–91.

**López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R.** (2000) The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* **269**: 462–70.

**Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W.** (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 15742-47.

**Lucas, W.J.** (2006) Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**:169-84.

**Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13401-6.

**MacDiarmid, R.** (2005) RNA silencing in productive virus infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 523-44.

**MacFarlane, S.A. y Popovich, A.H.** (2000) Efficient expresión of foreign proteins in rotos from tobnavirus vectors. *Virology* **267**: 29-35.

**Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I.** (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**:1002–4.

**Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Duffus, J.E., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Murant, A., Namba, S., Niblett, C.L., Vetten., H.J., Yoshikawa, N.** (2000) Family Closteroviridae. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, M.H.V. Van Regenmortel C.M. Fauquet, D.H.L.Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner (Eds), 943-952. Academic Press, San Diego, CA.

**Martín, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M.C., Moya, P., Guerri, J., Elena S.F., Moreno, P.** (2009) Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.* **90**: 1527-38.

**Martin, D.P., van der Walt, E., Posada, D., Rybicki, E.P.** (2005) The evolutionary value of recombination is constrained by genome modularity. *PLoS Genet.* **1**:e51.

**Martínez-Godoy, M.A., Mauri, N., Juárez, J., Marques, M.C., Santiago, J., Forment, J., Gadea, J.** (2008) A genome-wide 20K citrus microarrays for gene expression analysis. *BMC Genomics* **9**: 318-29.

**Más, P., Beachy, R.N.** (2000) Role of microtubules in the intracellular distribution of tobacco mosaic virus movement protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12345-49.

**Matthews, R.E.F.** (1991) Plant virology, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, New York.

**Maule, A., Leh, V., Lederer, C.** (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 279-84.

**Maule, A., Caranta, C., Boulton, M.I.** (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 223-31.

**Mawassi, M., Karasev, A.V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R.F., Dawson, W.O., Bar-Joseph, M.** (1995) Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. *Virology* **208**: 383-87.

**Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G. and Bar-Joseph, M.** (1996) Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* **77**: 2359–64.

**McClellan, A.P.D.** (1974) Abnormal bud union between some sweet oranges and rough lemon rootstock: Evidence of cause by a transmissible pathogen. *Proc. 6<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 203-10.

- McClellan, A.P.D.** (1975) Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* **7**: 109–13
- Medina, V., Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V.** (1999) *Virology* **260**, 173–81.
- Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A. and Navarro, L.** (1997a) Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor. Appl. Genetics* **94**: 458–64.
- Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A. and Navarro, L.** (1997b) Efficient search for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily Aurantioideae. *Theor. Appl. Genetics* **95**: 1282–8.
- Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A. and Navarro, L.** (1997c) New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L) Raf. to citrus tristeza virus. *Theor. Appl. Genetics*: **95**: 691-95.
- Milne, R.G.** (1993) Electron microscopy of in vitro preparations. In: Matthews REF, ed. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, CRC Press, Boca Raton, 215-51.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, V.B.** (2002) RNA Silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **5**: 289-S301.
- Moissiard, G. y Voinnet, O.** (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant. Pathol.* **5** : 71-82.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, É., Lacomme, C., Burgyan, J.** (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol* **79**: 7812-18.
- Moreno, P., Guerri, J., Muñoz, N.** (1990) Identification of spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* **80**: 477-82.
- Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Martínez, M.E.** (1991) Segregation of *Citrus tristeza virus* strains evidenced by double-stranded RNAs (dsRNAs) analysis. *Proc. 11th Conf. Int. Organ. Virol.*: 20-24.
- Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Albiach, R., Martínez, M.E.** (1993a) Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathol.* **42**: 35-41.
- Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Fuertes-Polo, C., Albiach, R., Martínez, M.E.** (1993b) Variations in pathogenicity and double-stranded RNA (dsRNA) patterns of citrus tristeza virus isolates induced by host passage. *Proc. 12th Conf. Int. Organ Virol.*: 8-15.

**Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L.** (2008) *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 251-68.

**Morita-Yamamuro, Tsutsui, T., Sato, M., Yoshioka, H., Tamaoki, M., Ogawa, D., Matsuura, H., Yoshihara, T., Ikeda, A., Uyeda, I., Yamaguchi, J.** (2005) The Arabidopsis gene CAD1 controls programmed cell death in the plant immune system and encodes a protein containing a MACPF domain. *Plant Cell Physiol.* **46**: 902-12.

**Müller, G.W., Costa, A.S., Kitajima, E.W., Camargo, I.J.B.** (1974) Additional evidence that tristeza multiplies in *Passiflora* ssp. *Proc. 6<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Virol.*: 75-8.

**Müller, G.W. y Costa, A.S.** (1987) Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* **19**: 197-98.

**Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., Fukuhara, T.** (2007) The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the *trans*-acting siRNA pathway. *Plant Mol. Biol.* **63**: 777-85.

**Napuli, A.J., Falk, B.W., Dolja, V.V.** (2000) Interaction between Hsp70 homolog and filamentous virions of the beet yellows virus. *Virology* **274**: 232-9.

**Narváez, G., Skander, B.S., Ayllón, M.A., Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P.** (2000) A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J. Virol. Methods* **85**: 83-92.

**Navarro, L.** (1993) Citrus sanitation, quarantine and certification programs. *Proc. 12<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 383-91.

**Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S.** (2002) The Citrus variety improvement program in Spain in the period 1975-2001. *Proc. 15<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*: 306-16.

**Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (1997) Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology* **228**: 92-7.

**Nayor, M., Murphy, A.M., Berry, J.O., Carr, J.P.** (1998) Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 860-8.

**Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Garnsey, S.M., Lee, R.F.** (1998) Serological differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis.* **82**: 1276-80.

**Nolasco, G., Deblas, C., Torres, V., Ponz, F.** (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant-viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* **45**: 201–18.

**Norman, P.A., Sutton, R.A., Burditt, A.K.** (1968) Factors affecting transmission of tristeza by melon aphids. *J. Econ. Entomol.* **61**: 238-42.

**Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Terrada, E.**(1999) New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1564–65.

**Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., Cambra, M.** (2005) Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *J. Virol. Methods* **128**: 151-55.

**Omarov, R.T., Cioerlik, J.J., Sholtohof, H.B.** (2007) RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in toombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a dsicrtete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 1714-19.

**Oparka KJ** (2004) Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci.* **9**: 33–41.

**Osbourn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-31.

**Pagán, I., Alonso-Blanco, C., García-Arenal, F.** (2007) The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS ONE* **2**(8): e786.

**Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., Birchler, J.A.** (2002) RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* **9**: 315-27.

**Pantaleo, V., Szittyz, G., Burgyán, J.** (2007) Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.* **81**: 3793-3806.

**Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M.** (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2395-2400.

**Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., Niblett, C.L.** (1994) Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* **199**: 35–46.

- Park, C.J., An, J.M., Shim, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J., Paek, K.H.** (2004) Molecular characterization of pepper germin-like proteins as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* **219**: 797-806.
- Peng, C.W., Napuli, A.J., Dolja, V.V.** (2003) Leader proteinase of beet yellows virus functions in long-distance transport. *J. Virol.* **77**: 2843-9.
- Peña, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L.** (1995) Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* **14**: 616-9.
- Peña, L. y Seguíñ, A.** (2001) Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol.* **19**: 500-6.
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V.** (1999) HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 14771-76.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Lee, R.F.** (1990) A monoclonal antibody which discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **80**: 224-8.
- Picó, B., Sifres, A., Nuez, F.** (2005) Quantitative detection of *Cucumber vein yellowing virus* in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *J. Virol. Methods* **128**: 114-20.
- Ploeg, A.T., Zoon, F.C., Maas, P.W.T.** (1996) Transmission efficiency of five tobamovirus strains by *Paratrichodorus teres*. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 123-26.
- Pompe-Novak, M., Gruden, K., Baebler, S., Krecic-Stres, H., Kovac, M., Jongmsa, M., Ravnikar, M.** (2005). Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **67**: 237-47.
- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Napuli, A.J., Dolja, V.V.** (2002) Interaction between longdistance transport factor and Hsp70-related movement protein of Beet yellows virus. *J. Virol.* **76**:11003-11.
- Qu, F. y Morris, T. J.** (2002) Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:193-202.
- Qu, F. y Morris, T.J.** (2005) Suppressor of RNA silencing encoded by plant virus and their role in viral infections. *FEBS Lett.* **579**: 5958-64.

**Raccah, B., Loebenstein, G., Singer, S.** (1980) Aphid-transmissibility variants of *Citrus tristeza virus* in infected citrus trees. *Phytopathology* **70**: 89–93.

**Raccah, B. y Singer, S.** (1987) Incidence and vector potential of aphids which transmit *Citrus tristeza virus* in Israel. *Phytophylactica* **19**: 1173-8.

**Rai, M.** (2006) Refinement of the *Citrus tristeza virus* resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol. Biol.* **61**: 399–414.

**Ramonell, K.M. y Somerville, S.** (2002) The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 291-4.

**Ratcliff, F., Harrison, B. D., Baulcombe, D. C.** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-60.

**Reichel, C., Más, P., Beachy, R.N.** (1999) The role of the ER and Cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci.* **4**: 458-62.

**Robalino, J., Barlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S. Browdy, C.L., Warr, G.W.** (2005) Double-Stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in invertebrate antiviral response? *J. Virol.* **79**: 13561-71.

**Roberts, C.A., Dietzgen, R.G., Heelan, L.A., Maclean, D.J.** (2000) Real-time RT-PCR fluorescent detection of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Virol. Methods* **88**: 1-8.

**Rodriguez-Cerezo, E., Klein, P.G., Shaw, G.J.** (1991) A determinant of disease symptom severity is located in the 39-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9863–67.

**Roistacher, C.N. y Bar-Joseph, M.** (1984) Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. *Proc 9<sup>th</sup> Conf Intl Organ Virol*: 9–18.

**Roistacher, C.N., Bar-Joseph, M., Gumpf, D.J.** (1984) Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by small populations of *Aphis Gossypii*. *Plant Disease* **68**: 494-6.

**Roistacher, C. N.** (1991) Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. F.A.O., Rome. 286.

**Roistacher, C.N. y Moreno, P.** (1991) The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. *Proc 11<sup>th</sup> Conf Int Org Citrus Virol*: 7-19.

**Rosner, A. y Bar-Joseph, M.** (1984) Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* **139**: 189–93.

**Roth, B.M., Gail, J.P., Vance, V.B.** (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* **102**: 97-108.

**Roy, A. y Brlansky, R.H.** (2008) Complete genome sequence of Indian *Citrus tristeza virus* symbolize a new genotype. *Ind. J. Virol.* **19**:S27.

**Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B.W.** (2001) Genetic variation of *Citrus Tristeza Virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol.* **75**: 8054-62.

**Ruiz-Medrano, R., Xonocostle-Cazares, B., Kragler, F.** (2004) The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 641-50

**Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S.** (2006) The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch. Virol.* **151**: 387–98.

**Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S.** (2007) A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Methods* **145**: 96-105.

**Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambrós, S.** (2009) Discrimination between mild and severe *Citrus tristeza virus* isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* **99**: 307-15.

**Ruiz-Ruiz, S.** (2009) El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

**Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C.** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-46.

**Ryabov, E.V., Fraser, G., Mayo, M.A., Baker, H., Taliensky, M.** (2001) Umbravirus gene expression helps potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology* **286**: 363-72.

**Sacristán, S., Fraile, A., Malpica, J.M., García-Arenal, F.** (2005) An analysis of host adaptation and its relationship with virulence in *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* **95**: 827-33.

**Sambade, A., López, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., Moreno, P.** (2003) Polymorphism of a specific region in the gene p23 of Citrus tristeza virus allows differentiation between mild and severe isolates. *Arch. Virol.* **148**: 2281–91.

**Sambade, A., Ambrós, S., López, C., Ruiz-Ruiz, S., Hermoso de Mendoza, A., Flores, R., Guerri, J., Moreno, P.** (2007) Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants coinoculated with mild and severe variants. *Arch. Virol.* **152**: 1115–26.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Saponari, M., Manjunath, K., Yokomi, R.K.** (2008) Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods* **147**: 43-53.

**Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (1999) An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **96** (13): 7433-38.

**Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Ayllon, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (2000) Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* **278**: 253-65.

**Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Ayllón, M.A., Gowda, S., Hilf, M.E., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O.** (2001) Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* **280**: 87-96.

**Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O.** (2002a) Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of Citrus tristeza virus. *Virology* **300**: 140–52.

**Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindram, R., Dawson, W.O.** (2002b) The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virol.* **76**: 473–83.

**Satyanayanana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O.** (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **101**: 799–804.

**Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C.** (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* **138**: 1842–52.

**Schneider, H.** (1959) The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), 73–84. Berkeley, CA:University of California Division of Agricultural Science.

**Scholthof, H.B.** (2005) Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* **10**: 376-82.

**Sekiya, M.E., Lawrence, S.D., McCaffery, M., Cline, K.** (1991) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.* **69**: 1013-20.

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

**Shi, B.J., Palukaitis, P., Symons, R.H.** (2002) Differential virulence by strains of *Cucumber mosaic virus* is mediated by the 2b gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 947-55.

**Shimizu, T., Satoh, K., Kikuchi, S., Omura, T.** (2007). The repression of cell wall- and plastid-related genes and the induction of defenselated genes in rice plants infected with rice dwarf virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 247–54.

**Shimomura, T. y Dijkstra, J.** (1975) The occurrence of callose during the process of local lesion formation. *Neth. J. Plant Pathol.* **81**: 107-21.

**Shirasu, K. y Schulze-Lefert, P.** (2003) Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease- resistance pathways. *Trends Plant Sci.* **8**: 1360-1385.

**Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S.** (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465–76.

**Sijen, T., Steiner, F. A., Thijssen, K. L., Plasterk, R. H.** (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**: 244-7.

**Song, J.J. y Joshua-Tor, L.** (2006) Argonaute and RNA-getting into the groove. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 5-11.

**Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M., Dinesh-Kumar, S. P.** (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 789 -98.

**Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D.G.** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-66.

**Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T. Ieki, H., Okuda, S.** (2001) Nucleotide sequence of Citrus tristeza virus seeding yellows isolate. *J. Gen. Plant Pathol.* **67**: 73–7

**Taiz, L. y Zeiger, E.** (2006). A companion to plant physiology. Fourth Edition Blackwell Publishing. Chapter **13**. The Shikimic Acid Pathway.

**Takken, F.L.W. y Joosten, M.H.A.J.** (2000) Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**: 699–713.

**Tatineni, S., Robertson, S.M., Garnsey, S.M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., Dawson, W.O.** (2008) Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* **376**: 297-307.

**Técsi, L. I., Maule, A. J., Smith, A. M., Leegood, R. C.** (1994) Complex, localized changes in CO<sub>2</sub> assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.* **5**: 837–47.

**Técsi, L. I., Smith, A. M., Maule, A. J., Leegood, R. C.** (1996) A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of narrow plants with *Cucumber mosaic virus*. *Plant Physiol.* **111**: 975–85.

**Tenllado F. y Díaz-Ruiz, J.R.** (2001) Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* **75**: 12288-97.

**Tomari, Y. y Zamore, P.D.** (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**: 517–29.

**Tsuda, S., Kubota, K., Kanda, A., Ohiki, T., Meshi, T.** (2007) Pathogenicity of *Pepper mild mottle virus* is controlled by the RNA silencing suppression activity of its replication protein but not the viral accumulation. *Phytopathology* **97**: 412-420.

**Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C.** (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**: 857–67.

**Van Vuuren, S.P., Collins, R.P., da Graça, J.V.** (1993) Evaluation of *Citrus tristeza virus* isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Dis.* **77**: 24–8.

- Vaucheret, H.** (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**: 759-71.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de Román, C.** (1986) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* **67**: 91-6.
- Vives, M.C., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P.** (1999) The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *J. Gen. Virol.* **80**: 811–6.
- Vives, M.C., Rubio, L., Sambade, A., Mirkov, Moreno, P., Guerri, J.** (2005) Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* **331**: 232–7.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D.C.** (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localised introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**: 177-87.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C.** (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **96**: 14147-52.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C.** (2000) A viral movement protein prevents systemic spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157-67.
- Voinnet, O.** (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-59.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.C.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**: 949-956.
- Voinnet, O.** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 206-20.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., Citovsky, V.** (2004) The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**: 195–250.
- Wassenegger, M.** (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**: 13-16.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T.** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**: 834-42.

**Wege, C. y Siegmund, D.** (2007) Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus Abutilon mosaic virus (AbMV) mediated by Cucumber mosaic virus (CMV). *Virology* **357**: 10-28.

**Whitham, S.A., Quam, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., Hou, Y.M.** (2003) Diverse RNA viruses elicit the expression of common set of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **33**: 271-83.

**Whitham, S.A., Yang, C., Goodin, M.M.** (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1207-15.

**Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R., Lucas, W.J.** (1991) Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* **3**: 593-604.

**Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K., Shimamoto, K.** (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* **135**: 1447-56.

**Wright, K.M., Wood, N.T., Roberts, A.G., Chapman, S., Boevink, P., MacKenzie, K.M., Oparka, K.J.** (2007) Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: Evidence from FRAP. *Traffic* **8**: 21-31.

**Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J.C.** (2005) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:12984-89.

**Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D.** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**: E104.

**Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D. A., Raskin, I.** (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3**: 809-18.

**Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J. M., Fan, J. B., Whitham, S. A.** (2007). Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to turnip mosaic virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 358-70.

**Yang, S. y Hua, J.** (2004) A haplotype-specific resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1060-71.

**Yang, S., Yang, H., Grisafi, P., Sanchatjate, S., Fink, G.R., Sun, Q., Hua, J.** (2006) The BON/CPN gene family represses cell death and promotes cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **45**: 166-79.

- Yang, Z.-N., Mathews, D.M., Dodds, J.A., Mirkov, T.E.** (1999) Molecular characterization of an isolate of citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* **19**: 111–42.
- Yang, Z.N., Ye, X.R., Choi, S., Molina, J., Moonan, F., Wing, R.A., Roose, M.L., Mirkov, T.E.** (2001) Construction of a 1.2-Mb contig including the *Citrus tristeza virus* resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus Trifoliata* (L.) Raf. *Genome* **44**: 382-93.
- Yang, Z.N., Ye, X.R., Molina, J., Roose, M.L., Mirkov, T.E.** (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L.Raf. *Plant Physiol.***131**: 482-92.
- Yokomi, R.K. y Garnsey, S.M.** (1987) Transmision of citrus tristeza virus by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* **19**:169–72.
- Yokomi, R.K., Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J.** (1989) Transmission of exotic *Citrus tristeza virus* isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Dis.* **73**: 552-6.
- Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Peña, M.A., Niblett, C.L.** (1994) Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera, Aphididae) in Central-America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *J. Econ. Entomol.* **87**: 1078–85.
- Yoshida, T.** (1985) Inheritance of susceptibility to *Citrus tristeza virus* in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Bull. Fruit Tree Res. Sta.* **12**: 17–25.
- Yoshida, T.** (1993) Inheritance of immunity to *Citrus tristeza virus* of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids. *Bull. Fruit Tree Res. Sta.* **25**: 33–43.
- Yoshida, T.** (1996) Graft compatibility of *Citrus* with plants in the Aurantoidea and their susceptibility to *Citrus tristeza virus*. *Plant Dis.* **80**: 414–17.

