

DEPARTAMENT DE PROTECCIÓ VEGETAL I  
BIOTECNOLOGIA

EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV):  
DESARROLLO Y APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA  
ESTABLECER UN SISTEMA GENÉTICO EFICAZ

SUSANA RUIZ RUIZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de març de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Amparo Latorre Castillo
- Dr. Ricardo Flores Pedauyó
- Dr. Jesús Navas Castillo
- Dr. Miguel A. Aranda Regules
- Dr. Carmelo López del Rincón

Va ser dirigida per:

Dra. Silvia Ambrós Palaguerri

Dr. Pedro Moreno Gómez

Dr. José Guerri Sirera

©Copyright: Servei de Publicacions  
Susana Ruiz Ruiz

---

Dipòsit legal: V-1028-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7571-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

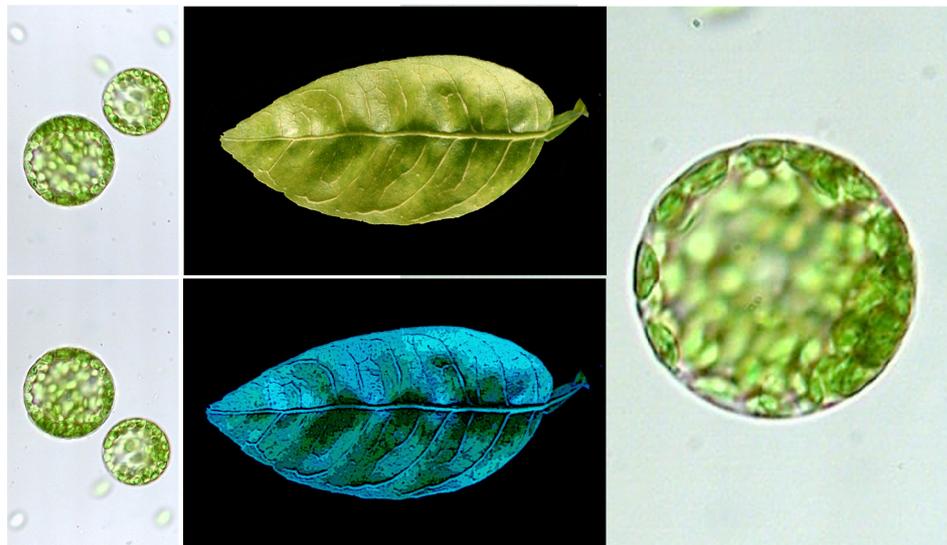
46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Facultat de Ciències Biològiques  
Departament de Genètica

**El virus de la tristeza de los cítricos (CTV):  
desarrollo y aplicación de herramientas para  
establecer un sistema genético eficaz**



Susana Ruiz Ruiz  
Valencia, 2009



Facultat de Ciències Biològiques  
Departament de Genètica

**El virus de la tristeza de los cítricos (CTV):  
desarrollo y aplicación de herramientas para  
establecer un sistema genético eficaz**

Memoria presentada por:  
Susana Ruiz Ruiz

Directores:  
Silvia Ambrós Palaguerri  
Pedro Moreno Gómez  
José Guerri Sirera

## RESUMEN

### **El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz**

Las cepas de CTV comunes en España son poco agresivas y sólo producen decaimiento de plantas propagadas sobre naranjo amargo, mientras que en otros países predominan cepas más virulentas que producen los síndromes de amarilleo (SY) y acanaladuras en la madera (SP) en pomelo o naranjo dulce, con independencia del patrón utilizado. El objetivo general de esta tesis era el desarrollo de herramientas para controlar los aislados más virulentos de CTV. Para ello, se inició la puesta a punto de un sistema genético eficaz que permitiera caracterizar los determinantes genéticos de los síntomas de SY y SP. Por otra parte, se desarrolló un método para identificar los aislados de CTV potencialmente peligrosos, mediante la detección y cuantificación de variantes de secuencia características de los aislados más virulentos.

Como base del sistema genético se seleccionó el aislado de origen español T318A, que induce SY y SP en pomelo y naranjo dulce y que presentaba una población viral muy homogénea. La secuenciación de su RNA genómico (gRNA) mostró que éste presenta una organización idéntica a la del resto de aislados de CTV secuenciados y potencialmente codifica productos similares. T318A mostró alta identidad nucleotídica con los aislados más agresivos de los que se conoce la secuencia completa (SY568R y NUagA). En contraste con otros aislados virulentos, T318A es el primer aislado en el que se detecta una única variante de secuencia en la región no codificante 5' UTR (tipo II). Otra peculiaridad de T318A es la presencia en su población de varios RNAs defectivos (dRNAs) de gran tamaño, que podrían tener capacidad de replicación autónoma.

Se desarrolló un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real que permite estimar de forma fiable el número de copias de gRNA de CTV para poder evaluar la eficacia replicativa de los futuros clones de cDNA. Con este fin se diseñó una pareja de cebadores en regiones conservadas en las ORFs

1b y 2 que evita la amplificación de los RNAs subgenómicos y los dRNAs más abundantes de CTV. Este protocolo permite la detección y cuantificación reproducible de CTV en distintos tejidos y especies huésped incluso en árboles de campo. El análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados mostró que el valor de  $T_m$  permitía diferenciar los aislados poco agresivos de los más virulentos. La comparación de los valores  $T_m$  de 56 aislados de CTV caracterizados biológicamente procedentes de 20 países diferentes, permitió identificar correctamente como agresivos o no agresivos el 90% de ellos. Sin embargo, la presencia de variantes de secuencia características de aislados agresivos y no agresivos en un mismo aislado da lugar a valores intermedios de  $T_m$  que pueden dificultar una caracterización inequívoca.

Con objeto de identificar aislados potencialmente peligrosos sin esta limitación se desarrolló un nuevo protocolo de RT-PCR a tiempo real, utilizando tres sondas TaqMan tipo LNA, que permite la detección y cuantificación de variantes de secuencia características de aislados no virulentos (NV), virulentos inductores de SP (SP) y virulentos tipo T36 (T36). El análisis del mismo panel internacional de aislados mostró: i) que los aislados no virulentos reaccionaban únicamente con la sonda NV, ii) que la sonda SP identificaba el 96% de los aislados inductores de SP, y iii) que la reacción con las sondas SP o T36 identificaba el 100% de los aislados virulentos (inductores de SY y/o SP). Este protocolo se aplicó al estudio de la población viral de plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado no virulento (T32) y otro inductor de SP (T318A). El análisis mostró que T32 no protegía las plantas pre-inoculadas frente al SP inducido por T318A y que cada variante de secuencia invadía los tejidos previamente infectados por la otra.

Para el desarrollo de un sistema genético basado en el genoma de T318A se ensayó en primer lugar la capacidad de este genotipo para replicarse en protoplastos de *Nicotiana benthamiana*. La inoculación de éstos con viriones purificados de T318A dio lugar a una acumulación viral similar a la observada previamente con viriones del aislado T36. Por otra parte, para facilitar la construcción de un cDNA infeccioso del genoma

completo de T318A se decidió construir un minireplicón basado en alguno de los dRNAs de gran tamaño detectados en este aislado. La secuenciación de las regiones próximas al punto de recombinación de tres dRNAs mostró que su región 5' incluía las ORFs 1a y 1b completas, confirmando su capacidad de replicación autónoma y la posibilidad de utilizarlos como minireplicones naturales. Sin embargo, ninguno de los clones ensayados dio lugar a transcritos capaces de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana*, lo que sugería una posible reorganización de dichos clones inducida por su toxicidad para las bacterias. Para obviar este problema se obtuvieron nuevos clones de cDNA que se pudieron expresar directamente *in planta* bajo la acción del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en un vector binario de bajo número de copias y con la pauta de lectura de la ORF 1a interrumpida por la inserción de un intrón de planta. La agroinfiltración de estos clones en hojas de *N. benthamiana* dio lugar a una replicación eficiente y a una acumulación de RNA viral similar a la observada con minireplicones de T36. A partir de los minireplicones más eficientes se obtuvieron clones de longitud completa de T318A insertándoles la región central del genoma que les faltaba. Todos los clones completos de T318A se replicaron en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, aunque su cinética de acumulación fue diferente a la de T36: mientras la acumulación de éste en las hojas infiltradas aumentó progresivamente e indujo una infección sistémica, la de T318A aumentó las dos primeras semanas para luego descender hasta hacerse indetectable. La co-infiltración de los clones completos de ambos aislados no consiguió un incremento en el número de copias de T318A o el movimiento de éste a hojas superiores.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS.....	3
1.1. Importancia económica.....	3
1.2. El cultivo.....	4
2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS.....	5
3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.....	7
3.1. Gama de huéspedes y síntomas.....	8
3.2. El virus de la tristeza de los cítricos ( <i>Citrus tristeza virus</i> , CTV).....	12
3.2.1. Organización genómica de CTV.....	13
3.2.2. Desarrollo de un clon infeccioso de CTV.....	19
3.2.3. Expresión del genoma viral.....	21
3.3. Diagnóstico y caracterización de aislados.....	26
3.4. Variabilidad genética.....	29
3.5. Transmisión.....	34
3.6. Control de la enfermedad.....	35
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	39
<b>CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN AISLADO AGRESIVO DE CTV INDUCTOR DE ACANALADURAS EN LA MADERA</b> .....	45
1.1. INTRODUCCIÓN.....	47
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1.2.1. Selección de un aislado agresivo de origen español.....	49
1.2.2. Clonación y secuenciación de un aislado agresivo español inductor de SP.....	50
1.2.2.1. Diseño de cebadores.....	50
1.2.2.2. Obtención de fragmentos solapantes de cDNA de gran tamaño.....	51
1.2.3. Caracterización de la secuencia no codificante del extremo 5' del RNA genómico.....	53
1.2.4. Detección y caracterización de RNAs defectivos.....	54
1.2.5. Caracterización biológica del aislado T318A.....	56
1.3. RESULTADOS.....	56
1.3.1. Selección de un aislado agresivo de origen español.....	56
1.3.2. Secuenciación del RNA genómico del aislado T318A.....	58

1.3.3. Presencia de RNAs defectivos.....	68
1.3.4. Caracterización biológica del aislado T318A.....	69
1.4. DISCUSIÓN.....	72
<b>CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN MÉTODO GENERAL PARA CUANTIFICAR EL RNA GENÓMICO DE CTV EN PLANTAS.....</b>	<b>77</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	79
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
2.2.1. Aislados de CTV.....	83
2.2.2. Diseño de cebadores.....	84
2.2.3. Extracción de RNA.....	87
2.2.4. Curva estándar.....	87
2.2.5 RT-PCR a tiempo real.....	88
2.3. RESULTADOS.....	89
2.3.1. Optimización del protocolo.....	89
2.3.2. Estimación del número de copias de RNA genómico de CTV.....	93
2.3.3. Acumulación diferencial de CTV en diferentes huéspedes.....	95
2.3.4. Acumulación de CTV en diferentes tejidos en árboles de campo.....	101
2.4. DISCUSIÓN.....	103
<b>CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECÍFICO PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE VARIANTES AGRESIVAS Y NO AGRESIVAS DE CTV EN PLANTAS.....</b>	<b>109</b>
3.1 INTRODUCCIÓN.....	111
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
3.2.1. Aislados de CTV.....	114
3.2.2. Diseño de cebadores y sondas de LNA.....	115
3.2.3. Extracción de RNA.....	118
3.2.4. Curvas estándar.....	118
3.2.5. Detección general de CTV mediante RT-PCR a tiempo real y análisis de las curvas de fusión.....	119
3.2.6. Detección de genotipos específicos de CTV mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA.....	120
3.2.7. Análisis temporal de la población viral en plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático y otro virulento mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA.....	121
3.3. RESULTADOS.....	122

3.3.1 Detección general de aislados de CTV y análisis de sus curvas de fusión.....	122
3.3.2 Detección específica de variantes de secuencia de CTV mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA.....	124
3.3.3 Detección cuantitativa de los tres tipos de variantes de secuencia en aislados de CTV.....	127
3.3.4 Movimiento sistémico y acumulación temporal de dos variantes de secuencia de CTV en plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático y otro virulento.....	131
3.4. DISCUSIÓN.....	136
<b>CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE UN SISTEMA GENÉTICO EFICIENTE BASADO EN LA AGROINFILTRACIÓN DE TEJIDOS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> CON CLONES DE cDNA DE UN AISLADO AGRESIVO DE ORIGEN ESPAÑOL INDUCTOR DE ACANALADURAS EN LA MADERA.....</b>	<b>143</b>
4.1. INTRODUCCIÓN.....	145
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	150
4.2.1. Detección de dRNAs de gran tamaño en plantas infectadas con el aislado T318A.....	150
4.2.2. Caracterización molecular de una familia de dRNAs de gran tamaño presentes en el aislado T318A.....	151
4.2.3. Aislamiento y transfección de protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> con viriones de CTV.....	151
4.2.4. Construcción y ensayo de infectividad de minireplicones de cDNA de T318A basados en dRNAs de gran tamaño.....	153
4.2.4.1. Obtención de minireplicones de T318A en vectores de transcripción <i>in vitro</i> .....	153
4.2.4.2. Síntesis de transcritos de RNA <i>in vitro</i> e inoculación de protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	154
4.2.4.3. Obtención de minireplicones de T318A en vectores de expresión <i>in planta</i> .....	155
4.2.4.3.1. Adición de un intrón de planta.....	155
4.2.4.3.2. Preparación de las construcciones para la expresión <i>in planta</i> .....	156
4.2.4.3.3. Subclonación de las construcciones en vectores BAC para la expresión <i>in planta</i> .....	157

4.2.4.3.4. Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i> con vectores BAC-CTV.....	158
4.2.5. Detección y cuantificación de dRNAs de T318A mediante RT-PCR a tiempo real.....	159
4.2.6. Construcción y ensayo de infectividad de clones de cDNA de longitud completa de T318A.....	161
4.2.6.1. Obtención de clones de cDNA de longitud completa de T318A en vectores de expresión <i>in planta</i> .....	161
4.2.6.2. Subclonación de las construcciones en un vector BAC y agroinfiltración en <i>N. benthamiana</i> .....	162
4.3. RESULTADOS.....	164
4.3.1. Detección y caracterización molecular de dRNAs de gran tamaño de T318A.....	164
4.3.2. Inoculación de viriones de T318A en protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	170
4.3.3. Desarrollo de minireplicones de cDNA basados en dRNAs de gran tamaño del aislado T318A.....	172
4.3.3.1. Obtención de minireplicones de T318A en vectores de transcripción <i>in vitro</i> e inoculación de protoplastos de <i>N. benthamiana</i> .....	172
4.3.3.2. Desarrollo y ensayos de infectividad de minireplicones de T318A en vectores de expresión <i>in planta</i> .....	175
4.3.3.2.1. Estabilización de las construcciones añadiendo un intrón de planta y desarrollo de cassettes de expresión <i>in planta</i> .....	175
4.3.3.2.2. Estabilización de las construcciones mediante subclonación en vectores BAC y agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	178
4.3.3.2.3. Desarrollo de un nuevo protocolo de RT-PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de dRNAs de T318A.....	181
4.3.4. Construcción y ensayos de infectividad de clones de cDNA de T318A de longitud completa.....	188
4.3.4.1. Obtención de clones de cDNA de longitud completa de T318A en vectores de expresión <i>in planta</i> y agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	188
4.3.4.2. Análisis de la infectividad de los vectores BAC-CTVFL.....	189
4.3.4.3. Ensayos de co-infiltración con clones BAC de los aislados T318A y T36.....	193

4.4. DISCUSIÓN.....	194
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>201</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>213</b>

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS

### 1.1. Importancia económica

El término “cítricos” se utiliza para designar un conjunto de especies e híbridos que pertenecen a los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* de la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioidea*. El cultivo de estas especies, originarias del sureste asiático, probablemente se inició en China y desde aquí se diseminó a otras zonas del mundo, inicialmente mediante el movimiento de semillas y posteriormente como plantas completas o material propagativo, siendo ésta la principal vía de dispersión de patógenos de unas zonas a otras. En la actualidad, el cultivo de los cítricos se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales. 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 los pomelos (*C. paradisi* Macf.). Los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) indican que actualmente se dedican más de 7 millones de hectáreas (Ha) al cultivo de los cítricos, con una producción aproximada de 107 millones de toneladas, constituyendo así el cultivo frutal de mayor importancia en el mundo.

En España, los cítricos se cultivan principalmente en las zonas costeras del este y del sur de la Península Ibérica y se localizan sobre todo en lugares próximos al litoral. España dedica unas 300.000 Ha a este cultivo y produce anualmente más de 6 millones de toneladas, ocupando así el quinto puesto entre los países productores detrás de Brasil, Estados Unidos, China y México. Sin embargo, ocupa el primer lugar como país exportador de fruta fresca con más de 3 millones de toneladas exportadas. La producción más importante es la de naranjas que aporta el 53%, seguida por las mandarinas con el 35% y los limones con el 11%. La producción de limas, zamboas y pomelos es insignificante.

### 1.2. El cultivo

En la mayor parte del mundo el cultivo de los cítricos se efectúa injertando yemas de una variedad seleccionada sobre un patrón cultivado a partir de semilla. Las especies (o híbridos) utilizadas como patrón son poliembriónicas y al sembrar sus semillas generalmente germina uno de los embriones nucelares en lugar del embrión cigótico, lo que da lugar a la homogeneidad genética de los patrones de una plantación. A su vez, la propagación vegetativa de la variedad garantiza la homogeneidad genética de las copas. Este proceso permite elegir el patrón más adecuado para las condiciones locales de cultivo y la variedad deseada, asegurando la homogeneidad de la producción. Sin embargo, la reducida diversidad genética del cultivo hace que las plantaciones sean más vulnerables al ataque por patógenos. De hecho, la utilización de patrones en la citricultura española ha estado condicionada en buena medida por la aparición y dispersión de determinadas enfermedades. Así, las epidemias ocasionadas en el siglo XIX por oomicetos del género *Phytophthora* dieron lugar a la utilización casi exclusiva del naranjo amargo como patrón, debido a su resistencia a las podredumbres producidas por este patógeno y a sus excelentes cualidades agronómicas. Sin embargo, las epidemias posteriores de tristeza dieron lugar a la destrucción masiva de estas plantaciones. En la actualidad, el citrange Carrizo es el patrón más utilizado por su tolerancia al decaimiento causado por el virus de la tristeza y por la buena calidad de fruta que induce en las variedades (Tabla 1). Sin embargo, la utilización masiva del citrange Carrizo supone un nuevo riesgo para la citricultura local frente a la aparición de nuevos patógenos que pudiesen afectarle.

El proceso de multiplicación vegetativa tiende a acumular y perpetuar patógenos transmisibles por injerto (virus, viroides y bacterias), particularmente aquellos que son naturalmente dispersados por vectores, como el virus de la tristeza de los cítricos. Este proceso causó durante años el deterioro sanitario progresivo de las variedades más utilizadas. Para revertir esta tendencia y mejorar la productividad de las plantaciones y la

calidad de la fruta fue necesario poner en vigor sistemas de cuarentena, saneamiento y certificación de plantas (Navarro, 1993).

Tabla 1. Patrones de cítricos utilizados en los plantones comercializados en la Comunidad Valenciana durante el periodo 1990-2000. Datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalidad Valenciana.

<b>Patrón</b>	<b>% total</b>
Citrango Carrizo	81.4
Mandarino Cleopatra	7.2
<i>Citrus macrophylla</i>	3.3
Citrango Troyer	2.9
<i>Citrus volkameriana</i>	2.6
Citrumelo	1.5
Naranja amargo	1.0
C-35	< 0.1
<i>Citrus taiwanica</i>	<0.1
<i>Poncirus trifoliata</i>	<0.1

## 2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos son susceptibles a numerosos microorganismos, algunos de los cuales les causan enfermedades y mermas apreciables en su capacidad productiva, o incluso la muerte. Entre las enfermedades más importantes que les afectan hay que destacar las de transmisión por injerto, que son una de las principales causas de pérdidas económicas en este cultivo. Estas enfermedades, causadas por parásitos intracelulares, se caracterizan porque los agentes que las producen van asociados al material vegetal y se propagan junto con éste. Algunas de ellas se pueden controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal propagado (Navarro, 1993; Navarro *et al.*, 2002), mientras que otras, además de propagarse con el material vegetal, se pueden transmitir mecánicamente con herramientas de corte o mediante insectos que actúan como vectores del agente patógeno, dificultando el control de la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 2. Enfermedades transmisibles por injerto más importantes de los cítricos agrupadas por tipos de agentes causales.

Enfermedad	Agente causal	Género	Transmisión por vectores	Detección en España
<b>Viroides</b>				
Caquexia	<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	<i>Hostuviroid</i>	-	+
Exocortis	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	<i>Pospiviroid</i>	-	+
Bolsas de goma	Probablemente un viroide	?	-	-
Corteza gomosa	Probablemente un viroide	?	-	-
<b>Virus</b>				
Enanismo del mandarino satsuma	<i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV)	<i>Sadwavirus</i>	?	-
Manchado foliar de los cítricos	<i>Citrus leaf blotch virus</i> (CLBV)	<i>Citrivirus?</i>	?	+
Hoja rasgada	<i>Citrus tatter leaf virus</i> (CTLV)	<i>Capilovirus</i>	-	-
Hoja rugosa	<i>Citrus leaf rugose virus</i> (CiLRV)	<i>Ilarvirus</i>	-	-
Leprosis	<i>Citrus leprosis virus</i> (CiLV)	<i>Cilerivirus</i>	+	-
Mosaico amarillo	<i>Citrus yellow mosaic virus</i> (CMBV)	<i>Badnavirus</i>	?	-
Protuberancias nerviales - agallas en la madera	Probablemente un luteovirus	?	+	+
Psoriasis	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)	<i>Ophiovirus</i>	?	+
Tristeza	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	<i>Closterovirus</i>	+	+
Muerte súbita	Etiología desconocida/ <i>Citrus suden death-associated virus</i> + CTV?	?	+	-
Variegación infecciosa	<i>Citrus variegation virus</i> (CVV)	<i>Ilarvirus</i>	-	+
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	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella</i>	+	-
Huanglongbing	<i>Candidatus Liberibacter asiaticum, africanum o americanum</i>	<i>Candidatus Liberibacter</i>	+	-
Stubborn	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Spiroplasma</i>	+	+
Escobas de bruja de la lima	<i>Candidatus Phytoplasma aurantifolia</i>	<i>Candidatus Phytoplasma</i>	?	
Blight	Etiología desconocida		?	-

Aunque tradicionalmente se les ha denominado virosis, sólo algunas de ellas tienen una etiología viral claramente demostrada, mientras que otras están causadas por viroides o bacterias, y la mayoría de ellas sigue siendo de etiología desconocida.

La Tabla 2 muestra las enfermedades más importantes de este grupo (Duran-Vila y Moreno, 2000), trece de las cuales se han detectado en España. La tristeza es una de las enfermedades transmisibles por injerto y vectores más importantes de los cítricos y una de las de mayor impacto económico a nivel mundial.

### **3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS**

La tristeza es una de las enfermedades transmisibles por injerto que ha tenido mayor importancia, 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. Se estima que en España ha causado la muerte de más de 50 millones de árboles de naranjo dulce, mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) y pomelo injertados sobre naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) (Cambra M, comunicación personal; Moreno *et al.*, 2008) y a nivel mundial la muerte de unos 100 millones. El agente causal de esta enfermedad es un closterovirus (*Citrus tristeza virus*, CTV) (Fawcett y Wallace, 1946; Kitajima *et al.*, 1963; Bar-Joseph *et al.*, 1970, 1972; Flores *et al.*, 1975; Garnsey *et al.*, 1977) que, al igual que los cítricos, procede probablemente de Asia donde estaría bien adaptado a las variedades locales. Con el movimiento de plantas y yemas que tuvo lugar desde la segunda mitad del siglo XIX, el virus debió dispersarse a otras zonas cítricas, donde pasó a nuevas variedades y combinaciones variedad-patrón que resultaron sensibles al mismo.

En la actualidad CTV se encuentra presente con incidencia desigual en todas las zonas cítricas del mundo. Es prácticamente endémico en todas las zonas de Asia, Australia, Africa del Sur y gran parte de

Sudamérica, mientras que tiene una incidencia mínima en varios países del Mediterráneo (Figura 1) (Cambra y Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2008).

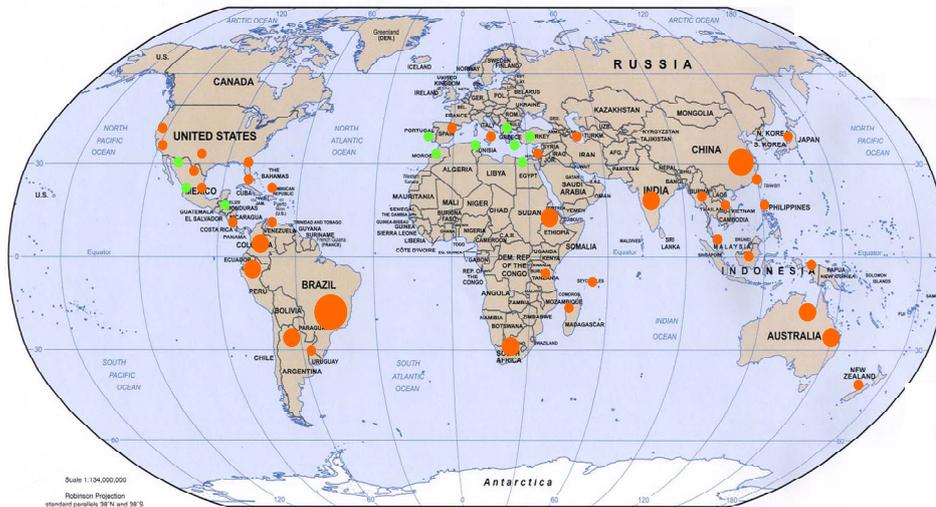


Figura 1. Zonas geográficas donde CTV es endémico (círculos color naranja) o tiene escasa incidencia (círculos color verde).

### 3.1. Gama de huéspedes y síntomas

Los huéspedes naturales de CTV pertenecen a la familia de las Rutáceas, aunque se ha transmitido experimentalmente a algunas especies del género *Passiflora* (Müller *et al.*, 1974; Yoshida *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000). Dentro de la familia *Rutaceae* se ha detectado en la mayoría de las especies y variedades del género *Citrus* y algunas especies de los géneros *Fortunella*, *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* y *Swinglea* (Bar-Joseph y Lee, 1989a; Bar-Joseph *et al.*, 1989b; Moreno *et al.*, 2008). Algunas especies son resistentes a casi todos los aislados de CTV e impiden la acumulación del virus en la planta, como es el caso de *P. trifoliata* (L.) Raf. y algunos híbridos de éste con naranjo dulce o pomelo, *Severina buxifolia* y *Swinglea glutinosa*, si bien se ha observado

replicación normal de CTV en protoplastos de *P. trifoliata* (Albiach-Martí *et al.*, 2004). Otras como algunas zamboas, especies del género *Fortunella* o el citrumelo 4476 (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*) (Garnsey *et al.*, 1987; Mestre *et al.*, 1997a; capítulo 1 de esta tesis) son resistentes sólo a algunos aislados. Al inicio de esta memoria no se habían descrito huéspedes herbáceos, excepto protoplastos de *Nicotiana benthamiana* (Navas-Castillo *et al.*, 1997), que pudiesen ser utilizados como planta modelo experimental, lo que ha dificultado mucho la caracterización genética y molecular de CTV.

El tipo e intensidad de los daños provocados por la tristeza en campo depende de las especies infectadas, del patrón sobre el que están injertadas, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Grant y Costa, 1951; Aubert y Bové, 1984; Roistacher y Moreno, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993). Algunos aislados resultan asintomáticos incluso en las especies o combinaciones más sensibles, como es el caso de la cepa K detectada en Córcega (Albertini *et al.*, 1988; Bové *et al.*, 1988), pero la mayoría de ellos producen uno o más de los siguientes síndromes: a) decaimiento de plantas injertadas sobre naranjo amargo (“decline”, DL), un síndrome conocido como “tristeza”, ii) enanismo, acanaladuras en la madera y fruta pequeña en algunas variedades (“stem pitting”, SP) y iii) enanismo y amarilleo de plantas francas de limonero [*Citrus limon* (L.) Burn. f.], pomelo (*C. paradisi* Macf.) o naranjo amargo, un síndrome conocido como “seedling yellows” (SY) (Fraser, 1952).

El síndrome del decaimiento de las plantas injertadas sobre naranjo amargo ha sido el causante de la muerte masiva de árboles en numerosas zonas cítricas y el que inspiró el nombre de la enfermedad “tristeza” y posteriormente el del virus (Figura 2A). La mayoría de las especies de cítricos son sensibles al decaimiento por CTV cuando están injertadas sobre patrón naranjo amargo. Sin embargo, también se han descrito aislados que causan infecciones asintomáticas en estas combinaciones (Moreno *et al.*, 1991; Borbón *et al.*, 1995). En las plantas injertadas sobre naranjo amargo CTV desencadena una necrosis de los tubos cribosos del floema del patrón, que da lugar a la desnutrición y muerte de las raicillas y con el tiempo

conduce a la muerte del árbol. Este proceso puede ocurrir en unas pocas semanas (colapso o "quick decline"), quedando el árbol totalmente seco con las hojas y los frutos colgando de las ramas (Figura 2A) (Ben-Ze'ev *et al.*, 1989). No obstante, en la mayoría de los casos la infección por el virus conlleva un deterioro progresivo de la planta, que experimenta un amarilleo general de las hojas, pérdida del follaje y muerte de ramillas, reducción del crecimiento y del número de brotaciones y producción de frutos pequeños y de color pálido, que al cabo de varios años producen la muerte del árbol (McClellan, 1974; Moreno *et al.*, 1983, 2008). Normalmente, los árboles afectados presentan pequeñas proyecciones en la cara cambial de la madera, por debajo de la línea de injerto, que se corresponden con pequeños orificios en la corteza (Figura 2B). Este último síntoma se utiliza frecuentemente para el diagnóstico de CTV en campo (Moreno *et al.*, 1983, 2008).

Los aislados más virulentos de CTV, además de inducir el decaimiento de árboles injertados sobre naranjo amargo, pueden producir daños directos en distintas especies y variedades de cítricos injertadas sobre cualquier patrón. Los síntomas más característicos incluyen la formación de acanaladuras en la madera que conlleva la deformación de los troncos y ramas (Figura 2C) (Grant, 1959; McClellan, 1974), la reducción del crecimiento de la planta, la disminución en la producción y calidad de los frutos (Figura 2D) y la clorosis nervial y acorchamiento de nerviaciones en diferentes especies (Figura 2G) (Müller *et al.*, 1968; Sasaki, 1981; Da Graça *et al.*, 1984).

Algunos aislados de CTV, cuando son inoculados en plantas de semilla de pomelo, limonero o naranjo amargo, inducen una reacción denominada "SY", que consiste en una clorosis generalizada en la nueva brotación y una detención del crecimiento (Fraser, 1952; McClellan y Van de Plank, 1955; Grant, 1959; McClellan 1974; Wallace, 1978). Este síndrome que suele ir asociado a los aislados más virulentos, no aparece normalmente en campo, pero se utiliza en invernadero para caracterizar biológicamente aislados del virus de la tristeza. (Figura E y F).

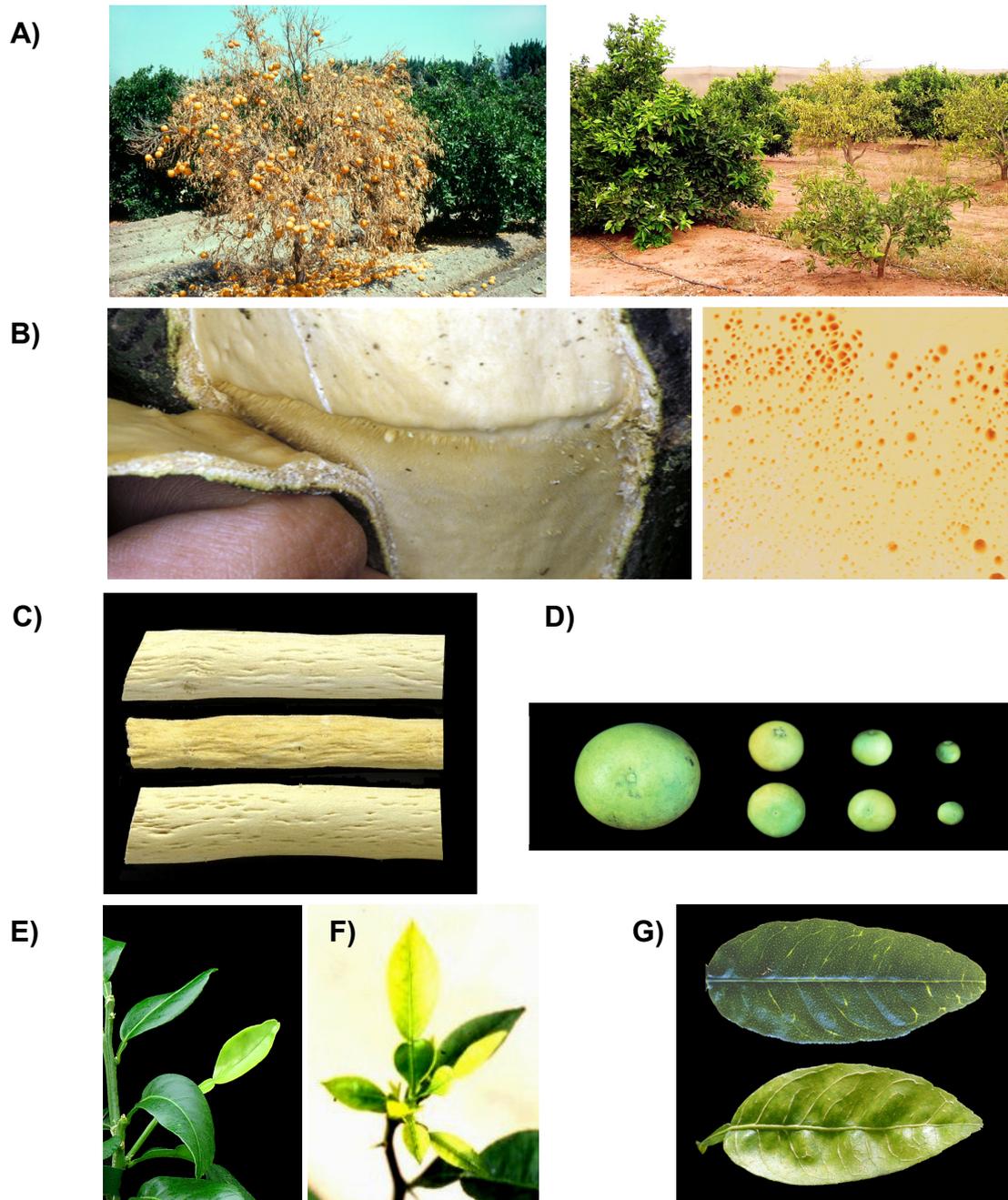


Figura 2. Diferentes síntomas inducidos por CTV. A) decaimiento y muerte de plantas injertadas sobre naranjo amargo, B) proyecciones en la cara cambial de la madera y orificios en la corteza por debajo de la línea de injerto C) Acanaladuras en la madera de naranjo dulce causadas por un aislado virulento de CTV, D) Producción de fruta pequeña, E) y F) Enanismo y amarilleo en plantas de semilla de pomelo (E) y naranjo amargo (F) y G) Clorosis nervial y acorchamiento en nerviaciones de *Citrus macrophyla*.

### 3.2. El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV)

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 miembros de esta familia tienen viriones de morfología filamentosa (12 x 800-2000 nm), 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), que se ensamblan formando una estructura helicoidal. Una de ellas (CP) cubre la mayor parte del RNA genómico, mientras que la otra cubre un segmento reducido del extremo 5' terminal, lo que da al virión una morfología similar a una serpiente de cascabel (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996) (Figura 3).

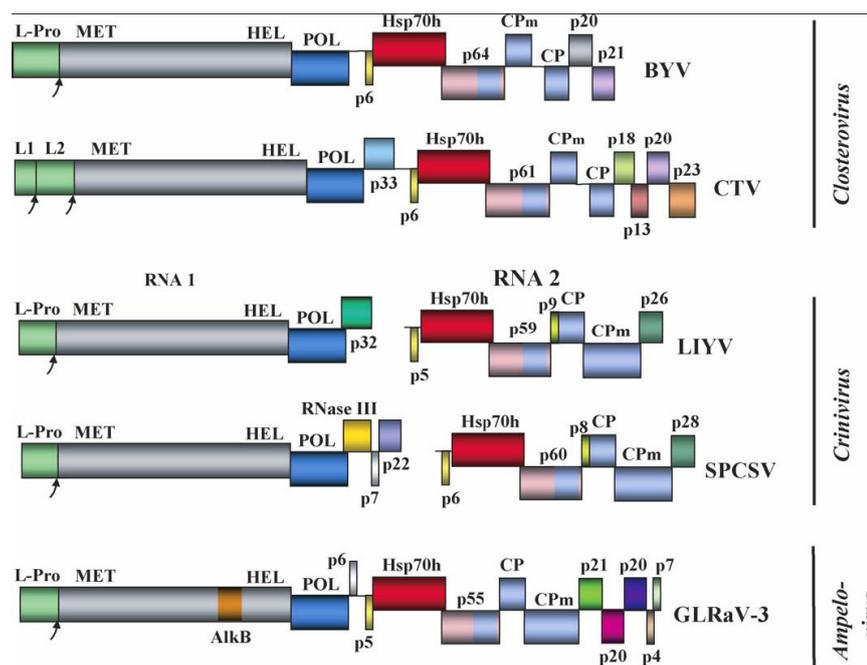


Figura 3. Esquema de la organización genómica de miembros de los tres géneros de la familia *Closteroviridae*: BYV, *Beet yellows virus*; CTV, *Citrus tristeza virus*; LIYV, *Lettuce infectious yellows virus*; SPCSV, *Sweet potato chlorotic stunt virus*; GLRaV-3, *Grapevine leafroll-associated virus-3* (tomado de Dolja *et al.*, 2006). El nombre del género se muestra a la derecha. Las proteínas conservadas en los tres géneros se muestran con la misma designación y código de color encima o debajo de las ORFs.

En todos los miembros de la familia se halla además conservado 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 divergente de ésta minoritaria (CPm), y una última proteína de mayor tamaño considerada también como divergente de CP (Figura 4) (Dolja *et al.*, 2006).

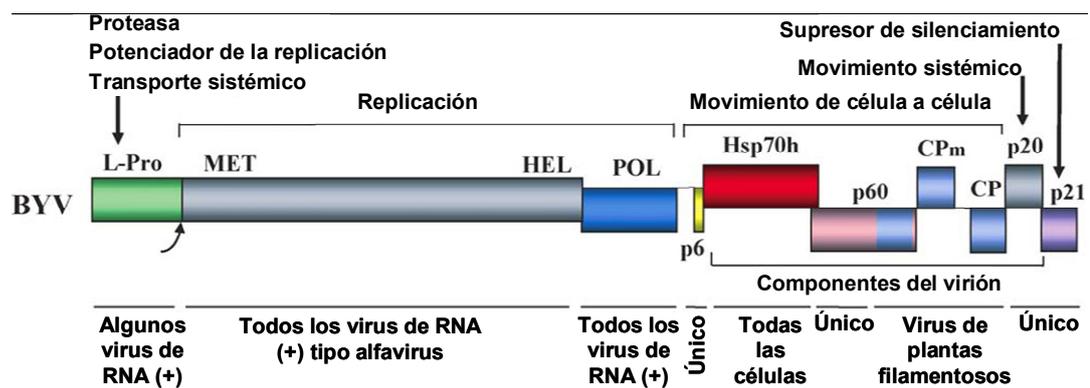


Figura 4. Complejidad genética y estructural de BYV, miembro tipo del género *Closterovirus*: organización genómica, funciones virales de las distintas regiones génicas y conexiones evolutivas de los diferentes módulos génicos con virus de plantas de otros géneros (tomado de Dolja *et al.*, 2006).

Otras características son la formación de vesículas membranosas citoplasmáticas aisladas o agrupadas con masas de viriones en las células del floema y transmisión de modo semipersistente por insectos vectores homópteros, siendo la transmisión mecánica generalmente imposible.

### 3.2.1. Organización genómica de CTV

Los viriones de CTV son partículas flexuosas de alrededor de 2000 nm de longitud x 11 nm de diámetro, con una única molécula de RNA genómico (gRNA) de ~19.3Kb y dos proteínas de cápsida de 25 (CP) y 27(CPm) kDa que cubren el 97% y 3% de la longitud del virión, respectivamente (Febres *et al.*, 1996; Satyanarayana *et al.*, 2004) (Figura 5).

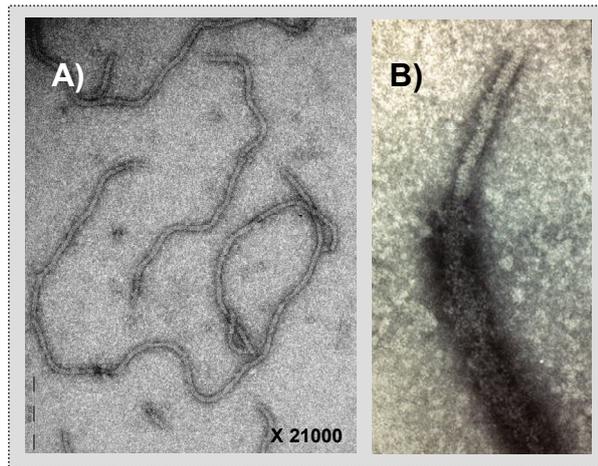


Figura 5. Micrografías electrónicas de viriones purificados de CTV procedentes de *L. mexicana* infectada. A) Tinción negativa con acetato de uranilo al 1% y observación a 80 kV (Foto obtenida por S. Ambrós. B) Ausencia de decoración con anticuerpos específicos de la CP en el extremo 5' de las partículas de CTV.

El gRNA de CTV está organizado en 12 pautas de lectura (ORFs) que potencialmente codifican al menos 17 productos proteicos y dos zonas no codificantes (UTR) de 107 y 273 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 6).

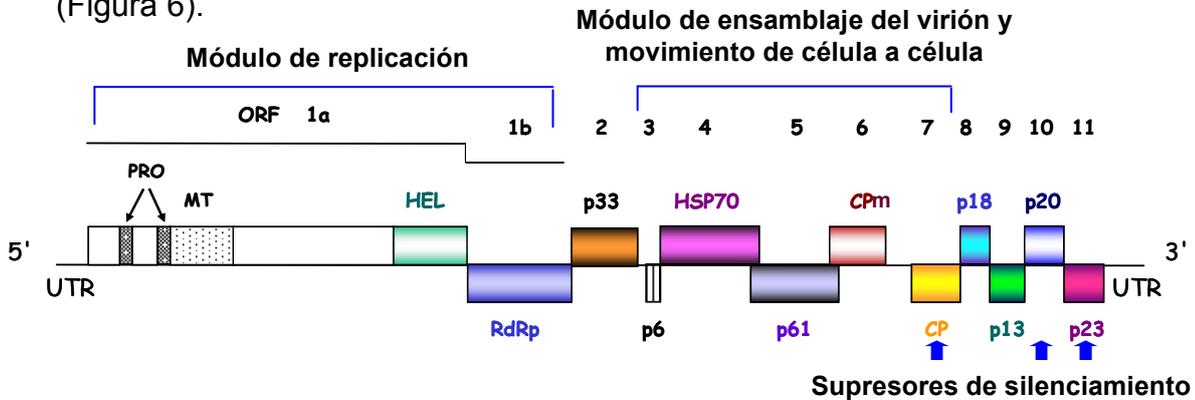


Figura 6. Representación gráfica de la organización genómica del gRNA de CTV. Las cajas representan las ORFs con su respectivo número y se indica la proteína que codifican en la parte superior o inferior. También se muestran los dominios homólogos de metiltransferasa (MT), helicasa (HEL) y proteasa (Pro) presentes en la ORF 1a y se indican las regiones no traducibles (UTR) de los extremos 5' y 3'.

La región 5' UTR debe participar en la unión de los ribosomas para la traducción de la ORF 1, de la que resultaría la replicasa viral necesaria para replicar el gRNA y producir los sgRNA de las ORFs 2 a la 11 para la

expresión de las demás proteínas virales. La estructura secundaria de mínima energía libre más estable predicha para los tres grupos definidos por López *et al* (1998) es muy similar y consiste en dos bucles, separados por una pequeña región espaciadora (Figura 7).

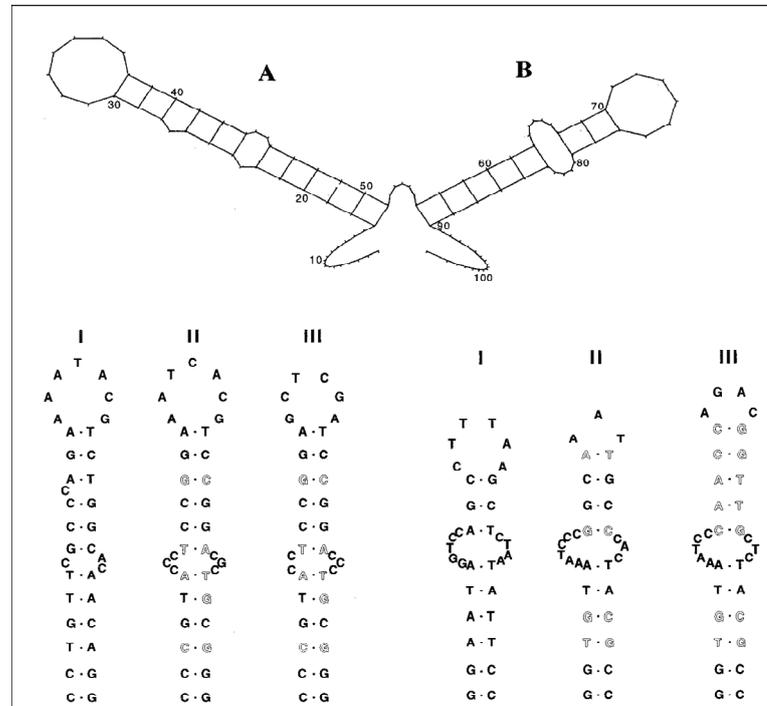


Figura 7. Estructura secundaria de mínima energía libre predicha con el programa MFOLD para la región 5' UTR del aislado T36 (arriba). Estructura primaria y secundaria de los bucles/tallos A (izquierda) y B (derecha) de las secuencias 5' UTR de los grupos I (T36), II (VT) y III (T317) de CTV (tomado de López *et al.*, 1998). En negrita se indican las mutaciones simples o dobles respecto a la secuencia de T36 que mantienen la estructura de los bucles/tallos A y B (abajo).

La región 3' UTR de CTV debe estar implicada en el reconocimiento de la RNA polimerasa como ocurre en otros virus de plantas vegetales (Gallie y Kobayashi, 1994). Aunque en la región 3' UTR de CTV no se han encontrado estructuras tipo poli A o tipo tRNA como las utilizadas por otros virus para estabilizar sus RNAs e impedir la degradación por endonucleasas, se ha descrito la presencia potencial de una compleja estructura secundaria de mínima energía compuesta por 10 horquillas (Pappu *et al.*, 1994;

Satyanarayana *et al.*, 2002a) que probablemente cumplen la misma función (Figura 8).

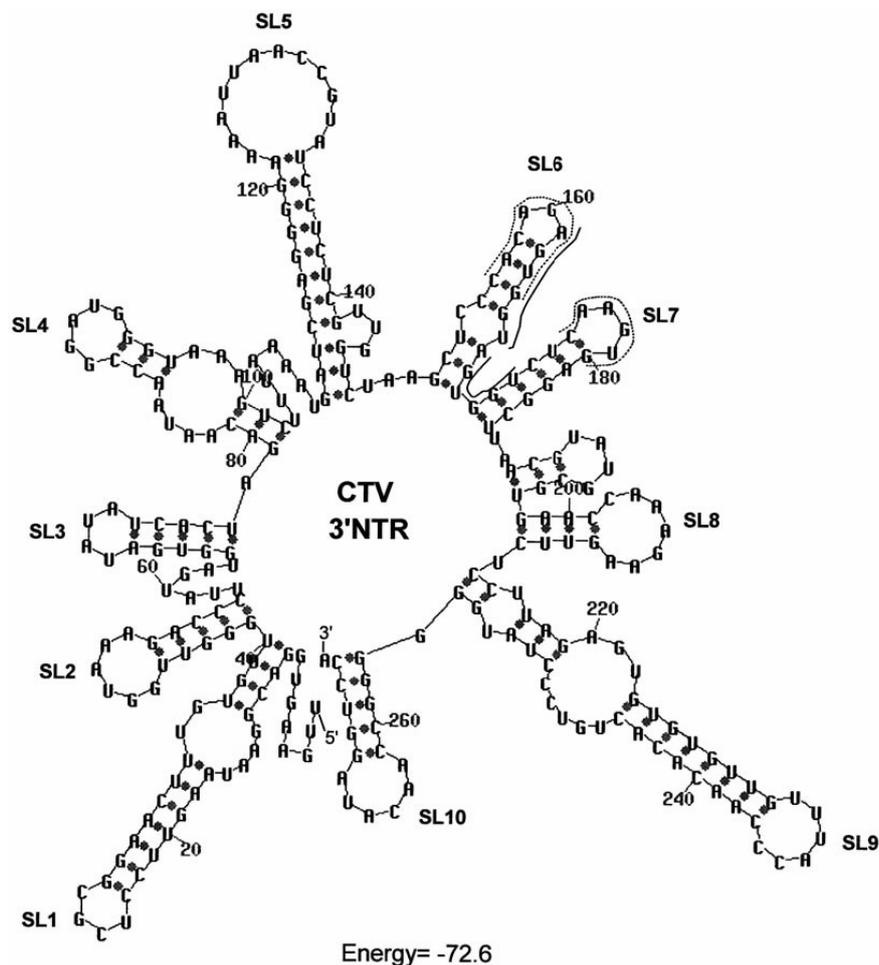


Figura 8. Estructura secundaria de mínima energía libre predicha con el programa MFOLD para el extremo 3' UTR del aislado T36 de CTV. Las 10 horquillas independientes que se observan se indican como SL1 a SL10 (tomado de Satyanarayana *et al.*, 2002a).

La región codificante del gRNA comprende en su mitad 5' el módulo de replicación (ORFs 1a y 1b) (Figura 6). La ORF 1a codifica una poliproteína de 349 kDa, que incluye dominios papain-proteasa (Pro), helicasa (HEL) y metiltransferasa (MTR). La alta homología de secuencia entre las dos proteasas parece indicar que la segunda de ellas se habría originado por una duplicación en tándem. Su función sería la proteólisis de la

poliproteína cuyos componentes participarían en la replicación del genoma (Karasev *et al.*, 1995). La ORF 1b codifica una proteína de 57 kDa con los dominios típicos de las RNA polimerasas RNA dependientes (RdRp).

Por otro lado, la mitad 3' terminal del gRNA contiene: un módulo de cinco genes (*p6*, *p65*, *p61*, *p27* y *p25*) que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje del virión y el movimiento de célula a célula, que está conservado en todos los miembros de la familia *Closteroviridae*; el gen *p20*, un homólogo del gen *p21* de *Beet yellow virus* (BYV), y cuatro genes que codifican las proteínas *p33*, *p18*, *p13* y *p23*, que no tienen homólogos en otros closterovirus (Dolja *et al.*, 2006) (Figura 6). El módulo de cinco genes conservado incluye las proteínas *p65* y *p61* (ORFs 4 y 5, respectivamente), la primera de ellas con homología con proteínas de choque térmico (*heat shock protein*, HSP) de plantas de la familia HSP70, que junto con las proteínas de cubierta *p27* y *p25* participan en el ensamblaje de los viriones posiblemente participando como “chaperonas moleculares” (proteínas necesarias para el plegamiento correcto de otras proteínas) (Satyanarayana *et al.*, 2000). En el aislado T36 de Florida se ha observado que la proteína *p27* recubre los primeros 627 nt del gRNA (extremo 5') y la proteína *p25* los 18669 nt restantes, y que las proteínas *p65* y *p61* participan en este ensamblaje específico, ya que en ausencia de ellas *p27* puede cubrir segmentos más grandes o incluso el gRNA completo (Satyanarayana *et al.*, 2004). Además, se ha determinado que las secuencias localizadas en el extremo 5' UTR, que forman dos horquillas muy estables (Figura 7), están relacionadas con la unión de *p27* a éste extremo (Satyanarayana *et al.*, 2004). La homóloga a la proteína *p6* en BYV actúa como una proteína de movimiento (Peremyslov *et al.*, 2004).

La proteína *p20* (ORF 10) tiene una alta afinidad por si misma y forma cuerpos de inclusión amorfos en células infectadas (Gowda *et al.*, 2000). La proteína *p23* (ORF 11) es una proteína que une específicamente RNA de manera cooperativa (López *et al.*, 2000) y es la responsable del control de la acumulación asimétrica de RNAs de ambas polaridades durante la replicación y transcripción del gRNA (Satyanarayana *et al.*, 2002b). Además, *p23* es un determinante de patogenicidad de CTV, ya que plantas

transgénicas de lima Mexicana que expresaban el gen *p23*, mostraron síntomas similares a los observados en plantas no transgénicas infectadas con CTV (Figura 9), mientras que plantas transformadas con una versión truncada de *p23* mostraron un fenotipo normal. La intensidad de síntomas se asoció con los niveles de acumulación de la proteína *p23* (Fagoaga *et al.*, 2005). Contrariamente, en la expresión transgénica de *p23* en especies no huésped de CTV como *N. tabacum* y *N. benthamiana* se observó una acumulación consistente de *p23* aunque sin aberraciones fenotípicas, sugiriendo que *p23* podría interactuar con procesos de desarrollo de la planta regulados por miRNA en *Citrus* y *Poncirus* pero no en plantas no huéspedes como *Nicotiana* (Fagoaga *et al.*, 2005). Por otro lado, *p20* y *p23*, además de *p25*, actúan como supresores de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*, con *p23* inhibiendo el silenciamiento intracelular, *p25* el silenciamiento intercelular y *p20* ambos (Lu *et al.*, 2004).



Figura 9. Síntomas de clorosis nervial observados en hojas de limas transgénicas que expresan *p23*: hojas de una planta no transgénica inoculada con un aislado agresivo de CTV (arriba) y de una planta transgénica no inoculada que expresa la proteína *p23* (tomado de Ghorbel *et al.*, 2001).

Por último, la función de las proteínas *p33*, *p18* y *p13* es aún desconocida. Mutantes con los genes *p33*, *p18* y *p13* suprimidos fueron capaces de replicarse y ensamblarse (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2000), indicando que no son necesarios para estas funciones y recientemente se ha

demostrado que dichos mutantes pueden además causar infección sistémica y síntomas normales en cítricos (Tatineni *et al.*, 2008).

### 3.2.2. Desarrollo de un clon infeccioso de CTV

Los conocimientos actuales sobre la biología molecular de CTV, incluyendo aspectos tan importantes como el movimiento célula a célula, el movimiento sistémico a larga distancia, la relación con sus vectores o la relación con sus huéspedes y la expresión de síntomas, son muy limitados y algunas de las funciones génicas se han inferido por similitud de secuencia con otros virus conocidos (Dolja *et al.*, 1994). Pese a ello, en los últimos años se ha avanzado significativamente en el conocimiento de la función de las distintas partes del genoma, fundamentalmente en lo referente a la replicación del virus, gracias a la obtención de un clon de cDNA del genoma completo del aislado T36 de Florida y al desarrollo de un sistema genético basado en el mismo. Este sistema consiste en la obtención *in vitro* de transcritos de RNA del genoma completo que son infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y dan lugar a viriones normales de CTV (Satyanarayana *et al.*, 1999). Como la infectividad así obtenida es muy baja (del orden de  $10^{-4}$ ) y la cantidad de viriones generados era mínima, éstos habían de ser amplificados mediante sucesivos pases a nuevos lotes de protoplastos hasta reunir una cantidad suficiente para ser mecánicamente inoculados en cítricos (Figura 10).

Mediante este procedimiento se demostró que los viriones obtenidos a partir del clon de cDNA reproducían los síntomas característicos del aislado original: decaimiento y SY (Satyanarayana *et al.*, 2001). La obtención de un nuevo clon de cDNA en el que se habían suprimido las ORFs 2-11 (minireplicón  $\Delta$ cla) permitió comprobar que los transcritos de RNA sintetizados *in vitro* a partir de éste eran altamente infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana* y que la infección ocurría de forma más rápida y con niveles de acumulación más altos que los observados con el clon de longitud completa. Esto indicaba que las ORFs eliminadas no eran necesarias en la replicación del virus y además proporcionó un sistema

genético mucho más fácil de manejar para el estudio de la replicación de CTV. La obtención y manipulación de distintos minireplicones en los que se suprimían o alteraban distintas regiones genómicas codificantes o UTRs ha permitido en los 10 últimos años avanzar en el conocimiento de las estrategias de replicación, regulación y encapsidación de CTV (Gowda *et al.*, 2000, 2001, 2003a, b; Satyanarayana *et al.*, 2000, 2002a, b, 2004).

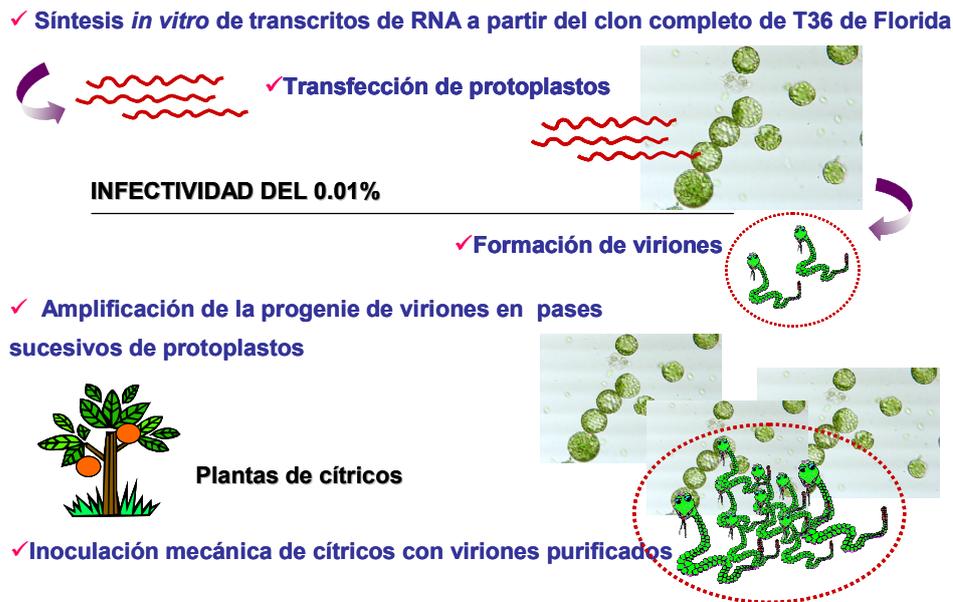


Figura 10. Esquema del sistema genético de T36 basado en: transfección de protoplastos de *N. benthamiana* con transcritos de RNA sintetizados *in vitro* a partir del clon infeccioso, formación de viriones, amplificación de la progenie mediante sucesivos pases de protoplastos e inoculación mecánica de cítricos con los viriones purificados.

Asimismo, la manipulación del clon de cDNA de longitud completa para añadirle un gen adicional que expresase la proteína fluorescente verde GFP ha permitido disponer de un vector viral para la expresión potencial de otras proteínas en cítricos y de una herramienta valiosa para estudiar el movimiento y distribución de CTV en distintas especies (Folimonov *et al.*, 2007; Tatineni *et al.*, 2008). De forma similar, la obtención de construcciones quiméricas en las que algunas regiones del genoma se intercambian por las de otros aislados con características patogénicas diferentes permitirá localizar los elementos genéticos responsables de los distintos síntomas.

Aunque la inoculación de protoplastos con transcritos de RNA ha sido el único sistema genético disponible para estudiar la función de distintos genes el procedimiento presenta limitaciones importantes como: i) la importante toxicidad del clon de cDNA y los minireplicones en *Escherichia coli* (Satyanarayana *et al.*, 2003) que da lugar a un crecimiento extraordinariamente lento de los cultivos y a veces a una reorganización del plásmido, ii) la inoculación sucesiva de nuevos lotes de protoplastos es un proceso largo y tedioso que da lugar a la pérdida de muchos experimentos debido a la contaminación de los cultivos de protoplastos, y iii) sólo se pueden manipular aquellos genes que no afecten seriamente el ensamblaje de los viriones, ya que éstos son necesarios para la inoculación de cítricos.

### **3.2.3. Expresión del genoma viral**

La expresión del genoma de CTV incluye al menos tres mecanismos que son ampliamente utilizados por otros virus de RNA y que son necesarios para multiplicarse e invadir el huésped: procesamiento proteolítico, deriva ribosomal y producción de RNAs subgenómicos 3' co-terminales (Ayllón *et al.*, 2003, 2004; Gowda *et al.*, 2001, 2003a, b; Hilf *et al.*, 1995; Karasev *et al.*, 1995, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2002a, b) (Figura 11). La replicación del gRNA de CTV implica la síntesis de un RNA complementario de polaridad negativa, que posteriormente sirve como molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva, que constituyen el genoma del virus. Las ORFs 1a y 1b se traducen directamente a partir del gRNA. La ORF 1a codifica una poliproteína de unos 349 KDa que es procesada proteolíticamente, mientras que, la traducción de la ORF 1b ocurre por un mecanismo de deriva ribosomal tipo +1 ocasional y produce una poliproteína de unos 403 KDa (Karasev *et al.*, 1995).

Los 10 genes de la mitad 3' del gRNA de CTV se expresan mediante la síntesis de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3' co-terminales con el gRNA, que actúan como RNAs mensajeros a partir de los cuales se traduce el gen que ocupa la posición 5' terminal (Hilf *et al.*, 1995). En las células infectadas se sintetiza un grupo similar de sgRNAs de polaridad negativa, que se

acumulan unas 40-50 veces menos que los sgRNAs de polaridad positiva (Satyanarayana *et al.*, 2002b). (Figura 12). La producción de sgRNAs 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 que primero se detecta durante la infección de CTV y los de las ORFs 10 y 7, que codifican las proteínas p20 y p25, son los más abundantes.

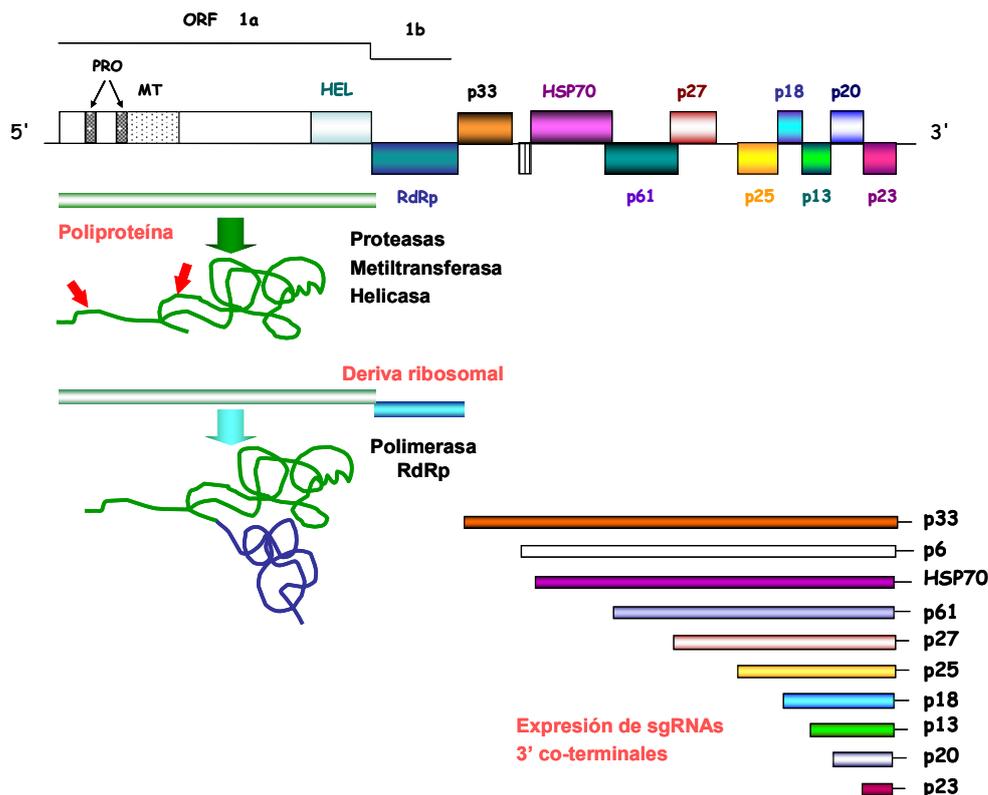


Figura 11. Representación gráfica del gRNA de CTV y de las estrategias de expresión de las distintas ORFs de las mitades 5' y 3': procesamiento proteolítico, deriva ribosomal y producción de sgRNAs 3' co-terminales. Otros detalles como en la Figura 6.

Se han localizado las secuencias reguladoras de la expresión de los sgRNAs en el gRNA en posición 5' con respecto al inicio de transcripción de los sgRNAs (Ayllón *et al.*, 2003; Karasev *et al.*, 1997), sin embargo, no se ha podido determinar si se trata de secuencias promotoras (secuencias en la cadena negativa del gRNA a las que se une la polimerasa e inicia la síntesis

de una cadena de polaridad positiva) o si se trata de secuencias terminadoras (secuencia donde finaliza la copia de la cadena negativa por parte de la polimerasa y que luego sirven de molde para la síntesis de la copia de polaridad positiva), por lo que se las ha llamado “elementos controladores” (Ayllón *et al.*, 2004; Gowda *et al.*, 2001, 2003a) (Figura 12).

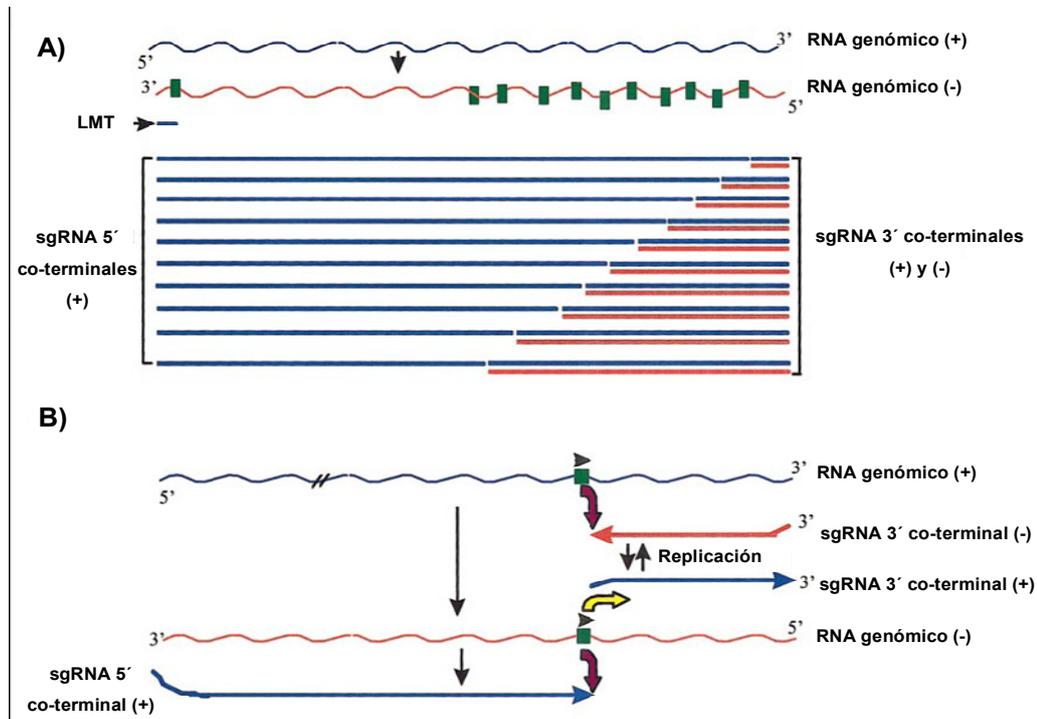


Figura 12. Modelo propuesto para la replicación de CTV y la síntesis de las diferentes especies de RNAs producidos en células infectadas (tomado de Gowda *et al.*, 2001). Las líneas onduladas esquematizan RNAs transcritos durante la replicación a partir del gRNA; en azul o rojo se indica la polaridad positiva o negativa de las cadenas, respectivamente. Las posiciones de los elementos controladores (CE) de los sgRNAs se indican con cuadrados verdes sobre el gRNA. A) Expresión de las ORFs 2 a 11 mediante sgRNAs 3' co-terminales que actúan como mensajeros de la ORF contenida en su extremo 5' y síntesis de sgRNAs 5' co-terminales. B) Modelo propuesto para la replicación de los sgRNAs por acción de los CE; las flechas pequeñas granates o amarillas indican terminación o inicio de la transcripción en el CE, respectivamente.

Cada elemento controlador de los sgRNAs induce la formación de tres RNAs diferentes: un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que sirve como mensajero para la expresión del gen adyacente a dicho elemento controlador, un RNA de polaridad negativa complementario al anterior pero con una acumulación mucho menor por la acción de la proteína p23 (ORF 11) (Satyanarayana *et al.*; 2002b), y un tercer RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que se extiende desde el extremo 5' del gRNA al extremo 5' del elemento controlador (Gowda *et al.*, 2001). Este tercer tipo de RNA se podría originar por una terminación prematura de la síntesis de nuevas copias del gRNA en las proximidades de cada elemento controlador. Se han caracterizado además dos elementos controladores próximos al extremo 5' del genoma que dan lugar a la síntesis de otros dos RNAs 5' co-terminales de simple cadena y polaridad positiva denominados LMTs (*Low Molecular-weight Tristeza*) con tamaños que oscilan entre 842 y 854 nt para el LMT1 y entre 744 y 746 nt para el LMT2 (Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2003a). La función de estos nuevos elementos controladores y de los dos LMTs en el ciclo biológico de CTV es desconocida (Gowda *et al.*, 2003a). Por tanto, las células infectadas con CTV contienen más de 30 especies de RNA viral diferentes entre los gRNAs y sgRNAs 3' co-terminales de ambas polaridades y los sgRNAs 5' co-terminales (Ayllón *et al.*, 2004; Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2001, 2003a; Mawassi *et al.*, 1995a).

Frecuentemente, las células infectadas con CTV también acumulan grandes cantidades de RNAs defectivos (dRNAs) de cadena positiva y negativa que contienen los extremos 3' y 5' del gRNA pero carecen de una porción variable de la región central. Los dRNAs son generados por eventos de recombinación no homóloga mediante mecanismos tales como la rotura y ligación de las cadenas, cambio de molde conducido por la replicasa y cambio de molde inducido por rotura o finalización del molde original (Nagy y Simon, 1997). En los dos últimos modelos, la replicasa y la cadena naciente se desprenderían del RNA molde y se unirían a un molde distinto o a otra región de la misma molécula para continuar en la nueva localización la síntesis de RNA. El cambio de molde podría ser inducido por factores como la presencia de estructuras secundarias que frenan la polimerasa y pueden

facilitar la separación de ésta del RNA molde, o por finalización de éste como ocurre en la transcripción de sgRNAs (Ayllón *et al.*, 1999a; Yang *et al.*, 1997). La elección del nuevo molde podría verse facilitada por la presencia de una secuencia repetida en zonas distintas del genoma. Casi todos los dRNAs de CTV que han sido caracterizados hasta el momento consisten en la fusión directa de segmentos de tamaño variable de los extremos 5' y 3' (Mawassi *et al.*, 1995a, b; Yang *et al.*, 1997, 1999; Ayllón *et al.*, 1999a), si bien Mawassi *et al.* (1995b) describieron un dRNA de 2.4 kb que contenía en la zona de unión 14 nt de origen no viral. La mayoría de aislados de CTV contienen uno o más dRNAs con tamaños que normalmente oscilan entre 2 y 5 kb (Dodds *et al.*, 1987; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995a, b; Moreno *et al.*, 1990), pero también se han descrito dos tipos de dRNAs de gran tamaño que comprenden: i) las ORFs 1a y 1b en su mitad 5' y una pequeña región del extremo 3', por lo que pueden replicarse autónomamente y su organización genómica recuerda el RNA 1 de los crinivirus (familia *Closteroviridae*) (Che *et al.*, 2002), o ii) las ORFs 2 a 11 en su mitad 3' y una pequeña región del extremo 5', lo que les hace análogos al RNA 2 de los miembros del género *Crinivirus* (Che *et al.*, 2003). Los dRNAs de pequeño tamaño que carecen de capacidad replicativa autónoma aparentemente contienen todas las secuencias necesarias para ser transcritos (en *trans*) por la maquinaria de replicación del virus y en muchos casos para ser encapsidados (Mawassi *et al.*, 1995a). Estas secuencias están localizadas en los primeros mil nucleótidos del extremo 5' y en el extremo 3' UTR del dRNA (Mawassi *et al.*, 2000a, b).

La replicación de dRNAs puede interferir con la del RNA genómico del virus auxiliar y dar lugar a una atenuación de los síntomas en las plantas infectadas (Hillman *et al.*, 1987; Scholthof *et al.*, 1995; Rochon, 1991; Burguàn *et al.*, 1992), a una intensificación de los mismos (Li *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1993) o dejar éstos inalterados (White *et al.*, 1991; Graves y Roosinck, 1995). En CTV no se ha descrito un efecto interferente de los dRNAs, si bien en un caso se ha sugerido que la presencia de un dRNA podría modular la expresión de síntomas (Yang *et al.*, 1999). La presencia

frecuente de dRNAs en los aislados de CTV sugiere que estas moléculas podrían tener algún papel biológico importante.

### 3.3. Diagnóstico y caracterización de aislados

En plantaciones injertadas sobre naranjo amargo, la observación de síntomas como la presencia de proyecciones en la madera y orificios en la cara cambial de la corteza del naranjo amargo por debajo de la línea de injerto permite un diagnóstico preliminar de la infección por CTV (Ver Figura 2B). Este síntoma no se observa en infecciones recientes ni en plantas propagadas sobre patrones tolerantes al decaimiento y además es similar al producido por la enfermedad conocida como stubborn (Tabla 2) (Bové y Vogel, 1981), por lo que no es totalmente fiable para diagnosticar la presencia de CTV y es necesario utilizar ensayos adicionales para confirmar la presencia del virus.

El método más tradicional de diagnóstico es el ensayo de infectividad en invernadero (Roistacher, 1991, Garnsey *et al.*, 1995), que consiste en inocular por injerto plantas de semilla de especies indicadoras sensibles a los distintos síndromes de CTV (lima Mexicana o *C. macrophylla*, naranjo dulce, naranjo amargo, pomelo, etc), y observar al cabo de unos meses la aparición de los síntomas correspondientes: decaimiento, enanismo, acopamiento de las hojas, clorosis nervial discontinua, SY, acorchamiento de las nerviaciones (en los aislados más virulentos) y SP (ver Figura 2). Este procedimiento, además de específico y sensible para el diagnóstico, permite diferenciar los aislados por su virulencia, si bien resulta lento y caro y no permite análisis masivos de muestras, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos. Por otra parte, se han detectado aislados de tristeza que son asintomáticos incluso en las especies más sensibles (Bové *et al.*, 1988).

Posteriormente a la purificación del virus, el método de diagnóstico más utilizado es la detección serológica de CTV mediante técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos policlonales o monoclonales (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 1991; Garnsey *et al.*, 1993; Gonsalves *et*

*al.*, 1978; Nikolaeva *et al.*, 1998; Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1986). La utilización de ELISA con la mezcla de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 ha permitido la detección de todos los aislados con los que ha sido ensayada (Cambra *et al.*, 1990). Un protocolo simplificado, denominado ELISA-IP consiste en la utilización de improntas de brotes o pecíolos de hojas en membranas de nitrocelulosa, que mantienen el antígeno inmovilizado para hacer un ensayo ELISA directo o indirecto (Garnsey *et al.*, 1993). Este procedimiento evita la preparación de extractos vegetales y permite realizar las improntas directamente en el campo, es más rápido y barato que ELISA convencional en microplacas y tiene una sensibilidad ligeramente superior. Además, las membranas pueden ser almacenadas durante años y ser enviadas para su procesamiento en un laboratorio lejano, por lo que es particularmente adecuado para el análisis masivo de muestras.

Finalmente, tras la obtención de la secuencia nucleotídica completa del gRNA de varios aislados de CTV se han desarrollado una variedad de métodos de diagnóstico basados en la detección específica del RNA viral, mediante hibridación molecular con sondas de cDNA y cRNA (Barbarossa y Savino, 2006; Narváez *et al.*, 2000; Rosner y Bar-Joseph, 1984) o mediante retrotranscripción y amplificación (RT-PCR) de secuencias virales (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Algunos protocolos muy sensibles utilizan anticuerpos para “capturar” partículas del virus en el mismo tubo donde posteriormente se realiza la reacción de amplificación (IC-RT-PCR), mientras que otros evitan la preparación de extractos utilizando improntas en papel como fuente de RNA, o incrementan su sensibilidad incluyendo una segunda ronda de amplificación (nested-PCR) (Cambra *et al.*, 2002). Estos métodos son apropiados en casos particulares como la detección de ácidos nucleicos virales en pulgones.

Los aislados de CTV difieren en características biológicas tales como la intensidad de los síntomas inducidos en los árboles de campo (Da Graça *et al.*, 1984; Roistacher y Moreno, 1991) o en plantas indicadoras (Ballester-Olmos *et al.*, 1988, 1993), en su transmisibilidad por pulgones (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher y Bar-Joseph, 1987; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984, 1988a) o en la capacidad para interferir la multiplicación de otras

cepas de distinta virulencia (Costa y Müller, 1980; van Vuuren *et al.*, 1993). De hecho, la presencia en aislados de tristeza de varios componentes asociados con los diferentes tipos de síntomas (McClellan, 1963) fue una hipótesis de trabajo hasta que se demostró que CTV era el único causante de esos síntomas (Garnsey *et al.*, 1977; Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001). Las bases genéticas subyacentes a esta variabilidad biológica son aún desconocidas, si bien hay evidencias sobre la presencia en los aislados de CTV de diferentes “variantes” que podían separarse en los procesos de cambio de huésped o transmisión por pulgón (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a; Grant y Higgins, 1957; Raccah *et al.*, 1980), anteriores al concepto de que los virus de RNA son poblaciones de variantes de secuencia (Domingo y Holland, 1994).

La comparación de los síntomas inducidos en diferentes plantas indicadoras (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Garnsey *et al.*, 1991, Hilf *et al.*, 2005) es aún el único método fiable de caracterización patogénica de los aislados de CTV. Sin embargo, tras la purificación y caracterización molecular de varios aislados de CTV se han desarrollado algunos procedimientos rápidos para caracterizar la variabilidad de CTV, identificar grupos específicos de aislados o intentar asociar las características patogénicas con diferentes marcadores moleculares (Moreno y Guerri, 1997). Algunos de estos métodos detectan diferencias en la proteína CP de la cápsida usando anticuerpos monoclonales y policlonales (Nikolaeva *et al.*, 1998; Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1986) o mediante análisis de los mapas de péptidos generados mediante digestión con endoproteasas (Albiach-Martí *et al.*, 2000c). El anticuerpo monoclonal más utilizado para discriminar aislados es el MCA13 (Permar *et al.*, 1990), que reconoce un epítipo ampliamente conservado en los aislados agresivos y ausente en los aislados no agresivos (Pappu *et al.*, 1993). Otros procedimientos para discriminar entre aislados de CTV incluyen: i) diferencias en el perfil de dsRNA entre aislados (Dodds *et al.*, 1987; Guerri *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1990, 1993a, b), que detecta las formas replicativas de los dRNAs presentes en estos aislados, ii) el perfil de hibridación con sondas de cDNA o cRNA de diferentes regiones del gRNA (Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Narváez *et al.*,

2000; Rosner y Bar-Joseph, 1984; Rosner *et al.*, 1986), iii) análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos con distintas endonucleasas (Gillings *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2003), iv) perfiles de amplificación mediante RT-PCR con parejas de cebadores específicos para varios genotipos de CTV (Hilf *et al.*, 1999, 2005; Ayllón *et al.*, 2001; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2003), y v) análisis del polimorfismo de conformación del DNA monocatenario (SSCP) (Ayllón *et al.*, 1999b; d'Urso *et al.*, 2000, 2003; Rubio *et al.*, 1996; Sambade *et al.*, 2002, 2007). Esta última técnica ha sido utilizada para caracterizar la estructura poblacional de aislados de CTV y seleccionar variantes de secuencia específicas para su secuenciación (Ayllón *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2003).

### **3.4. Variabilidad genética**

Al comienzo de esta tesis doctoral se había determinado la secuencia nucleotídica del gRNA mayoritario de siete aislados con orígenes geográficos y características patogénicas diferentes: T36 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995) y T30 (Albiach-Marti *et al.*, 2000a) de Florida, VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 (Vives *et al.*, 1999) de España, SY568 (Yang *et al.*, 1999; Vives *et al.*, 2005) de California, NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001) y Qaha de Egipto (GenBank accession number AY340974), más secuencias parciales de otros aislados. Los aislados T385 y T30 son esencialmente asintomáticos, T36 causa los síndromes DL y SY, VT induce DL, SY y de forma ocasional SP suave en pomelo, SY568 y NUagA causan síntomas intensos en lima Mexicana y otros huéspedes, DL y SY, pero mientras se conoce que SY568 induce SP pronunciado en naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osb) y pomelo, no se ha descrito el efecto de NUagA en estos huéspedes (Suastika *et al.*, 2001). Los síntomas que induce el aislado Qaha tampoco han sido descritos. Todos ellos presentan la misma organización genómica, sin embargo, los aislados que difieren biológicamente tienen también diferencias de secuencia variables a lo largo

de su gRNA (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999, 2005).

El análisis filogenético de las siete secuencias completas mostraron tres grupos principales que incluían: i) los aislados virulentos inductores de SP en naranjo dulce o pomelo, SY568R, NUagA y VT, ii) los aislados asintomáticos T30 y T385, y iii) los aislados T36 y Qaha. Las identidades nucleotídicas dentro de cada grupo fueron superiores al 97.5%, mientras que la identidad más baja se daba entre los aislados VT y Qaha (75.6%).

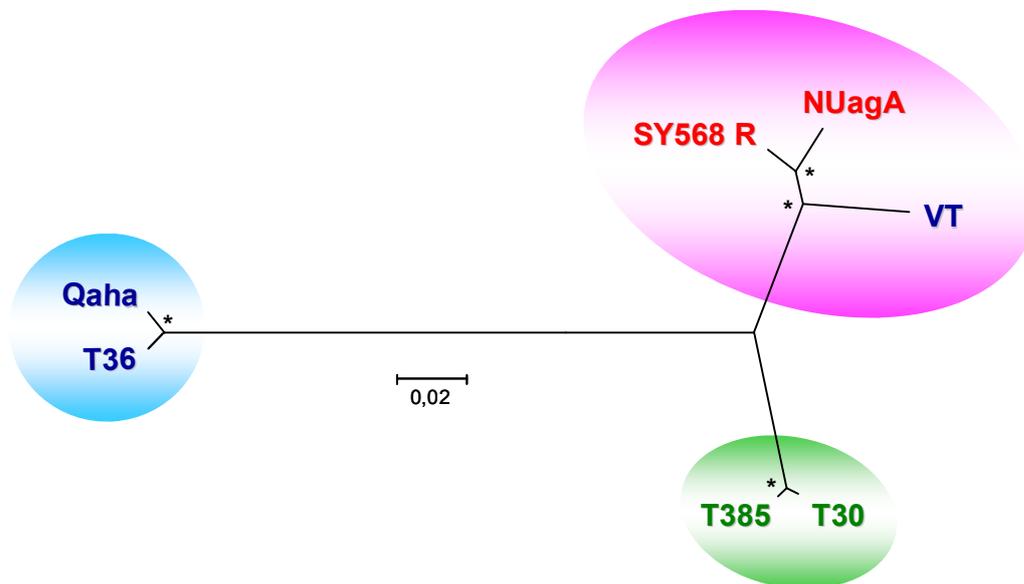


Figura 13. Árbol filogenético consenso obtenido con el método de Neighbor-Joining y 1000 réplicas de *bootstrap* a partir de las siete secuencias completas de CTV disponibles en la base de datos al comenzar este trabajo de tesis. (\*) Nodo detectado en el 90-100% de las réplicas.

Las secuencias de los aislados T36 y Qaha son prácticamente idénticas como también lo son T30 y T385 a pesar de que han estado separados al menos 24 años en huéspedes y ambientes distintos. Fragmentos de secuencia idéntica a la de estos aislados han sido también detectados en otros aislados de zonas geográficas distintas como los aislados B252 de Taiwán, B272 de Colombia y B354 de California (Albiach-Martí *et al.*, 2000a), lo que sugiere que podría tratarse de un genotipo bien adaptado que habría sido seleccionado en el proceso evolutivo de CTV. En

cambio, SY568 parece ser el resultado de un fenómeno de recombinación entre un antepasado de SY568 y otro tipo T385/T30 (Vives *et al.*, 1999, 2005).

La variación genética está irregularmente distribuida a lo largo del gRNA de CTV, siendo la región más conservada el extremo 3' UTR, con una identidad entre aislados superior al 95% y la más variable el extremo 5' UTR, con valores de identidad en ocasiones inferiores al 50%. Sin embargo, todas las secuencias del 5' UTR obtenidas pudieron ser clasificadas en tres grupos (I, II y III), con una identidad de secuencia intra-grupo superior al 88% y con identidades inter-grupo del 55-57% entre los grupos I y II, 62-64% entre los grupos II y III, y 44-45% entre los grupos I y III. A pesar de esta variabilidad, la estructura secundaria de mínima energía predicha para los tres tipos de secuencia es muy similar y consiste en dos horquillas separadas por una pequeña región espaciadora, en las que los cambios se acumulan en los bucles o mediante mutaciones compensatorias en los tallos de doble cadena (López *et al.*, 1998) (Ver Figura 7). La conservación de esta estructura secundaria sugiere algún papel importante de la misma en el ciclo biológico de CTV, como se ha puesto de manifiesto experimentalmente (Gowda *et al.*, 2003b). Las secuencias 5' UTR más frecuentes son las de tipo III, que han sido detectadas en casi todos los aislados de CTV analizados, pero mientras que los aislados poco agresivos generalmente contienen sólo este tipo de secuencia, los más virulentos contienen además secuencias de los grupos I, II, o ambos (López *et al.*, 1998; Ayllón *et al.*, 2001). Construcciones quiméricas realizadas sobre el minireplicón  $\Delta$ cIa de T36, en las que se intercambiaron las regiones 5' UTR o 3' UTR por sus homólogas de otros aislados, mostraron una reducción significativa en su nivel de replicación (Satyanarayana *et al.*, 1999).

También 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 gRNA. Por ejemplo, la diversidad genética de un grupo de aislados de California y España fue de 0.038 para el gen de la CP, pero de 0.137 para una región de la ORF 1a (Rubio *et al.*, 2001). Comparaciones de secuencia

entre aislados de CTV con orígenes geográficos y características patogénicas diferentes mostraron: i) un alto grado de conservación entre genomas de CTV separados en el tiempo y espacio, con un repertorio limitado de genotipos (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Vives *et al.*, 1999) y ii) una estructura poblacional variable entre aislados, con algunos de ellos compuestos por una variante de secuencia mayoritaria y otras variantes estrechamente relacionadas, y otros que presentan una estructura compleja con variantes de secuencia altamente divergentes (Ayllón *et al.*, 2006; Vives *et al.*, 2005).

Los factores que influyen en la variabilidad y estructura de las poblaciones de CTV en campo incluyen la mutación, eventos de recombinación entre variantes de secuencia divergentes, selección, deriva genética y flujo génico debido a las repetidas inoculaciones de los árboles de campo y movimiento de yemas infectadas entre regiones.

La mutación es el proceso por el cual nucleótidos que no estaban presentes en la secuencia molde son incorporados en la cadena hija durante la replicación. Los virus como CTV con un genoma de RNA pueden evolucionar rápidamente debido a que las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRps) presentan una alta tasa de error a consecuencia de la ausencia de las funciones correctoras y reparadoras (Domingo y Holland, 1997). La variación de CTV se evaluó a partir de un aislado de CTV clonal obtenido a partir del único clon infeccioso de cDNA del aislado T36 (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001) que se propagó consecutivamente en plantas de cuatro especies de cítricos diferentes. Los análisis de las poblaciones resultantes mostraron una estabilidad genética elevada en algunos huéspedes, como se ha observado en otros virus de plantas (García-Arenal *et al.*, 2001), pero una rápida diversificación en otros huéspedes, sugiriendo que este segundo tipo de huéspedes podría haber contribuido a la diversificación de CTV una vez que el virus se movió de sus áreas de origen y tuvo contacto con la nuevas especies huésped (Moya *et al.*, datos no publicados).

La recombinación es el proceso mediante el cual se intercambian segmentos de información genética entre las cadenas nucleotídicas de

diferentes variantes genéticas durante el proceso de replicación. La recombinación homóloga y no-homóloga podría ser una forma rápida de evolución de CTV. La recombinación no homóloga ha sido ampliamente documentada en la generación de múltiples dRNAs (Ayllón *et al.*, 1999a; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995a, b; Yang *et al.*, 1997). La recombinación homóloga se observó por primera vez comparando las secuencias del gRNA de los aislados T36 o SY568 con la de otros aislados (Mawassi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1999, 2005) y después se ha confirmado mediante comparaciones de secuencia adicionales.

Los valores de diversidad nucleotídica estimados entre aislados de CTV en algunas regiones codificantes fueron superiores a 0.13, si bien la mayoría de las sustituciones eran transiciones que generalmente afectaban a la tercera posición del codón. De hecho la relación entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) estimada para todas las regiones del gRNA analizadas estuvo por debajo de 1 (Rubio *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, datos no publicados) y dentro del intervalo de valores calculados para otros virus de plantas (García-Arenal *et al.*, 2001). Además, se han observado otras diferencias de secuencia compatibles con la deriva genética, probablemente asociadas con un tamaño eficaz reducido de las poblaciones virales causado por los cuellos de botella que suponen la transmisión por pulgones o el cambio de huésped (Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Ayllón *et al.*, 2006; Sentandreu *et al.*, 2006). Estos cambios a veces van acompañados de diferentes comportamientos patogénicos de los aislados (Albiach-Martí *et al.*, 2000b; Brlansky *et al.*, 2003; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a).

Finalmente, las poblaciones de CTV también se ven afectadas por la dispersión natural y cultural del virus. Los cítricos pueden vivir largos períodos de tiempo en el campo y esto permite que a lo largo de su vida puedan sufrir repetidas inoculaciones por pulgones portadores de variantes de secuencia divergentes de CTV, lo que puede dar lugar a poblaciones virales complejas incrementándose la diversidad genética dentro del aislado (Ayllón *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001).

La distribución desigual de variantes de secuencia dentro de las plantas infectadas y/o la selección al azar de algunas de ellas durante la

adquisición o transmisión por pulgones pueden ser factores adicionales que contribuyen a cambios en la población de CTV en campo (d'Urso *et al.*, 2000, 2003; Sambade *et al.*, 2007). La presencia de variantes de secuencia divergentes en un aislado de CTV también incrementa la posibilidad de variación genética por recombinación (Vives *et al.*, 2005). Por otro lado, el movimiento de yemas infectadas con CTV, tiende a reducir la diversidad genética entre regiones, creando una única población de CTV, como se ha observado para las poblaciones de CTV de California y España (Rubio *et al.*, 2001).

En resumen, aunque CTV parece genéticamente estable en algunos huéspedes, el movimiento incontrolado de germoplasma y las interacciones con diferentes combinaciones de variedad/patrón bajo diferentes condiciones medioambientales dirigidas por el hombre podrían haber generado variabilidad genética, modulada después por otros factores como la recombinación, selección, deriva genética o flujo génico entre regiones.

### **3.5. Transmisión**

La dispersión de CTV a nuevas zonas ocurre fundamentalmente por la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión secundaria dentro de las plantaciones la efectúan diversas especies de pulgones. El virus puede transmitirse experimentalmente por medio de algunas especies de cuscuta (Weathers y Harjung, 1964) o por inoculación mecánica mediante cortes repetidos en el floema con una cuchilla mojada en savia de planta infectada (Garnsey *et al.*, 1977; Garnsey y Müller, 1988), pero la eficiencia de transmisión por estos procedimientos es baja y carecen de importancia epidemiológica. No se ha podido demostrar la transmisión de CTV por semilla (McClean, 1957).

La transmisión por pulgones ocurre de forma semi-persistente y con distinta eficiencia dependiendo de la especie de pulgón transmisora, de los aislados del virus 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, 1988b; Roistacher y Bar-Joseph,

1987; Yokomi y Garnsey, 1987; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a). 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), seguido por *A. gossypii* (Norman *et al.*, 1968; Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher *et al.*, 1984; Raccah y Singer, 1987; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a, b; Yokomi *et al.*, 1989) y en menor medida por *A. spiraecola* (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a). El primero, que tiene una eficiencia de transmisión unas veinte veces superior al segundo, se localiza principalmente en Asia, América del Sur y parte de América Central en islas del Caribe, Florida (EEUU) y África Central y del Sur. En cambio *A. gossypii* es el principal vector de CTV en Norteamérica y el Mediterráneo. En los últimos años se ha localizado *T. citricida* en algunas regiones del norte de España y Portugal (Ilharco *et al.*, 2005), lo que supone una amenaza importante para la citricultura de la cuenca del Mediterráneo, donde el patrón naranjo amargo sigue siendo predominante y la incidencia de CTV sigue siendo generalmente baja.

### **3.6. Control de la enfermedad**

Las posibilidades de controlar los daños causados por CTV incluyen un amplio abanico de medidas, fundamentalmente de tipo preventivo, que varían según la incidencia de CTV, los aislados del virus y las variedades de cítricos predominantes de cada zona específica (Garnsey *et al.*, 1998). Las medidas preventivas tienden a evitar la infección o a reducir la difusión del patógeno. Entre éstas están el control sanitario del material vegetal propagativo mediante programas de saneamiento, cuarentena y certificación, la erradicación de plantas infectadas o el control de los vectores.

En países o áreas cítricas donde CTV no se ha establecido, lo más recomendable es la puesta en marcha de programas de cuarentena y certificación del material propagativo. Estos deberían completarse con un programa de saneamiento de variedades, en caso que se desee propagar cultivares locales de los que no haya material con garantía sanitaria en bancos de germoplasma internacionales (Navarro *et al.*, 2002).

Cuando el virus se ha introducido en una zona citrícola en la que el patrón predominante es el naranjo amargo, pero su incidencia es aún muy baja, se puede establecer un programa de erradicación de árboles infectados que retrase el avance o erradique la enfermedad. Programas de este tipo se han aplicado en el Valle Central de California (Dodds y Lee, 1991), Israel (Bar-Joseph *et al.*, 1974) y Chipre (Kyriakou *et al.*, 1996). Cuando la erradicación no es posible debido a la eficiente dispersión de CTV por vectores, la única forma de evitar el decaimiento es la utilización de patrones tolerantes al decaimiento como *P. trifoliata* y sus híbridos los citranges Troyer y Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) o el citrumelo, el mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.), los limoneros rugoso (*C. jambhiri* Lush) o volkameriana (*C. volkameriana* Ten. y Pasq.) o la lima Rangpur (*C. limonia* Osb.). Esta solución es suficiente en algunas áreas citricolas donde predominan aislados poco agresivos, ya que en presencia de éstos, los naranjos dulces, mandarinos y pomelos injertados sobre patrones tolerantes permanecen asintomáticos. Sin embargo, en áreas citricolas donde predominan aislados más virulentos, estas mismas especies, en particular, los pomelos y los naranjos dulces muestran enanismo, SP, baja producción y fruta pequeña, injertados sobre cualquier patrón (Roistacher *et al.*, 1988; Koizumi, 1991; Broadbent *et al.*, 1991). Para evitar los daños producidos por CTV en estas condiciones se requieren dos medidas adicionales: evitar la propagación en vivero de los aislados más agresivos e implementar un programa de protección cruzada mediante preinoculación de la planta con un aislado no agresivo del mismo virus que impida la acumulación de los aislados virulentos (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987). La utilización de esta técnica es totalmente empírica, ya que se desconocen sus fundamentos moleculares, y requiere largos ensayos para seleccionar aislados no agresivos con capacidad protectora. Además, su aplicación en campo conlleva el riesgo de evolución del aislado protector hacia formas más agresivas al ser propagado en variedades o condiciones de cultivo diferentes (Fulton, 1986), por lo que sólo debe emplearse en lugares donde la tristeza sea endémica y los aislados sean muy agresivos. En Brasil se ha aplicado con éxito para proteger el naranjo

dulce Pera (Costa y Müller, 1980) y en Sudáfrica para proteger el pomelo Marsh (Van Vuuren *et al.*, 1993), mientras que en otros lugares ha fracasado o ha proporcionado sólo una protección temporal (Thornton y Stubbs, 1976; Wallace y Drake, 1976; Bar-Joseph, 1978; Powell *et al.*, 1992). Últimamente, se ha propuesto como mecanismo de la protección cruzada el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), un proceso inducido por dsRNA que forma parte del sistema natural de defensa de las plantas frente a virus y degrada de forma específica los RNAs virales (Covey *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 1997, 1999). Sin embargo, la observación de que aislados no agresivos frecuentemente no protegen frente a los virulentos o lo hacen sólo de forma temporal (Roistacher y Dodds, 1993; Sambade *et al.*, 2002, 2007), sugiere que CTV es capaz de superar el PTGS o que otros factores pueden ser importantes para una protección cruzada duradera.

Una de las formas más eficaces de control de los virus de plantas es la utilización de genes de resistencia. Aunque se han identificado en algunas especies de cítricos genes de resistencia a CTV (Mestre *et al.*, 1997a, b, c; Fang y Roose, 1999; Yang *et al.*, 2001, 2003; Rai, 2006), la incorporación de éstos en variedades comerciales mediante cruzamientos convencionales no ha sido posible debido a la compleja biología reproductiva de los cítricos, su elevada heterocigosis, los largos períodos juveniles de las plantas de semilla y el gran tamaño que tienen en su fase adulta, entre otros factores. Una metodología alternativa sería la resistencia derivada del patógeno (PDR) que se obtiene en plantas transformadas con distintos fragmentos del genoma del virus a controlar (Beachy *et al.*, 1990; Braun y Hemenway, 1992; Lindbo y Dougherty, 1992). La obtención de plantas transgénicas con resistencia mediada por genes de CTV era una posibilidad prometedora tras los avances en las técnicas de transformación de cítricos (Peña *et al.*, 1995a, b, Peña y Séguin, 2001). Sin embargo, en los ensayos de transformación con el gen de la CP (Domínguez *et al.*, 2002), con el gen *p23* (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005), o con una construcción en horquilla que incluía la región 3' UTR y parte del gen *p23* en ambos sentidos, separadas por un intrón (Batuman *et al.*, 2006; Fagoaga comunicación personal), las líneas

transgénicas obtenidas: i) eran totalmente susceptibles, ii) presentaban un retraso en la infección por CTV y en la expresión de síntomas, o iii) presentaban una pauta de resistencia en la que un 20-30% de las propagaciones eran inmunes a la infección, mientras que las demás eran totalmente susceptibles. Estos resultados indican que, aunque la PDR con CTV en su huésped natural es posible, hay factores desconocidos, no relacionados con el fondo genético, que pueden afectar el fenotipo de resistencia de las distintas propagaciones (Moreno *et al.*, 2008).

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) es el agente causal de una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo y ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo, de ellos unos 50 millones en España, y un importante debilitamiento y baja productividad de varios millones más (Bar-Joseph *et al.*, 1989b; Roistacher y Moreno, 1991; Moreno *et al.*, 2008). Aunque algunos aislados de CTV son esencialmente asintomáticos (Bové *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1993a, b) la mayoría de ellos puede causar uno o más de los siguientes síndromes: i) decaimiento de plantas injertadas sobre naranjo amargo (tristeza), ii) enanismo y acanaladuras en la madera de algunas variedades (“stem pitting”, SP) y iii) enanismo y amarilleo de plantas francas de limonero, pomelo o naranjo amargo (“seedling yellows”, SY). El síndrome de tristeza puede evitarse utilizando como patrones especies tolerantes al decaimiento y el de SY no aparece normalmente en campo, mientras que las pérdidas de producción y calidad ocasionadas por el de SP sólo pueden paliarse evitando su propagación en vivero y en ocasiones utilizando la protección cruzada con aislados no agresivos del virus (Moreno *et al.*, 2008).

Al comienzo de esta tesis se disponía de la secuencia completa de 7 aislados de CTV. En un análisis filogenético estas secuencias se asociaban en tres grupos bien diferenciados: uno que incluye a los aislados más agresivos (SY568R de California, NUagA de Japón y VT de Israel), otro que incluye aislados esencialmente asintomáticos (T30 de Florida y T385 de España) y un tercero formado por aislados de virulencia intermedia (T36 de Florida y Qaha de Egipto) (Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, los determinantes genéticos responsables de cada uno de los síndromes producidos por CTV son aún desconocidos y el número de secuencias completas de CTV disponibles para hacer comparaciones entre aislados con distinto fenotipo sigue siendo muy limitado. Por otra parte, al igual que en otros virus con genoma de RNA, los aislados de CTV están compuestos por una población de variantes de secuencia, a veces muy divergentes, que complica la asociación de los síntomas con variantes específicas de secuencia (Rubio *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2006). Más aún, la frecuencia de

determinadas variantes de secuencia en la población viral podría determinar en parte la intensidad de los síntomas observados.

El control de los daños causados por aislados virulentos de CTV requiere disponer de métodos rápidos, sensibles y fiables para identificar los aislados potencialmente peligrosos, lo que a su vez exige: i) identificar los genes de CTV implicados en la inducción de los distintos síntomas, y ii) disponer de un método para identificar y cuantificar las variantes de secuencia responsables del síndrome SP. Para determinar los motivos de secuencia responsables de los síntomas es necesario disponer de un sistema genético adecuado basado en clones de cDNA infecciosos. Al comienzo de este trabajo, el único sistema genético disponible para CTV estaba basado en un clon de cDNA del aislado T36 de Florida (Satyanarayana *et al.*, 1999), a partir del cual se obtenían transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. Los viriones generados en éstos eran amplificados mediante sucesivos pases a nuevos lotes de protoplastos para después ser mecánicamente inoculados en cítricos, en los que reproducía los síntomas característicos del aislado original: decaimiento y SY (Satyanarayana *et al.*, 2001). Este procedimiento es largo y tedioso y da lugar a muchos experimentos inconclusos por la contaminación de los cultivos de protoplastos. Por otra parte, para identificar los genes de CTV implicados en la inducción del síndrome SP de naranjo dulce y pomelo resultaba conveniente disponer de un clon infeccioso de un aislado productor de estos síntomas, que por razones de cuarentena debía ser de origen español, por lo que el desarrollo del nuevo sistema genético requería disponer de la secuencia completa de un aislado agresivo local caracterizado biológica y molecularmente. A su vez, para la selección de los clones de cDNA con replicación más eficiente se hacía preciso desarrollar un sistema de RT-PCR a tiempo real que permitiese cuantificar el RNA genómico acumulado en la replicación.

Finalmente, para la identificación de aislados potencialmente peligrosos en campo era necesario desarrollar un método capaz de detectar y cuantificar variantes de secuencia de tipo virulento, aún cuando fuesen una fracción menor de la población viral. Aunque se han utilizado diversos

marcadores del genoma de CTV asociados con la patogenicidad de los aislados (Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2003; Pappu *et al.*, 1993; Hilf *et al.*, 2005), los métodos utilizados tenían una sensibilidad limitada, se ensayaron con pocos aislados o la asociación presentaba bastantes excepciones (Sieburth *et al.*, 2005), y ninguno de ellos proporcionaba una información fiable de la acumulación relativa de las variantes de secuencia que componen las poblaciones virales. A este respecto, las nuevas técnicas basadas en RT-PCR a tiempo real ofrecían nuevas posibilidades para la detección y cuantificación de virus por su sensibilidad y especificidad (Bustin, 2002; Mackay *et al.*, 2002).

En consecuencia, los objetivos establecidos para esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- 1) Caracterización biológica y molecular de un aislado de CTV de origen español inductor de acanaladuras en la madera.
- 2) Puesta a punto de un sistema general de detección y cuantificación del RNA genómico de CTV mediante RT-PCR a tiempo real usando SYBR® Green I.
- 3) Puesta a punto de un sistema de detección específica de variantes de secuencia de CTV mediante RT-PCR a tiempo real usando sondas TaqMan tipo LNA.
- 4) Desarrollo de un sistema genético eficiente basado en la agroinfiltración de tejidos de *N. benthamiana* con clones de cDNA de un aislado agresivo de origen español inductor de acanaladuras en la madera.



## **CAPÍTULO 1**

# **CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN AISLADO AGRESIVO DE CTV INDUCTOR DE ACANALADURAS EN LA MADERA**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado en la Introducción general, los aislados de CTV pueden inducir tres síndromes diferentes: i) el síndrome de tristeza o decaimiento de plantas injertadas sobre patrón naranjo amargo (DL), ii) el de enanismo y acanaladuras en la madera de distintas variedades (“stem pitting”, SP) propagadas sobre cualquier patrón, y iii) el de enanismo y amarilleo de plantas francas de limonero, pomelo o naranjo amargo, conocido como “seedling yellows” (SY), que rara vez se observa en campo. Los motivos de secuencia responsables de cada uno de estos síndromes son aún desconocidos, lo que supone una limitación importante en el desarrollo de métodos apropiados para evitar los daños de CTV, basados en la detección y erradicación de los aislados más virulentos o en el control de estos aislados mediante técnicas de protección cruzada.

Para delimitar los distintos determinantes de patogenicidad de CTV se hace preciso disponer de un sistema genético eficiente, basado en la manipulación de un clon infeccioso de cDNA del genoma viral (ver Introducción general y Capítulo 4 de esta tesis), y de la secuencia completa de múltiples aislados de CTV con características patogénicas diferentes.

Al comienzo de este trabajo se conocía la secuencia completa del gRNA mayoritario de los siguientes aislados de CTV: T36 y T30 de Florida (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Karasev *et al.*, 1995; Pappu *et al.*, 1994), VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 de España (Vives *et al.*, 1999), SY568 de California (Yang *et al.*, 1999; Vives *et al.*, 2005), NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001) y Qaha de Egipto (GenBank accession number AY340974). Los aislados T385 y T30 son asintomáticos y sólo ocasionalmente inducen clorosis nervial (“vein clearing” VC) suave en lima Mexicana; T36 causa DL y SY, VT induce DL, SY y de forma ocasional un SP suave en pomelo; SY568 y NUagA causan síntomas severos en lima Mexicana y SY, pero mientras SY568 induce SP intenso en naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osb) y pomelo, el efecto de NUagA en estos huéspedes es desconocido (Suastika *et al.*, 2001 y T. Kano, comunicación personal); los síntomas que

induce el aislado Qaha no han sido descritos. Las secuencias de los aislados T36 y Qaha son prácticamente idénticas como también lo son la de T30 y T385, a pesar de que han estado separados al menos 24 años en huéspedes y ambientes distintos. La secuencia del aislado SY568 parece ser el resultado de la recombinación entre una secuencia del tipo T385/T30 y otro genotipo no relacionado (Vives *et al.*, 1999; Vives *et al.*, 2005). Análisis posteriores de la población viral de SY568 mostraron que tenía dos variantes de secuencia, una de ellas estrechamente relacionada con la de aislados poco agresivos (asintomáticos o inductores sólo de DL) y la otra relacionada con las de los aislados más agresivos (causantes de DL, SY y SP en pomelo o naranjo dulce), más distintas recombinaciones de ambas (Vives *et al.*, 2005). El ensamblaje "*in silico*" del segundo tipo de variantes dio como resultado una secuencia completa del gRNA, nombrada a partir de aquí como SY568R (de restaurada), que resultó estar estrechamente relacionada con el aislado NUagA y muy distante filogenéticamente de los aislados no agresivos (ver Figura 13 de la Introducción general).

Considerando el limitado número de secuencias de CTV disponibles, y en particular la carencia de secuencias de aislados agresivos bien caracterizados biológicamente, se decidió obtener la secuencia completa de un aislado de CTV inductor de SP de la colección del IVIA. La disponibilidad de secuencias adicionales de aislados inductores de SP era necesaria para: i) comparar con las secuencias de aislados no agresivos e identificar marcadores moleculares potenciales para detectar las variantes inductoras de SP en campo, y ii) construir y manipular un clon infeccioso de cDNA (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001) para identificar las regiones genómicas responsables del SP en naranjo dulce o pomelo.

Un factor que podía complicar la obtención de una secuencia representativa de un aislado agresivo era la estructura poblacional del aislado seleccionado. Mientras que algunos aislados contienen una variante de secuencia mayoritaria y otras genéticamente muy relacionadas, otros contienen dos o más variantes muy divergentes entre sí (Ayllón *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005). Este fenómeno parece más frecuente en los aislados agresivos (Sambade *et al.*, 2000, 2003) y en el pasado ha

resultado un problema para la obtención de una secuencia representativa de este tipo de aislados (Yang *et al.*, 1999; Targon *et al.*, 2000; Vives *et al.*, 2005).

Por ello, para cubrir este objetivo, en el presente capítulo llevamos a cabo la caracterización biológica y molecular de un aislado de CTV de origen español inductor de SP y procedimos a la secuenciación de su RNA genómico.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Selección de un aislado agresivo de origen español

Para seleccionar el aislado candidato a ser secuenciado, se examinó la estructura poblacional de dos aislados inductores de SP de origen español, T305 y T318 (Moreno *et al.*, 1993b) y de un grupo de siete subaislados de T318 obtenidos mediante transmisión por pulgón (genéricamente denominados T318A), que forman parte de la colección de aislados del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y se mantienen en plantas de naranjo dulce injertadas sobre patrones de citrange Carrizo en un recinto de malla antipulgón. Los aislados T305 y T318 se habían obtenido a partir del aislado español asintomático T385 mediante transmisiones sucesivas a diferentes huéspedes (Figura 1), que dieron lugar a cambios en sus características patogénicas y perfil de dsRNA (Moreno *et al.*, 1991, 1993a, b) y en la estructura de sus poblaciones (Ayllón *et al.*, 2006). A su vez, un examen preliminar mediante análisis de SSCP de los genes *p18* y *p20* sugería que la población viral de los subaislados T318A difería de la del aislado T318 (Sambade *et al.*, 2007). En bioensayos en plantas indicadoras en invernadero, T305 y T318 inducían síntomas intensos en lima Mexicana, SY en naranjo amargo y pomelo, y SP en pomelo Duncan y naranjo dulce Pineapple, y los subaislados T318A habían inducido SP en naranjo dulce Pineapple.

El examen de la estructura poblacional de los aislados candidatos se efectuó comparando los perfiles de SSCP obtenidos de cDNA de cuatro

regiones génicas diferentes. Para ello, preparaciones ricas en dsRNA, obtenidas mediante cromatografía en columna de celulosa no iónica tipo CF-11 (Moreno *et al.*, 1990), y las parejas de cebadores PM62D-PM63R, PM66D-PM67R, PM64D-PM65R y PM85D-PM86R, diseñadas en regiones conservadas de los genes *p33*, *p61*, *p65* y *p23*, respectivamente, se utilizaron para sintetizar cDNAs específicos de dichas regiones génicas mediante retrotranscripción y posterior amplificación por PCR (RT-PCR), siguiendo los protocolos habituales del laboratorio (Sambade *et al.*, 2003; Vives *et al.*, 2005). Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante SSCP en las condiciones previamente descritas (Rubio *et al.*, 1996). La presencia de sólo dos bandas en los perfiles de SSCP, indicativa de una variante de secuencia muy predominante, fue utilizada para la selección del aislado a secuenciar.

### **1.2.2. Clonación y secuenciación de un aislado agresivo español inductor de SP**

Con objeto de facilitar posteriormente el ensamblaje de un clon de cDNA del genoma completo, la secuenciación del aislado seleccionado se efectuó diseñando cebadores apropiados para obtener cuatro clones solapantes de cDNA que cubriesen la totalidad del RNA genómico.

#### **1.2.2.1. Diseño de cebadores**

Para amplificar la variante de secuencia predominante en el aislado seleccionado se obtuvieron datos preliminares de esta secuencia en dos regiones localizadas en las posiciones 2021-2548 y 11028-11455 del gRNA. Estas regiones se amplificaron mediante RT-PCR utilizando extractos ricos en dsRNA y los cebadores generales PM82D-PM73R y PM62D-PM63R (Tabla 1) en las condiciones descritas (Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005). El cDNA de la región comprendida entre las posiciones 2021-2548 se clonó en el vector pGEM-T-Easy (Promega) y los perfiles de SSCP de 45 clones se compararon con el del producto de RT-PCR con el fin de elegir y

secuenciar en ambos sentidos la variante de secuencia mayoritaria (Rubio *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 2005). Basándose en esta secuencia se diseñaron los cebadores PM141D-PM140R (Tabla 1), específicos del aislado T318A. La región comprendida entre las posiciones 11028-11455 se amplificó mediante RT-PCR a partir de dsRNA de dos plantas diferentes infectadas con el aislado T318A. Los productos de PCR de ambas plantas fueron secuenciados directamente y resultaron ser idénticos, coincidiendo su secuencia con la de otros aislados inductores de SP como SY568R. Basándose en el alineamiento de las dos secuencias obtenidas y todas las disponibles en la base de datos para esta región se diseñaron los cebadores PM133D, PM134D y PM138R (Tabla 1 y Figura 2), específicos para T318A.

Por último, se diseñó la pareja de cebadores PM144D-PM142R (posiciones 7227-7823 en el gRNA de T318A) en la ORF 1a, basándose en zonas conservadas en todos los aislados de CTV de los que hay secuencias de esta región disponibles en las bases de datos.

#### **1.2.2.2. Obtención de fragmentos solapantes de cDNA de gran tamaño**

Con objeto de obtener clones de cDNA mediante RT-PCR larga se optimizaron diversos factores en la RT y en la PCR, incluyendo i) la longitud, composición y temperatura de fusión de los cebadores, ii) el tipo de desnaturalización del dsRNA (térmica o química con hidróxido de metil mercurio) y el tipo de retrotranscriptasa utilizada en la RT (SuperScript II, Thermoscript<sup>TM</sup> o SuperScript III de Invitrogen), y iii) la DNA polimerasa, el programa de ciclos térmicos y la utilización de un cebador diferente al de la RT en la PCR.

Una vez optimizadas las condiciones, se sintetizaron tres cDNAs diferentes (RT1, RT2 y RT3). El cDNA RT1 (Figura 2) se sintetizó con la retrotranscriptasa Superscript II (SS-II) a 42°C, utilizando el cebador PM1 que contiene (dT)<sub>17</sub> en su extremo 3' y dsRNA desnaturalizado con hidróxido de metil mercurio y poliadenilado con la poly (A) polimerasa de levadura (US Biochemical) (López *et al.*, 1998). La síntesis de los cDNAs RT2 y RT3 se efectuó con los cebadores PM141D y PM133D utilizando la

retrotranscriptasa Thermoscript™ (TS) a 60°C y dsRNA desnaturalizado como en el caso anterior.

A partir de los tres cDNAs se sintetizaron mediante PCR cuatro fragmentos de DNA de gran tamaño (A, B, C y D) que cubrían el gRNA completo (Figura 2). La amplificación se llevó a cabo utilizando alícuotas de 0,5-1 µl de cada uno de los cDNAs y la enzima *Pfu* Hotstart DNA polimerasa (Stratagene), dotada de prueba de lectura, en las condiciones recomendadas por el fabricante para obtener la máxima fidelidad de copia.

El fragmento A (2.5 kb) se amplificó a partir del cDNA RT1 con la pareja de cebadores PM1-PM140R utilizando una desnaturalización inicial a 92°C durante 2 min, 38 ciclos de 15 s a 92°C , 20 s a 65°C y 4 min a 68°C y una extensión final de 10 min a 68°C; los fragmentos B (6 kb) y C (4.2 kb) se amplificaron a partir del cDNA RT2 con las parejas de cebadores PM141D-PM142R y PM144D-PM138R, respectivamente, y un programa térmico combinado de tres y dos etapas (desnaturalización inicial a 92°C durante 2 min, 10 ciclos de 15 s a 92°C, 20 s a 65°C y 9 min a 68°C (fragmento B) o 7 min a 68°C (fragmento C), 28 ciclos de 15 s a 92°C y 9 min a 68°C el primer ciclo y un incremento de 10 s/ciclo en los ciclos sucesivos (fragmento B) o 7 min a 68°C el primer ciclo y un incremento de 10 s/ciclo en los ciclos sucesivos (fragmento C), y una extensión final a 68°C durante 10 min); finalmente, el fragmento D (8 kb) se amplificó a partir del cDNA RT3 con los cebadores PM134D y PM2/37R usando una desnaturalización inicial a 92°C durante 2 min, 10 ciclos de 15 s a 92°C, 20 s a 65°C y 14 min a 68°C, 28 ciclos de 15 s a 92°C, 14 min a 68°C el primer ciclo y un incremento de 20 s/ciclo en los ciclos sucesivos y una extensión final a 68°C durante 10 min. Los cuatro fragmentos de DNA sintetizados se purificaron con el estuche comercial ULTRACLEAN™ 15 DNA Purification (MOBIO), se fosforilaron con la T4 polinucleotido kinasa (NEB), se ligaron en el vector pUC19 linearizado con *Sma*I (Fermentas Life Sciences) y se transformaron por electroporación en células de *E. coli* JM109. De cada fragmento de DNA se seleccionaron 24-28 clones de los que se amplificaron por PCR regiones internas cuyo perfil de SSCP se comparó con el de las correspondientes regiones amplificadas mediante RT-PCR con los mismos cebadores a partir del

dsRNA original para comprobar que los productos amplificados correspondían a la secuencia predominante en el aislado de CTV. Con este fin, se utilizó la pareja de cebadores PM1-RF137R donde el primero de ellos anilla en el extremo 5' UTR y el segundo en el extremo 5' de la región ORF 1a, para analizar los clones del fragmento A, la pareja PM144D-PM142R (de la región ORF 1a) para los clones de los fragmentos B y C y las parejas PM66D-PM67R (región p61) y PM85D-PM86R (región p23) para los clones del fragmento D. De cada uno de los fragmentos se seleccionaron dos clones con el perfil de SSCP correspondiente a la variante de secuencia mayoritaria en las regiones analizadas y se secuenciaron en ambas direcciones con el secuenciador ABI PRISM DNA 377 (PE Biosystems). Para confirmar la secuencia del extremo 3' UTR se obtuvo un cDNA adicional de la región 3'-terminal mediante poliadenilación del dsRNA desnaturalizado, seguida de retrotranscripción con el cebador PM1 y posterior amplificación por PCR con los cebadores PM1 y PM175D (Tabla 1).

El ensamblaje de la secuencia completa del gRNA se realizó con el programa Vector NTI 8 (Lu y Moriyama, 2004). Los siguientes programas que pertenecen al paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984) se utilizaron para el análisis de la secuencia: SEQED para editar secuencias, TRANSLATE para deducir la secuencia aminoacídica, FRAMES para predecir ORFs, y GAP y PLOTSIMILARITY para comparaciones de secuencias. Se realizaron alineamientos múltiples con el programa ENMA (CLUSTAL W interface) disponible en el servidor del EMBOSS (<http://ngfnblast.gbf.de/uk/emboss.html>) y análisis filogenéticos con el paquete MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004).

### **1.2.3. Caracterización de la secuencia no codificante del extremo 5' del RNA genómico**

A partir de extractos ricos en dsRNA obtenidos de diferentes plantas infectadas con el aislado T318A, se estudió mediante RT-PCR el tipo de secuencias presentes en el extremo 5' del RNA genómico de acuerdo con los tres grupos definidos por López *et al.* (1998). Para la reacción de RT se

utilizó el cebador general RF137R y el cDNA obtenido se empleó como molde para la amplificación de tres reacciones separadas de PCR en las que se utilizó el cebador RF137R y los cebadores específicos para cada uno de los tres tipos de secuencia en las condiciones descritas (Ayllón *et al.*, 2001). Estos cebadores están situados en zonas conservadas en cada grupo de secuencia: el cebador PM35D (grupo I) está basado en la secuencia del aislado T36 de Florida, el cebador PM33D (grupo II) en la secuencia del aislado VT de Israel y el cebador PM34D (grupo III) en la secuencia del aislado español T317.

Por otro lado, se analizó la estructura secundaria de mínima energía libre obtenida para el extremo 5' UTR del aislado T318A utilizando el programa MFOLD.

### **1.2.4. Detección y caracterización de RNAs defectivos**

Para determinar la presencia de dRNAs en el aislado T318A se prepararon extractos ricos en dsRNA procedentes de la corteza de diferentes plantas infectadas con este aislado. Estos extractos se separaron en geles de agarosa-formaldehído al 0.9% siguiendo el protocolo previamente establecido (Lewandowski y Dawson, 1998) y se analizaron por hibridación en formato Northern-blot con sondas de RNA específicas de los extremos 5' y 3' del aislado marcadas con digoxigenina (RNA-DIG). Para obtener estas sondas, se amplificaron los 1095 nt 5' terminales y los 771 nt 3' terminales del aislado mediante PCR a partir de los fragmentos de DNA A y D utilizando las parejas de cebadores PM158D-PM160R y PM95D-PM2R, respectivamente. Los productos se clonaron en el vector de transcripción pGEM-T-Easy (Promega) y las sondas de RNA se obtuvieron mediante linearización del plásmido y transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 o SP6, dependiendo de la polaridad deseada. El DNA contaminante de las sondas de RNA se eliminó incubando con DNasa libre de RNasa (Ambion) y las sondas se purificaron con el estuche comercial RNaid (Q-BIO gene). Las condiciones utilizadas para la hibridación fueron básicamente las descritas (Lewandowski y Dawson, 1998), excepto que en este caso se utilizó la

solución de hibridación ULTRAhyb™ (AMBION) y el revelado se hizo con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche).

Tabla 1. Cebadores utilizados para retrotranscripción y amplificación mediante PCR de distintas regiones del gRNA de CTV, aislado T318A.

Región	Cebadores <sup>a</sup>	Secuencia nucleotídica 5' - 3' <sup>b</sup>	Posiciones <sup>c,d,e</sup>
3' UTR	PM2R	CCTATGTTGGCCCCCATAGGGACAGTGTGTTG	19260-19292 <sup>c</sup>
3' UTR	PM2/3R	TGGACCTATGTTGGCCCCCATAGGGACAGTGTGTTG	19260-19296 <sup>c</sup>
ORF 11	PM85D	GGACAACTTTTTTCTGTGAACCTTTC	18409-18436 <sup>c</sup>
ORF 11	PM86R	GATGAAGTGGTGTTCACGGAGAACTC	18995-19020 <sup>c</sup>
5' UTR	PM34D	TGGTGTAATCCCAACCACCAGACGGTTG	56-80 <sup>c</sup>
5'UTR	PM158D	AATTTCTCAAATTCACCCGTACCCTC	1-26 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM35D	ATCGCGCATCTGGCGCAAAC	170-189 <sup>c</sup>
ORF 1a	RF137R	GCCGATXGTCCCTYACGG	263-281 <sup>c</sup>
ORF 1a	PM160R	GCCCAGGACGGAACATGCGAAC	1074-1095 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM82D	ACGTGTCGTGAAACGCGG	2021-2039 <sup>c</sup>
ORF 1a	PM73R	GTCGATAACTCGACAAACGAGC	2527-2548 <sup>c</sup>
ORF2	PM134D	CAGCTTCTATGAGAGGCTACTACTCCTTTCGG	11211-11242 <sup>d</sup>
ORF2	PM133D	AACGGGACTCATAAAATTCGAGCGCACGTGCGATAATCA	11096-11133 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM144D	TTCAGTTTTTCGCGATTTTTGTACGATTC	7227-7256 <sup>d</sup>
ORF 2	PM138R	CATTAGTAGCGGTTTCCGAGACAGCTCTAAA	11375-11405 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM141D	CTACTAAAAAGCGGCCGCTCATTATGATGCAAGTATGAAAGGCG	2084-2109 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM142R	TTCTTGACGTTATGTCACGTGCGACGGGATA	7792-7823 <sup>d</sup>
ORF 1a	PM140R	GACGCCGACGTGTCCCGCAATTTCAAGAC	2475-2503 <sup>d</sup>
ORF 11	PM175D	GCAGTCTCAGAACGAGGTGGC	18619-18639 <sup>d</sup>
ORF 11	PM95D	CATTATCGACGCTTTGATACGGAAAAATAG	18481-18510 <sup>d</sup>
ORF 2	PM 62D	TATATTTCTTTCTGCTTAACA	11028-11048 <sup>e</sup>
ORF 2	PM63R	TCTCACATACTTAACGTCTTC	11435-11455 <sup>e</sup>
ORF 5	PM66D	AGTCGGATGTAGATTCACGTT	14035-14055 <sup>e</sup>
ORF 5	PM67R	TAGCACACCGATAAACACCGT	14772-14792 <sup>e</sup>
ORF 4	PM64D	CGTGTACATTATTAACGAACC	12525-12545 <sup>e</sup>
ORF 4	PM65R	ATCTCCTTCAAACATTCTTGC	13282-13302 <sup>e</sup>
5' UTR	PM33D	CCCGTACCCTCCGGAAATCACG	16-37 <sup>e</sup>
	PM1	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGC(T) <sup>17</sup> N	

<sup>a</sup>R (reverso) y D (directo) indican cebadores complementarios a la cadena positiva y negativa del gRNA, respectivamente.

<sup>b</sup>N = A + T + G + C; X = A + C; Y = T + C

<sup>c,d,e</sup> Posiciones nucleotídicas de los cebadores en el gRNA de los aislados de CTV T36 (c), T318A (d) y T385 (e).

### 1.2.5. Caracterización biológica del aislado T318A

Se propagaron yemas de diversas variedades comerciales de naranjo dulce (Salustiana, Berna, Valencia y Washington navel), mandarino (Clementino de Nules), pomelo (Star Ruby) y zamboa (Pink pummelo) sobre citrange Carrizo y se inocularon por injerto con el aislado T318A. Las plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura controlada (18/26 °C noche/día) y la infección por CTV se comprobó 1-2 meses después de la inoculación mediante análisis serológicos ELISA y DTBIA (Cambra *et al.*, 1991; Garnsey *et al.*, 1993) o en su caso mediante RT-PCR convencional. A lo largo de las tres primeras brotaciones se observó el crecimiento y expresión de síntomas de enanismo, SY y SP en las plantas inoculadas en comparación con plantas equivalentes no inoculadas.

## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1. Selección de un aislado agresivo de origen español

Con objeto de seleccionar un aislado agresivo cuya secuenciación no presentase problemas derivados de la presencia de variantes de secuencia muy divergentes en su población viral, se examinó la estructura poblacional de los aislados T305 y T318 (Moreno *et al.*, 1993b) de la colección del IVIA y la de un grupo de siete sub-aislados de T318, denominados T318A, todos ellos inductores de SY y SP en pomelo Duncan y naranjo dulce Pineapple. El análisis de SSCP del cDNA obtenido de los genes *p33*, *p61*, *p65* y *p23* de los aislados T305 y T318 mostró un patrón complejo que consistía en cuatro o más bandas, dos de ellas más intensas (Figura 1), mientras que los siete sub-aislados de T318 obtenidos mediante transmisión por pulgón (T318A) mostraron un patrón de SSCP más sencillo con dos bandas intensas que coincidían con el haplotipo predominante en los aislados T305 y T318. Esta estructura poblacional simple que sugería la selección de la variante de secuencia predominante en T318 y T305 en el proceso de transmisión, junto al hecho de que todos los sub-aislados T318A presentaban características

patogénicas similares a las de T318, determinó la selección de uno de ellos para ser secuenciado y caracterizado biológica y molecularmente.

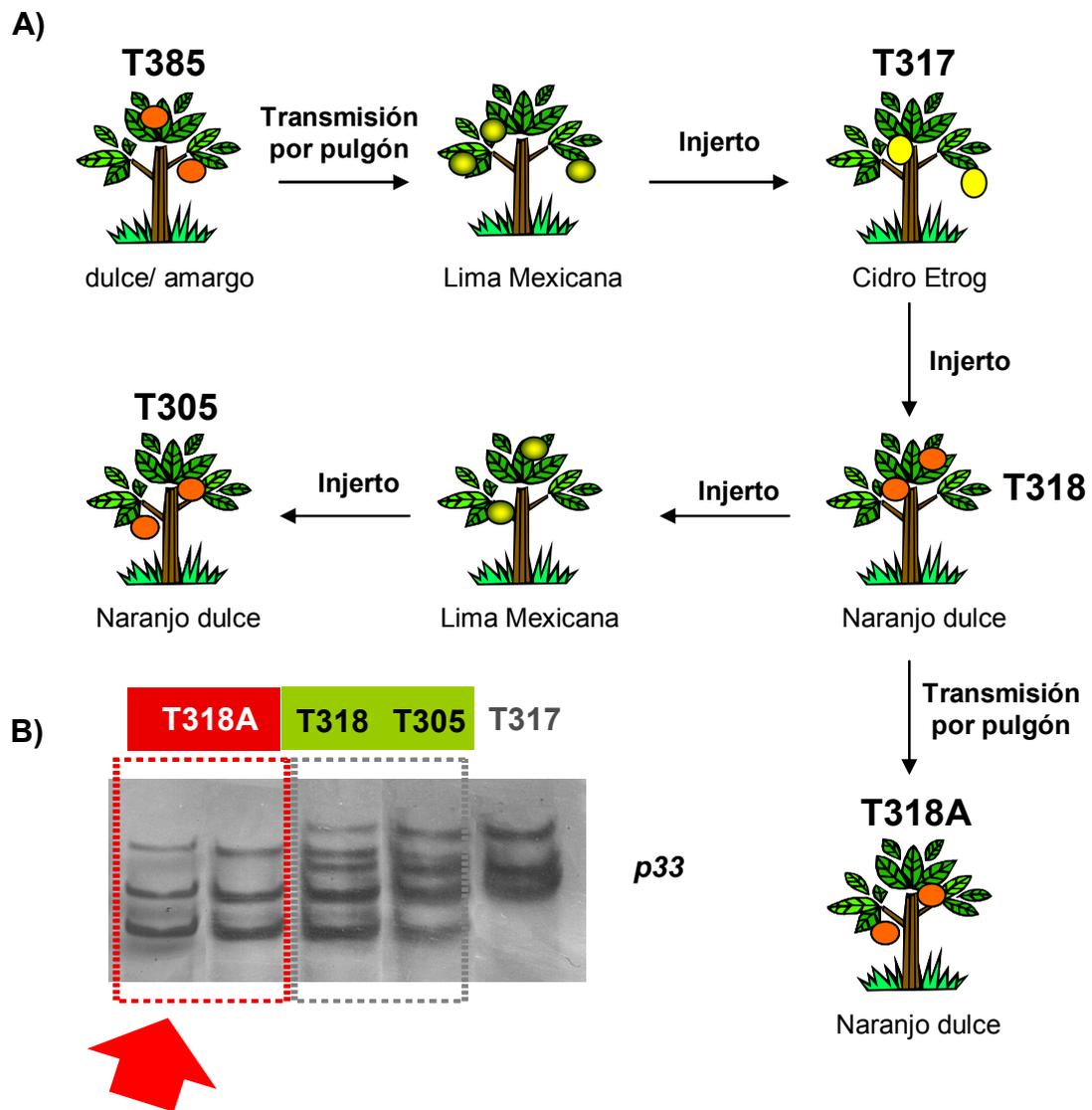


Figura 1. Selección de un aislado agresivo de CTV de origen español para la secuenciación de su RNA genómico. (A) Esquema de las inoculaciones realizadas a partir del aislado no agresivo T385 para la obtención de los sub-aislados agresivos T318, T318A y T305 (Moreno *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1993a, 1993b). (B) Comparación de los perfiles de SSCP del gen *p33* de estos aislados para seleccionar el de población más homogénea (T318A).

### 1.3.2. Secuenciación del RNA genómico de T318A.

Para simplificar la preparación de un futuro clon de cDNA de longitud completa, la estrategia de secuenciación adoptada consistió en obtener tres cDNAs en reacciones independientes de RT (RT1, RT2 y RT3) y mediante PCR larga utilizando cebadores específicos para T318A (ver Tabla 1), se generaron cuatro fragmentos de DNA de gran tamaño: A (2.5 kb), B (6 kb), C (4.2 kb) y D (8 kb), que cubrían el gRNA completo del aislado (Figura 2).

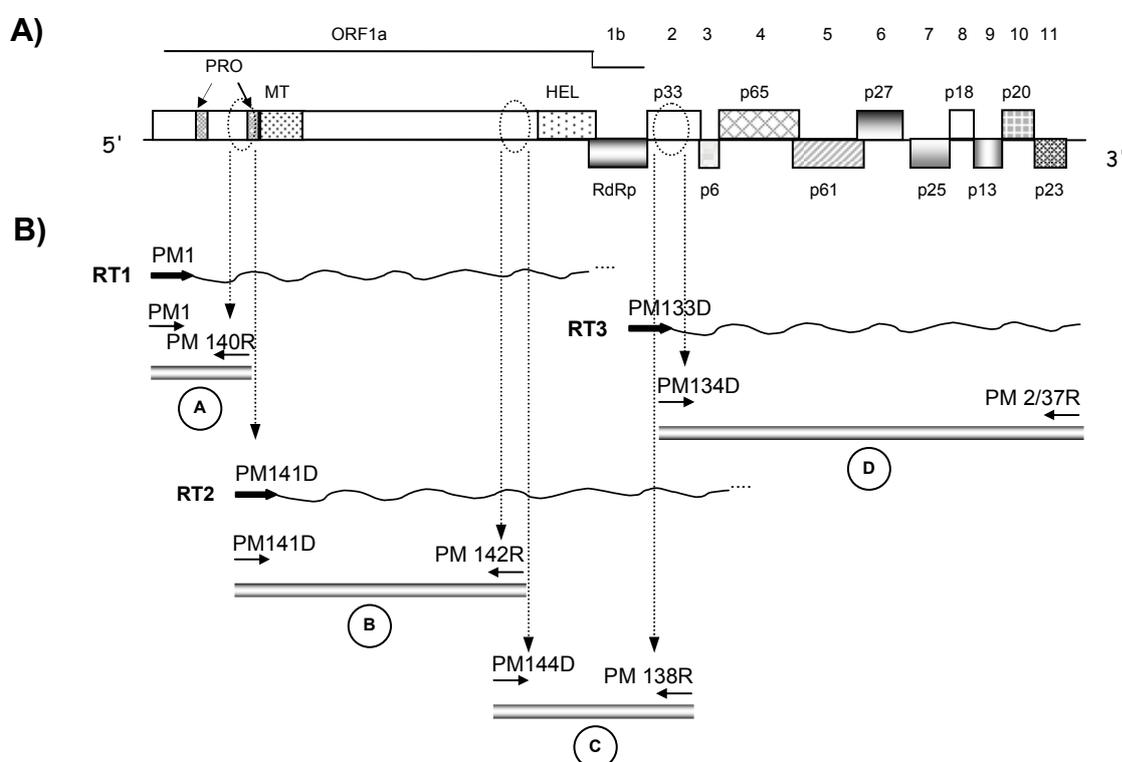


Figura 2. Estrategia utilizada para la obtención de cuatro amplicones solapantes que cubriesen el RNA genómico completo de T318A mediante RT-PCR larga. A) Organización genómica de CTV. Las cajas representan pautas de lectura abierta (ORFs) y junto a ellas se indican los productos proteicos potencialmente codificados. Las elipses de línea punteada indican las tres regiones de las que se obtuvieron datos preliminares de secuenciación para diseñar cebadores específicos de T318A. B) Localización de los tres cDNAs (RT1, RT2 y RT3) obtenidos mediante retrotranscripción del RNA viral así como de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR para generar los 4 fragmentos solapantes de cDNA (A, B, C y D). Las zonas de solapamiento están acotadas por las flechas verticales.

Para cada fragmento se obtuvieron 24-28 clones y se analizaron mediante SSCP regiones internas de los mismos. Entre el 97% y 100% de los clones analizados mostró en estas regiones el mismo perfil de SSCP que el producto de RT-PCR equivalente obtenido de dsRNA del aislado original. Para cada fragmento se seleccionaron dos clones con el perfil mayoritario de SSCP en las regiones analizadas y se secuenciaron en ambas direcciones. Los cuatro fragmentos sintetizados solapaban entre sí en tres regiones de aproximadamente 0.3-0.6 kb en las que la identidad nucleotídica entre clones solapantes fue del 100%. Los dos clones secuenciados para los fragmentos A y B eran idénticos entre sí, mientras que los dos clones de los fragmentos C y D diferían en 1 y 5 nt, respectivamente. Tres de los seis cambios nucleotídicos totales eran silenciosos o afectaban a regiones no codificantes y tres dieron lugar a cambios a aminoácidos similares (Tabla 2).

Tabla 2. Identidad nucleotídica (nt), tipo de sustituciones, región donde se localiza, y en su caso cambio de aminoácido (aa) observados entre los dos clones secuenciados para cada uno de los fragmentos de DNA obtenidos a partir del gRNA de T318A.

Fragmento	Identidad nt	Región	Sustitución nt	Cambio aa
<b>A</b>	100.00%			
<b>B</b>	100.00%			
<b>C</b>	99.98%	p349	<b>GAT → CAT</b>	Asp → His
<b>D</b>	99.94%	p6	<b>ATA → GTA</b>	Ile → Val
		p65	<b>CCT → CCC</b>	
		p13	<b>TTG → CTG</b>	
		p20	<b>GTG → ATG</b>	Val → Met
		R.I. p20-p23		

R.I. indica región intergénica.

En negrita se muestran las sustituciones de bases.

El gRNA del aislado T318A tiene una longitud de 19252 nt, muy similar en tamaño al del aislado SY568 (AF001623) e idéntico al de la secuencia SY568R (Vives *et al.*, 2005), y como ésta última tiene los extremos 5' y 3' UTR de 107 nt y 273 nt, respectivamente. T318A mostró los valores más elevados de identidad nucleotídica con los aislados más agresivos de los que se conoce la secuencia completa (98.4% con SY568R y 97.9% con NUagA), mientras que los valores de identidad con VT, T385 y T36 fueron del 95.1%, 89.6% y 77.3%, respectivamente (Figura 3).

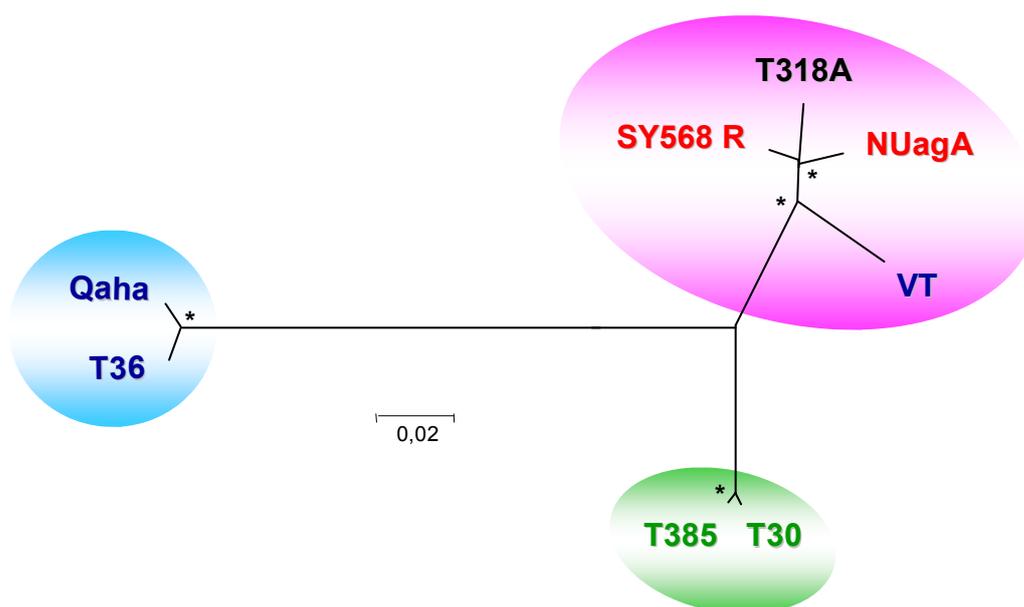


Figura 3. Árbol filogenético consenso obtenido con el método de Neighbor-Joining y 1000 réplicas de *bootstrap* a partir de las siete secuencias completas de CTV disponibles en la base de datos al comenzar este trabajo de tesis y después de la obtención de la secuencia completa del aislado T318A. (\*) Nodo detectado en el 90-100% de las réplicas.

Cuando se analizó mediante el programa PLOTSIMILARITY la distribución de los cambios a lo largo del gRNA se observó que las diferencias nucleotídicas entre T318A y SY568R se distribuían de forma homogénea, mientras que en la comparación con NUagA (AB046398) se observó una región divergente de baja identidad, resultado de múltiples inserciones y supresiones en las 3 primeras kb desde el extremo 5' (ver Figura 4). Las diferencias nucleotídicas entre T318A y los aislados no

agresivos T385 y T30 también se distribuían de forma homogénea a lo largo del gRNA. Al comparar con VT se observó una región de baja identidad situada entre las 4 y las 8 kb desde el extremo 5', y en el caso de T36 la región de baja identidad se extendía a toda la mitad 5' del gRNA (Figura 4).

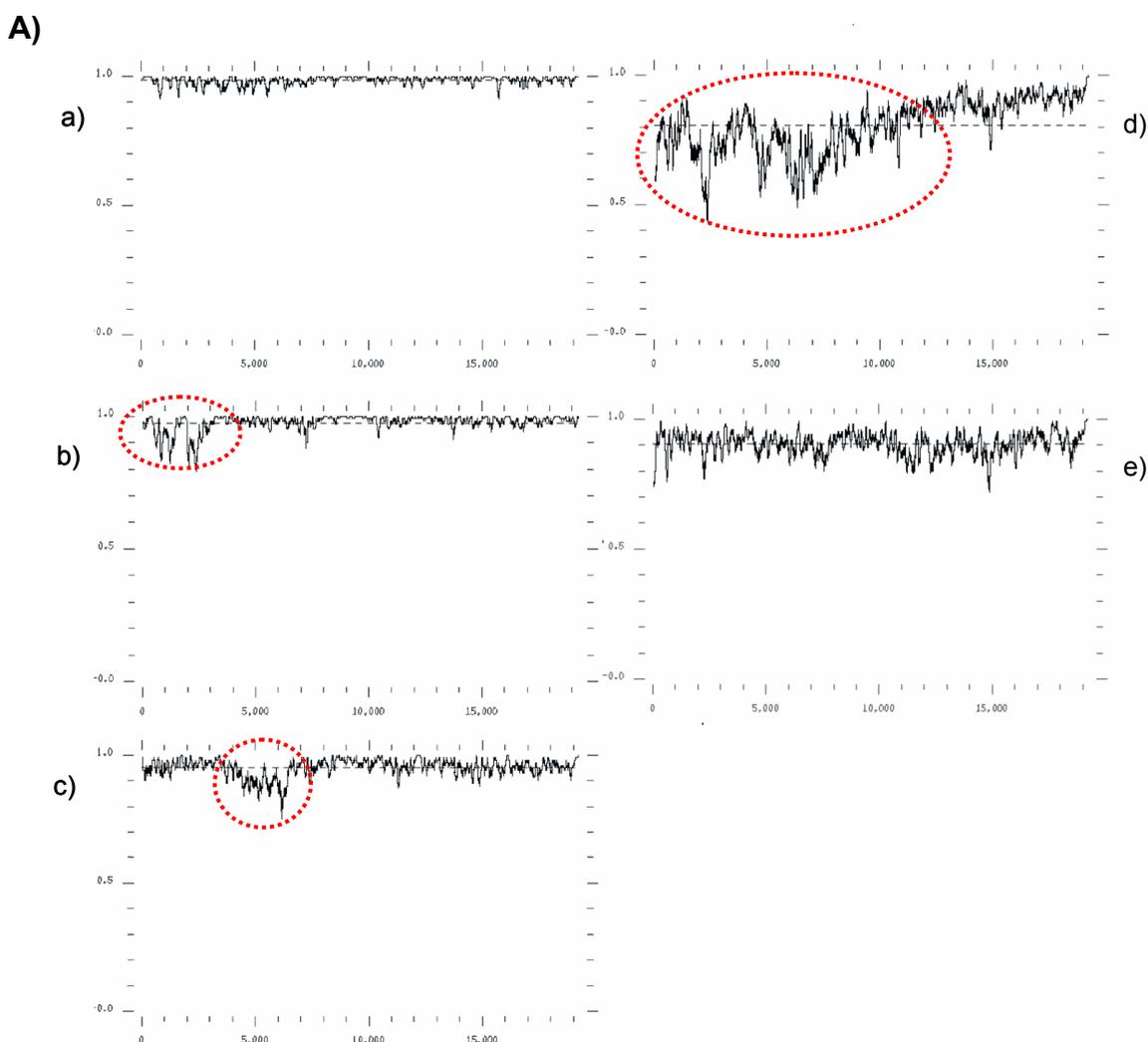


Figura 4. A) Representación gráfica de la identidad nucleotídica en ventanas de 100 nt a lo largo del genoma entre la secuencia del aislado T318A y la de los aislados de CTV: a) SY568R, b) NUagA, c) VT, d) T36) y e) T385. B) Organización genómica del gRNA de CTV indicando las pautas de lectura abierta (ORFs) y proteínas potencialmente codificadas.

El gRNA del aislado T318A presenta una organización genómica idéntica a la del resto de aislados de CTV secuenciados, con 12 ORFs que

codifican potencialmente productos proteicos similares en tamaño a los descritos para otros aislados (Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 1994; Suastika *et al.*, 2001; Vives *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Para simplificar la comparación entre las identidades nucleotídicas y aminoacídicas entre las diferentes ORFs y UTRs del aislado T318A y del resto de aislados, se han omitido en la Tabla 3 las secuencias de los aislados T30 y Qaha ya que son esencialmente idénticas a las de los aislados T385 y T36, respectivamente. Por otro lado, hemos utilizado la secuencia de SY568R, la versión restaurada de la secuencia recombinante de SY568 para dichas comparaciones (Vives *et al.*, 2005). En todas las regiones analizadas las identidades nucleotídicas y aminoacídicas de T318A con los aislados agresivos SY568R y NUagA fueron las más elevadas (Tabla 3).

Tabla 3. Identidades nucleotídicas (nt) y aminoacídicas (aa) entre las diferentes ORFs y UTRs del aislado T318A de CTV y las de los aislados T385, VT, T36, NUagA y SY568R. En color rojo se destacan los valores más elevados de identidad nucleotídica para cada región.

Genes/UTRs	AISLADOS									
	T385		VT		T36		NUagA		SY568R	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
5' UTR	79.4		96.3		63.9		96.3		<b>99.1</b>	
p349	90.2	92.2	94.6	92.6	66.1	64.8	97.2	93.9	<b>98.0</b>	97.9
RdRp	91.3	97.0	96.9	97.2	76.6	91.7	98.7	99.6	<b>98.8</b>	99.6
p33	84.5	88.1	94.5	92.8	83.7	85.8	98.1	99.3	<b>98.9</b>	98.0
p6	92.4	96.0	95.3	91.8	86.3	91.8	<b>100.0</b>	100.0	97.4	98.0
p65	87.9	94.3	97.2	95.5	87.9	94.5	98.6	99.2	<b>98.9</b>	99.7
p61	86.6	91.0	94.1	95.2	85.8	90.2	97.9	98.7	<b>98.9</b>	99.3
p27	88.4	95.7	94.6	96.6	87.3	95.7	98.0	99.2	<b>98.3</b>	98.7
p25	92.2	95.9	95.5	95.9	92.3	95.4	97.4	98.6	<b>98.5</b>	99.1
p18	92.8	96.3	95.5	93.2	92.1	93.8	98.2	98.2	97.6	96.3
p13	90.0	89.4	93.8	95.7	90.3	90.3	98.3	98.3	98.3	96.5
p20	92.6	94.9	96.3	98.3	90.9	97.2	99.1	100.0	<b>99.3</b>	100.0
p23	89.8	92.0	94.7	95.1	90.9	91.0	<b>98.9</b>	99.5	98.5	98.5
3' UTR	97.8		98.5		97.4		98.9		<b>99.6</b>	
Media	89.6%		95.1%		77.3%		97.9%		98.4%	

Las comparaciones nucleotídicas entre T318A y estos dos aislados mostraron un total de 300 y 400 cambios puntuales, respectivamente, a lo largo del genoma, la mayoría de las cuales (87% y 76%) eran transiciones y generalmente afectaban a la tercera posición del codón. El aislado T318A mostró una elevada identidad nucleotídica con SY568R en la mayoría de las ORFs y en las dos UTRs, en las que sólo se observó un cambio nucleotídico en cada región.

La estructura secundaria de mínima energía libre obtenida con el programa MFOLD para el extremo 5' de T318A coincidió con las predichas para SY568R, NUagA, VT y T36 y difirió con las predichas para T30, T385 y Qaha (Figura 5).

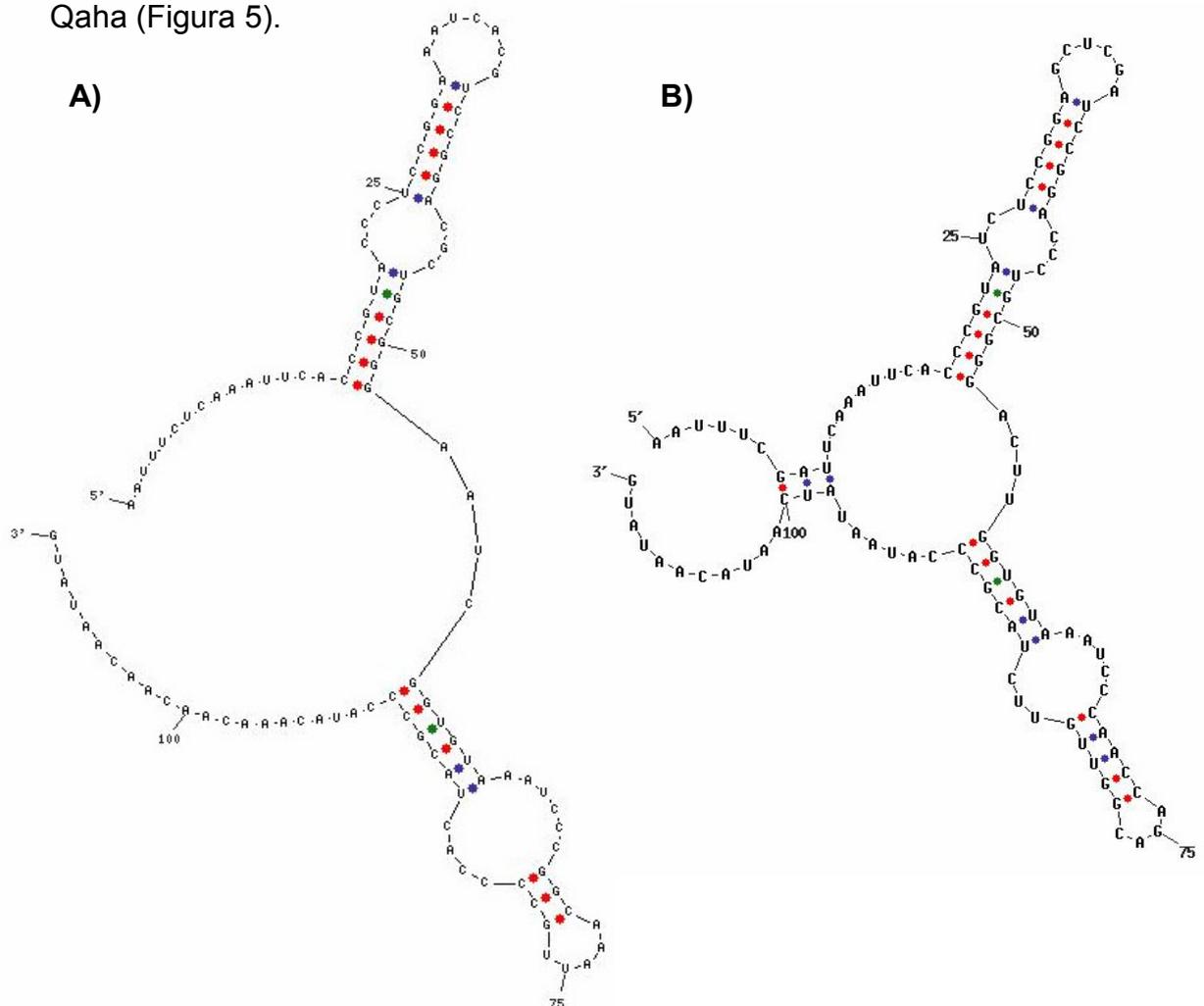


Figura 5. Estructuras secundarias de mínima energía libre obtenidas con el programa MFOLD para el extremo 5' UTR de cada uno de los aislados de los que se conoce la secuencia completa, (A) SY568R, NUagA, T318A, VT y T36, y (B) T385, T30 y Qaha.

La identidad aminoacídica de T318A con SY568R y NUagA en diferentes ORFs fue generalmente igual o más alta que la identidad nucleotídica. T318A presentó una identidad aminoacídica mayor con SY568R en las proteínas p349, p65, p61 y p25 y con NUagA en las proteínas p33, p6, p27, p18, p13 y p23 (Tabla 3).

La poliproteína potencialmente codificada por la ORF 1a de T318A tenía una masa molecular estimada de 346.9 kDa y mostraba en su región N-terminal los residuos catalíticos y sitios de corte característicos de las proteasas tipo papaína (P-PRO) L1 y L2, así como los motivos de metiltransferasa (MT) y helicasa (HEL) encontrados previamente en otros aislados (Karasev *et al.*, 1995). La ORF 1b solapa con la ORF 1a en 77 nt, la misma extensión que en el caso de SY568R, y podría expresarse mediante el mecanismo de deriva ribosomal de tipo +1 encontrado en otros aislados de CTV (Karasev *et al.*, 1995). Aunque la ORF 1a es una de las regiones más variables en el genoma de CTV, la identidad aminoacídica de T318A con otros aislados en los dominios conservados P-PRO, MT y HEL (Karasev *et al.*, 1995) era generalmente alta (entre el 92% y el 100%). T318A estaba estrechamente relacionado con SY568R en los motivos conservados L1 y L2 de PRO, con sólo un cambio aminoacídico detectado en cada dominio, mientras que compartía los motivos MT con NUagA. Los siete motivos conservados del dominio HEL son idénticos en todos los aislados, incluido T318A, excepto el aislado VT (Karasev *et al.*, 1995).

En la mitad 3' del genoma, p6, una pequeña proteína hidrofóbica con posibles funciones transmembrana, era idéntica en T318A y en NUagA, mientras que p20, una proteína que se acumula en las inclusiones amorfas y que se ha propuesto como supresora del silenciamiento génico a nivel intracelular y de larga distancia (Gowda *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2004), era idéntica en T318A, SY568R y NUagA.

Las comparaciones entre los ocho aislados de CTV secuenciados completamente revelaron grupos filogenéticos variables para las distintas ORFs de la mitad 3' del genoma, dos grupos filogenéticos para los genes p65, p61 y p27 y tres para los genes p33, p20 y p23 (Figura 6). Para los

genes *p65*, *p61* y *p27* los aislados se distribuían en dos grupos, uno de los cuales incluía SY568R, NUagA, T318A y VT y el otro T385, T30, Qaha y T36. Las identidades nucleotídicas entre aislados dentro del mismo grupo fueron superiores al 92%, mientras que las identidades entre aislados de grupos diferentes fueron inferiores al 90%. Resulta interesante que estos dos grupos separen aislados inductores de SP en naranjo dulce y/o pomelo y aislados no inductores de SP.

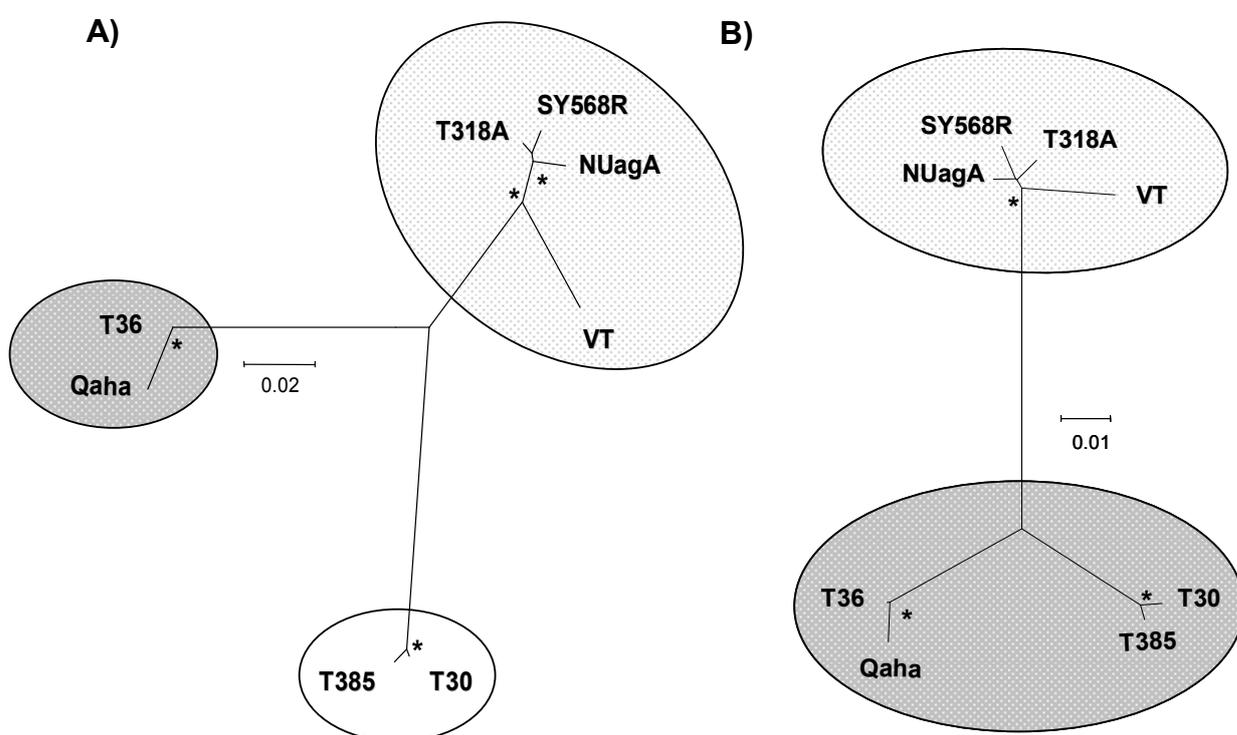


Figura 6. Árboles filogenéticos consenso obtenidos con el método de Neighbor-Joining y 1000 réplicas de *bootstrap* a partir de las secuencias de los genes *p33* (A) y *p65* (B) de los 8 aislados de CTV cuya secuencia completa estaba disponible en la base de datos. (\*) Nodo detectado en el 90-100 % de las réplicas.

Alineamientos múltiples de algunas regiones polimórficas mostraron que determinadas posiciones aminoacídicas eran características de cada grupo y permitían diferenciar los aislados SP y los no-SP (Figura 7).



inductores de SP. Esta estructura poblacional compuesta por una variante de secuencia predominante es similar a la encontrada analizando diferentes regiones del gRNA en otros aislados de CTV (Ayllón *et al.*, 1999b; Rubio *et al.*, 2001, Sambade *et al.*, 2002); sin embargo, esta es la primera vez que el análisis de dos regiones del gRNA se realiza sobre una misma molécula.

De forma similar, se caracterizó la población de variantes de secuencia en el extremo 5' UTR, una de las regiones más polimórficas en el genoma de CTV (López *et al.*, 1998). Estudios previos de las secuencias del extremo 5' UTR de CTV las clasificaron en tres tipos (I, II y III) con identidades nucleotídicas intra-grupo superiores al 88% e inter-grupos inferiores al 64%. Análisis del extremo 5' UTR de T318A en 28 clones del fragmento A revelaron que todos tenían el mismo perfil de SSCP y la secuencia nucleotídica de 10 de esos clones fue también idéntica y pertenecía al tipo II. Para comprobar si las plantas infectadas con T318A contienen otro tipo de secuencias 5' UTR, se analizaron extractos ricos en dsRNA de cuatro plantas independientes infectadas con el aislado T318A o T318 por RT-PCR. El dsRNA se desnaturalizó, se retrotranscribió con el cebador RF137R y se amplificó por PCR con los tres cebadores específicos para cada tipo de secuencia (Ayllón *et al.*, 2001). La planta infectada con el aislado T318 y dos de las plantas infectadas con T318A contenían secuencias tipo II y III, aunque los productos de PCR obtenidos de las plantas infectadas con T318A con los cebadores específicos del tipo III daban una banda muy tenue. A partir de las otras dos plantas infectadas con T318A sólo se obtuvo amplificación con los cebadores del tipo II.

Por otro lado, la estructura secundaria de mínima energía libre obtenida con el programa MFOLD para el extremo 5' UTR de cada uno de los aislados de CTV de los que se conoce la secuencia completa, permitió hacer dos grupos: uno de ellos, que incluía T318A, comprendía los aislados de agresividad alta o intermedia, mientras que el otro incluía sólo los aislados poco agresivos (Figura 5).

### 1.3.3. Presencia de RNAs defectivos

La hibridación tipo Northern-blot con sondas de RNA-DIG específicas para los extremos 5' y 3' del aislado T318A, mostró que este aislado posee un perfil de dsRNA similar al de otros aislados de CTV descritos, que incluye dRNAs de gran tamaño. Al comparar las diferentes plantas infectadas con T318A, se observaron diferencias en el número y tamaño de sus dRNAs. Algunas de ellas contenían dos o tres dRNAs con un tamaño molecular estimado de 10-13 kb (Figura 8).

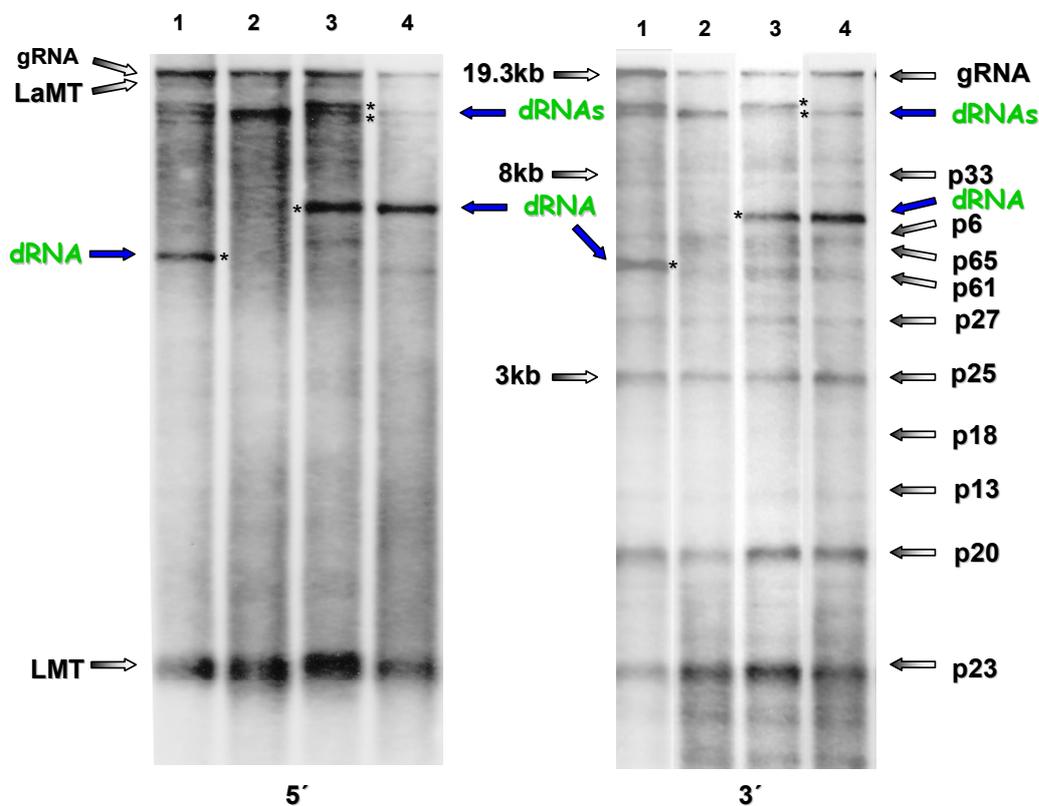


Figura 8. Hibridación molecular en formato Northern-blot de dsRNA de una planta infectada con el aislado T318A (carril 1) y tres propagaciones de yemas infectadas de la misma (carriles 2-4). Las membranas se hibridaron con sondas de RNA-DIG específicas para la cadena positiva de los extremos 5' (panel izquierdo) y 3' (panel derecho) del aislado. Se indican las posiciones del gRNA, sGRNAs 3' co-terminales, LMTs (5' co-terminales) y diferentes dRNAs (asteriscos y flechas exteriores).

### 1.3.4. Caracterización biológica del aislado T318A

Los síntomas inducidos por T318A en plantas indicadoras de semilla incluyen enanismo, acorchamiento de las nerviaciones y SP intenso en Lima Mexicana; enanismo, SY y SP en pomelo Duncan y SP suave en naranjo dulce Pinneapple (Figura 9).

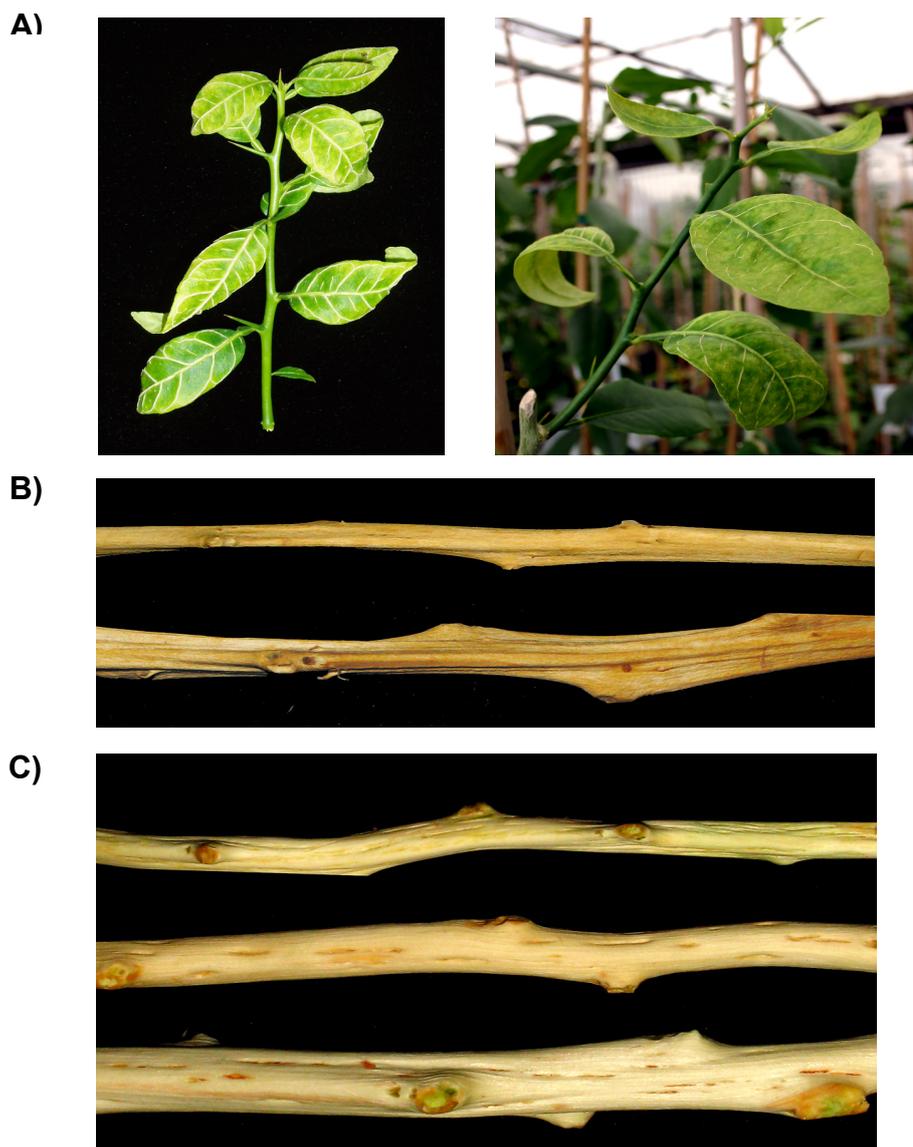


Figura 9. Síntomas inducidos por T318A en distintas especies indicadoras: (A) Acorchamiento de las nerviaciones, deformación de las hojas y detención del crecimiento en Lima Mexicana, (B) SP en pomelo Duncan y (C) SP suave en naranjo dulce Pinneapple.

Para conocer si T318A afecta el crecimiento de diversas variedades o combinaciones comerciales cultivadas en España y el daño potencial que podría producir en las mismas, se inocularon mediante injerto las siguientes variedades comerciales de cítricos: 4 variedades de naranjos dulces (Washington navel, Valencia, Berna y Salustiana), 1 de mandarino (Clementino de Nules), 1 de pomelo (Star Ruby) y 1 de zamboa (Pink pummelo). Al cabo de 1 a 2 meses los análisis ELISA y DTIBIA indicaron la presencia de CTV en todas las plantas inoculadas excepto las de zamboa. En estas últimas se pudo detectar CTV un mes más tarde mediante RT-PCR convencional, pero no mediante ELISA.

En diferentes épocas del año se comparó el crecimiento y expresión de síntomas (enanismo, SY o SP) en los distintos huéspedes inoculados con el de los controles negativos (plantas no inoculadas). El crecimiento de las plantas de Pink Pummelo y las variedades de naranjos Berna, Valencia y Salustiana no mostró diferencias con respecto a los controles sanos. Sin embargo, se observó una reducción del crecimiento ligera en los naranjos Navel y el clementino de Nules y muy acusado en el pomelo Star Ruby, en el que también se observaron síntomas severos de SY. En la mayoría de los naranjos dulces (W. navel, Valencia y Salustiana) se observaron ligeras acanaladuras en la madera o SP, que resultaron más intensas en el naranjo dulce Berna y el pomelo Star Ruby (Figura 10).

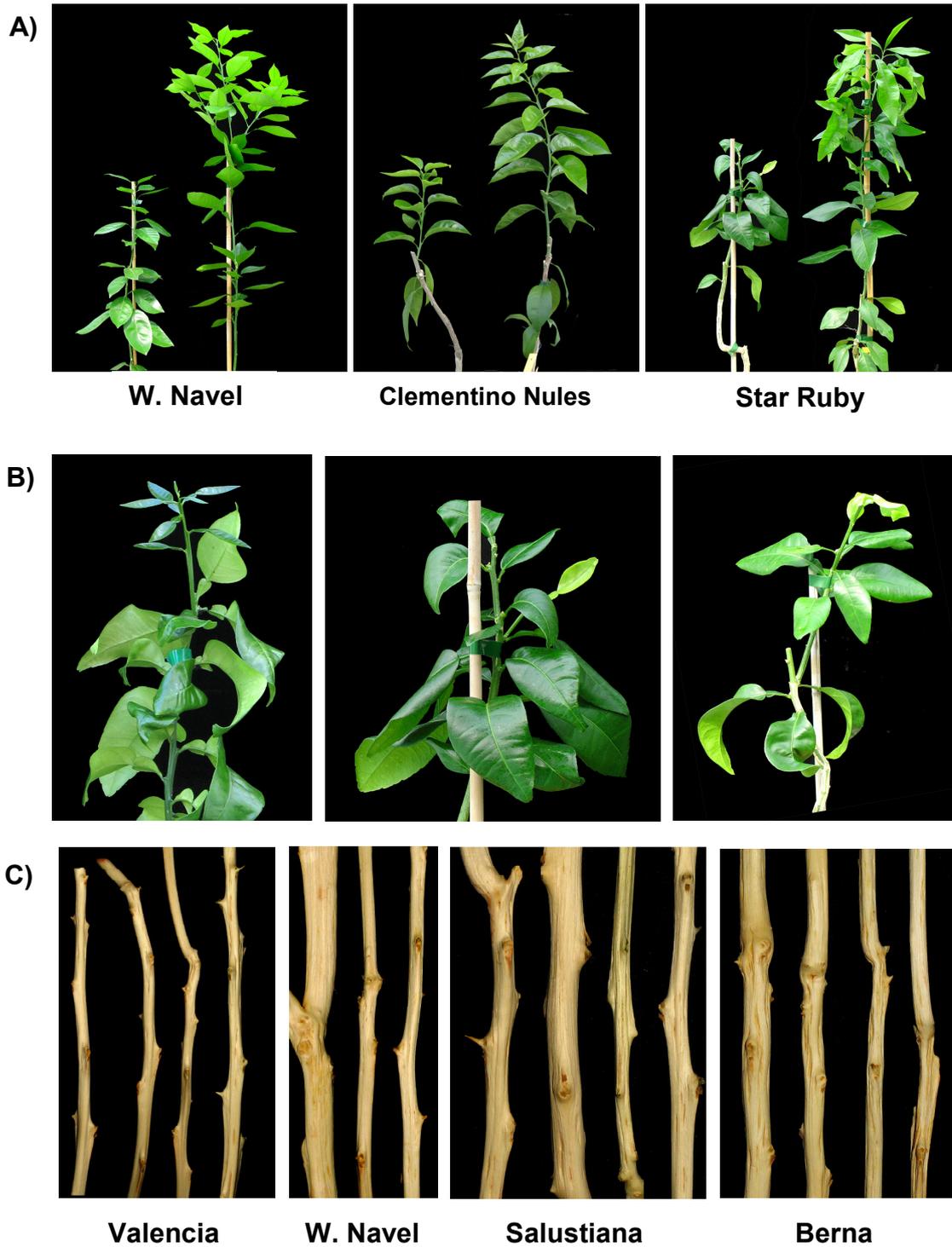


Figura 10. Síntomas inducidos por T318A en variedades comerciales propagadas sobre citrange Carrizo: A) enanismo en naranjo dulce W. Navel, Clementino de Nules y pomelo Star Ruby, B) enanismo, deformación de hojas y SY en pomelo Star Ruby y C) SP en diversas variedades de naranjo dulce.

### 1.4. DISCUSIÓN

El primer problema que se planteaba para obtener la secuencia completa de una variante agresiva de CTV capaz de inducir SP en pomelo y/o naranjo dulce era la elección de un aislado apropiado. El hecho de que los aislados de CTV sean poblaciones genéticamente no homogéneas que a veces contienen dos o más variantes de secuencia divergentes (Rubio *et al.*, 2001, Ayllón *et al.*, 2006), y que esta situación sea más frecuente en los aislados más agresivos (Sambade *et al.*, 2002; Sambade *et al.*, 2003; Targon *et al.*, 2000; Vives *et al.*, 2005), dificulta la obtención de una secuencia representativa al sintetizar cDNA de moldes correspondientes a distintas variantes de secuencia. Para evitar este problema, se examinó la estructura poblacional de los aislados inductores de SP de origen español, T305 y T318 (Moreno *et al.*, 1993b) y de un grupo de siete sub-aislados obtenidos por transmisión por pulgón del aislado T318 a nuevos huéspedes (T318A). Mientras que los aislados T305 y T318 mostraron en distintas regiones genómicas un patrón de SSCP con cuatro o más bandas, que indicaba la presencia de al menos dos variantes de secuencia abundantes (Rubio *et al.*, 2000), el patrón de SSCP de los subaislados T318A contenía únicamente dos bandas, que también estaban presentes en T318 y T305, lo que sugería que los sub-aislados T318A tenían una población más homogénea y que el proceso de transmisión por pulgón probablemente excluyó otras variantes (Albiach-Martí *et al.*, 2000b). Estos resultados y la observación de que T318A inducía en naranjo dulce Pineapple síntomas de SP similares a los de T318 o T305, condujeron a la selección de este aislado para secuenciar su gRNA.

La estrategia de secuenciación elegida, dirigida a simplificar la preparación de un clon de cDNA de longitud completa, consistió en la síntesis de cuatro fragmentos solapantes de cDNA que cubrían todo el gRNA mediante RT-PCR larga evitando sesgar la población de partida. El hecho de que la identidad nucleotídica observada en las regiones solapantes de estos clones fuese del 100%, sugiere que la secuenciación se efectuó sobre la misma variante de secuencia. Por otro lado, la estrategia de

secuenciación incluyó la selección de la variante de secuencia predominante en T318A mediante análisis de SSCP de múltiples clones de cada fragmento en comparación con los productos homólogos de RT-PCR obtenidos de dsRNA de este aislado. El hecho de que más del 97% de los clones compartiesen el mismo perfil de SSCP y que éste correspondiese al observado en el aislado original confirma la homogeneidad de la población de T318A y que los clones secuenciados corresponden a la variante de secuencia mayoritaria. Por otra parte, la disponibilidad de fragmentos de DNA con varios genes es una herramienta útil para comparar la variabilidad de distintos genes sobre una misma molécula, ya que los datos disponibles hasta el momento sobre variabilidad de distintos genes de CTV fueron obtenidos de productos separados de RT-PCR de la población de gRNAs, y por tanto no se conoce qué variantes de cada gen están realmente concatenadas.

El gRNA del aislado T318A presenta una organización genómica idéntica a la del resto de aislados de CTV secuenciados y los productos proteicos potencialmente codificados en sus 12 ORFs son también similares. Este aislado mostró los valores más elevados de identidad nucleotídica con los aislados más agresivos (98.4% con SY568R y 97.9% con NUagA) y los más bajos con T36 (77.3%), en particular en la mitad 5' del gRNA, lo que apoya sugerencias previas sobre la posible naturaleza recombinante de este último aislado (Vives *et al.*, 1999).

La elevada identidad de secuencia entre T318A, SY568R y NUagA se observó no sólo en las zonas codificantes sino en las UTRs. Las notables similitudes de secuencia entre el aislado español T318A y dos aislados agresivos de California (SY568R) y Japón (NUagA) son similares a las previamente establecidas entre los aislados T385 de España y T30 de Florida (Albiach-Martí *et al.*, 2000a) o T36 de Florida y Qaha de Egipto. Esta elevada similitud entre aislados geográficamente separados y que aparentemente no han estado en contacto sugiere que puedan tener un ancestro común y que las altas presiones de selección en el genoma de CTV puedan limitar el repertorio de genotipos con capacidad para sobrevivir en la naturaleza. Hilf *et al* (1999) agruparon los aislados de CTV en dos genotipos

basándose en la divergencia de secuencia de la mitad 5' del genoma. Nuestro análisis filogenético de las ocho secuencias completas de CTV disponibles sugieren que el grupo VT definido por Hilf *et al* (2005) probablemente contiene al menos dos genotipos diferentes. Por otra parte, la comparación de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de estos aislados en distintas regiones del gRNA mostraron que para los genes *p65*, *p61* y *p27* los aislados inductores de SP en naranjo dulce y/o pomelo quedaban separados de los aislados no inductores de SP. Alineamientos múltiples de algunas regiones polimórficas mostraron posiciones nucleotídicas y/o aminoacídicas características de cada grupo que permitían diferenciar ambos tipos de aislados. Estas regiones serían buenas candidatas para delimitar determinantes de patogenicidad en un sistema genético basado en un clon de cDNA infeccioso del gRNA completo. Mientras esta posibilidad se concreta, también podrían servir como marcadores moleculares para diferenciar aislados inductores y no inductores de SP.

La homogeneidad genética de la población de T318A fue confirmada también mediante análisis de SSCP de múltiples clones de regiones de los genes *p61* y *p23* y de la 5' UTR. En este análisis fue interesante constatar que dos plantas infectadas con T318A contenían únicamente secuencias de tipo II (Ayllón *et al.*, 2001; López *et al.*, 1998). Análisis anteriores habían mostrado que los aislados que contenían sólo secuencias de tipo III eran siempre poco agresivos, mientras que los aislados inductores de SP en naranjo dulce y/o pomelo siempre contenían secuencias tipo II, en combinación con secuencias tipo I y/o III (Ayllón *et al.*, 2001). Esta es la primera vez que secuencias de tipo II se detectan solas en un aislado de CTV, lo que refuerza la asociación preliminar de este tipo de secuencia con los aislados agresivos inductores de SP (Ayllón *et al.*, 2001). Esta asociación no significa una implicación directa de la 5' UTR en la producción de síntomas, pero sugiere la co-evolución con otras regiones genómicas que pudieran ser responsables de la patogénesis. La no detección de secuencias 5' UTR tipo III en plantas infectadas con T318A es consistente con la detección de una variante de secuencia muy mayoritaria en otras regiones genómicas.

El aislado T318A fue obtenido a partir de un aislado no agresivo mediante transmisiones por distintos huéspedes en el invernadero, por lo que sólo se conocían sus efectos en algunas especies indicadoras obtenidas de semilla. Para conocer el daño potencial que T318A podría ocasionar en variedades comerciales, se inocularon por injerto combinaciones de naranjo dulce, mandarino, pomelo o zamboa sobre citrange Carrizo. La observación de SP en la mayoría de los naranjos dulces (Washington navel, Valencia y Salustiana) y que éste síntoma fuese intenso en el naranjo dulce Berna y el pomelo Star Ruby sugiere que el aislado T318A puede ser un riesgo potencial para la citricultura. Por otra parte, nuestros resultados indican que la zamboa Pink Pummelo es parcialmente resistente a este aislado ya que la detección del virus resultó imposible mediante técnicas serológicas y sólo se consiguió mediante RT-PCR convencional, lo que sugiere unas tasas de acumulación/replicación más bajas en este huésped. Este dato se confirma con técnicas más sensibles que permiten cuantificar la acumulación de CTV en el capítulo 2 de esta tesis.



## **CAPÍTULO 2**

### **DESARROLLO DE UN MÉTODO GENERAL PARA CUANTIFICAR EL RNA GENÓMICO DE CTV EN PLANTAS**



## 2.1. INTRODUCCIÓN

Durante años el diagnóstico de CTV se ha llevado a cabo mediante ensayos biológicos en invernadero que consisten en inocular por injerto plantas de semilla de especies indicadoras sensibles a CTV, principalmente de lima Mexicana (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing) (Roistacher y Moreno, 1991; Garnsey *et al.*, 1995). Sin embargo, este tipo de diagnóstico resulta lento y caro y no permite el análisis masivo de muestras, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos. Por otra parte, se han detectado aislados de tristeza que son asintomáticos incluso en las especies más sensibles (Bové *et al.*, 1988). Posteriormente a la purificación del virus y secuenciación de su gRNA, se han desarrollado procedimientos que permiten una detección rápida y sensible y una caracterización basada en reacciones serológicas con anticuerpos monoclonales y/o policlonales, hibridación molecular con sondas de DNA o RNA complementario al gRNA viral o diversos métodos de retrotranscripción y posterior amplificación por PCR (RT-PCR) (Cambra *et al.*, 1991; Hilf *et al.*, 2005; Narváez *et al.*, 2000; Niblett *et al.*, 2000; Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999; Permar *et al.*, 1990; Sambade *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 1986). Sin embargo, ninguno de estos métodos proporciona una estimación fiable de la acumulación del virus en tejidos infectados. La cuantificación viral puede ser importante para diferentes objetivos como la asociación potencial de la intensidad de los síntomas con la acumulación de variantes de secuencia específicas, la evaluación de la resistencia de variedades de cítricos o plantas transgénicas a diferentes aislados del virus, la valoración de los efectos de la carga viral en la transmisibilidad por vector, o la evaluación de la eficiencia de replicación de construcciones quiméricas del genoma de CTV en experimentos de genética inversa (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001).

Recientemente, las nuevas técnicas basadas en RT-PCR a tiempo real (“real-time RT-PCR”) están siendo aplicadas en estudios de expresión génica y/o regulación y en detección de patógenos presentes en diferentes tipos de muestras, y específicamente al diagnóstico de virus y su

cuantificación (Bustin, 2000, 2002; Freeman *et al.*, 1999; Heid *et al.*, 1996; Mackay *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2004; Whelan *et al.*, 2003). La elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad proporcionada por la RT-PCR a tiempo real, sin necesidad de un procesamiento de las muestras tras la PCR, son las razones principales que justifican su aplicación para la detección de patógenos. La posibilidad de obtener una estimación del número de copias de RNA diana presente en una muestra, hace de la RT-PCR a tiempo real una herramienta indispensable y poderosa para estudiar diferentes aspectos de la biología del virus. Los protocolos de RT-PCR a tiempo real más ampliamente utilizados se basan en dos químicas diferentes: en una de ellas, el DNA sintetizado es detectado directamente con el fluoróforo SYBR Green I que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario (Figura 1A), mientras que en la otra, el DNA hibrida con una sonda marcada con un fluorocromo donante (*reporter*) en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donante (Figura 1B). Para que esto ocurra, las moléculas donante y aceptoras deben estar espacialmente próximas y el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación del DNA la *Taq* DNA polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena en su acción de síntesis y su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo 5' de la sonda, separando el fluorocromo donante del aceptor, por lo que la fluorescencia del primero no se absorbe y puede ser medida (Bustin, 2000, 2002). El SYBR Green I produce resultados muy precisos en la cuantificación del producto, mientras que las sondas específicas de secuencia facilitan la identificación de mutaciones. La cantidad de diana puede ser determinada mediante una cuantificación absoluta o relativa. En la primera, el número de moléculas de ácido nucleico diana presentes en una muestra se determina utilizando una curva estándar construida a partir de la amplificación previa de concentraciones conocidas de la diana. En cambio, en la segunda, la cantidad relativa de ácidos nucleicos diana en diferentes muestras se compara con un control interno, aunque no se proporciona

ningún dato sobre el número real de copias diana presentes en cada muestra (Bustin, 2000; Freeman *et al.*, 1999; Mackay *et al.*, 2002; Rutledge y Coté, 2003).

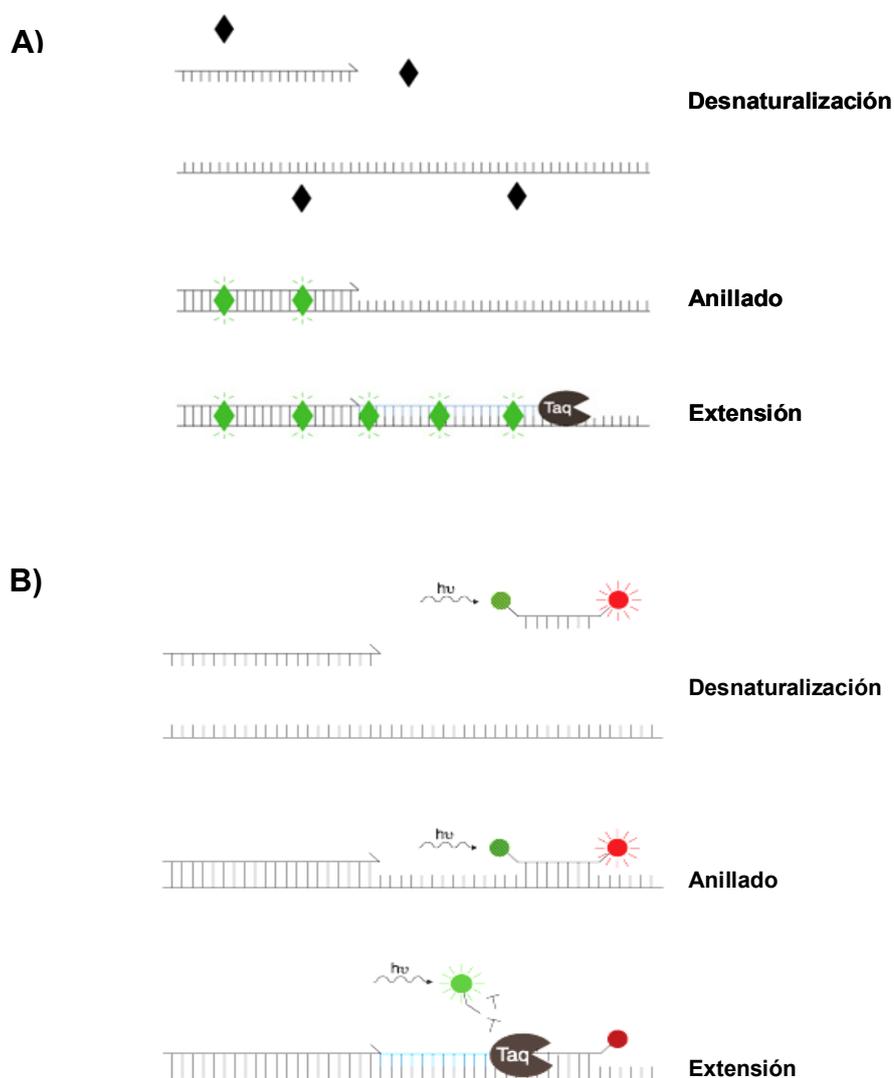


Figura 1. Representación gráfica de la detección del DNA sintetizado mediante PCR a tiempo real en los dos sistemas más utilizados: (A) detección inespecífica mediante fluorocromos intercalantes como el SYBR Green I (rombos) y (B) detección específica mediante sondas TaqMan con un fluorocromo emisor en su extremo 5' y otro aceptor en su extremo 3'. La actividad exonucleasa de la *Taq* DNA polimerasa digiere la sonda y separa los dos fluorocromos, lo que permite detectar y medir la fluorescencia del fluorocromo emisor.

Como se ha indicado en la Introducción general, la organización del gRNA de CTV consiste en 12 marcos de lectura abierta (ORFs) con dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' (Karasev *et al.*, 1995). Además del gRNA y de los sgRNAs 3' co-terminales (Hilf *et al.*, 1995), durante el ciclo de replicación se forman las siguientes especies de RNA viral de CTV: (i) un grupo de RNAs de cadena negativa complementarios al gRNA y a cada uno de los sgRNAs 3' co-terminales (Ayllón *et al.*, 2004; Gowda *et al.*, 2001, 2003a), (ii) dos especies abundantes de sgRNA 5' co-terminales de cadena positiva de unos 800 nt llamados LMT1 y LMT2 (Che *et al.*, 2001; Mawassi *et al.*, 1995a), y (iii) un grupo de 10-11 sgRNAs 5' co-terminales de gran tamaño, mucho menos abundantes que los sgRNAs 3' co-terminales o los LMTs (Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2001). Por consiguiente, las células infectadas con CTV contienen más de 30 especies de RNA viral diferentes. Además, los aislados de CTV a menudo replican y acumulan dRNAs, generados por eventos de recombinación no homóloga, que contienen los extremos 5' y 3' del gRNA pero carecen de una región central de tamaño variable (Ayllón *et al.*, 1999a; Mawassi *et al.*, 1995b; Yang *et al.*, 1997). La mayoría de los dRNAs descritos tienen un tamaño inferior a 5 kb, pero también se han caracterizado dos tipos de dRNAs grandes (10-12 kb) que pueden incluir las ORFs 1a y 1b, o las últimas 10 ORFs 3' terminales (Che *et al.*, 2002, 2003; Ruiz-Ruiz *et al.*, datos no publicados).

Como otros virus de RNA, los aislados de CTV están compuestos de una población de variantes de secuencia, a veces altamente divergentes, que son el resultado de: (i) la elevada tasa de error y ausencia de las funciones de corrección de errores en las RNA polimerasas implicadas en su replicación (Domingo y Holland, 1994), (ii) las repetidas inoculaciones de árboles de campo por pulgones portadores de variantes de secuencia diferentes (Ayllón *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2001), (iii) eventos de recombinación entre secuencias divergentes (Vives *et al.*, 1999, 2005) y (iv) diferentes presiones de selección (Sentandreu *et al.*, 2006).

Como consecuencia de todos estos factores, la detección y cuantificación de moléculas de gRNA de CTV mediante RT-PCR a tiempo real obliga a seleccionar cuidadosamente los cebadores para evitar en lo

posible: i) la amplificación de moldes no genómicos como los sgRNAs y dRNAs y ii) la no amplificación de algunas variantes de secuencia divergentes presentes en bajas proporciones.

La elevada sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y ausencia de procesamiento post-PCR de la RT-PCR a tiempo real justifican la utilidad de esta técnica. La cuantificación rápida y fiable de los viriones de CTV que se acumulan en células o tejidos infectados puede resultar una herramienta necesaria en el desarrollo posterior de un sistema genético eficiente para evaluar la eficacia biológica de distintas construcciones infecciosas. Por consiguiente, se estableció como objetivo de este capítulo el desarrollo de un protocolo de detección de CTV más sensible, mediante RT-PCR a tiempo real, que permitiese por primera vez la estima del número de copias de gRNA de CTV en extractos de RNAt de tejidos infectados.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Aislados de CTV

En este estudio se incluyeron ocho aislados de CTV bien caracterizados biológicamente y con propiedades patogénicas y orígenes diferentes: el aislado T36 de Florida (amablemente proporcionado por el doctor W.O. Dawson de la Universidad de Florida-CREC, Lake Alfred, Florida, EEUU), el aislado T388, que se obtuvo de una satsuma importada ilegalmente de Japón (Ballester-Olmos *et al.*, 1988) y los aislados de origen español T385, T32, T11, T305, T318 y T318A. Los aislados T11, T32, T305, T318 y T318A se obtuvieron a partir del aislado T385 mediante pases sucesivos por distintos huéspedes (Moreno *et al.*, 1991, 1993a, b; Sambade *et al.*, 2007). Todos los aislados, excepto T36, forman parte de la colección del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y se mantienen en plantas de naranjo dulce [*C. sinensis* (L.) Osb.] injertadas sobre patrones de citrange Carrizo [*C. sinensis* x *P. trifoliata* (L.) Raf.] en un recinto de malla antipulgón. En cambio, el aislado T36 fue inoculado en plantas de semilla de naranjo dulce Pineapple, naranjo amargo, pomelo Duncan, lima Mexicana y

*C. macrophylla* Webster, que se mantuvieron en un invernadero, con control de temperatura (18/26 °C noche/día). Tanto las plantas en el recinto de malla a prueba de insectos como las del invernadero se cultivaron en macetas con una mezcla artificial (50% turba y 50% arena) y un sistema de fertilización previamente optimizado (Arregui *et al.*, 1982).

También se incluyeron en este estudio árboles de campo de naranjo dulce var. Valencia y tangelo Nova [*C. clementina* Hort. ex Tan. × (*C. paradisi* × *C. tangerina* Hort. Tan.)] infectados con el aislado T385 y propagados en patrones de naranjo amargo y *C. macrophylla*, respectivamente.

Los aislados T385, T32 y T11 son poco agresivos y sólo inducen clorosis nervial muy tenue en hojas de lima Mexicana, mientras que el resto de aislados son más virulentos y causan síntomas de moderados a intensos en lima Mexicana, decaimiento de naranjo dulce propagado sobre naranjo amargo, SY (T36), y SP en pomelo y naranjo dulce (T318, T318A, T305, y T388) (Ballester-Olmos *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1993a, b; Rosner *et al.*, 1986; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006).

Los aislados P129 de *Citrus psorosis virus* (CPsV), el miembro tipo del género *Ophiovirus*, e IV-400 de *Citrus variegation virus* (CVV), género *Illavirus*, familia *Bromoviridae*, de la colección del IVIA se utilizaron como control para verificar la especificidad de los cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR.

### 2.2.2. Diseño de los cebadores

Se diseñaron tres parejas de cebadores (PM197D-PM198R, PM223D-PM224R y PM262D-PM263R) que anillan en secuencias conservadas de las ORFs 1b y 2 de CTV (Tabla 1 y Figura 2). Para ello, se utilizó el programa Primer Express y un alineamiento múltiple de todas las secuencias completas del gRNA de CTV disponibles en la base de datos y que corresponden a los aislados T36 y T30 de Florida (números de acceso en el GenBank U16034 y AF260651), VT de Israel (U56902), T318A y T385 de España (DQ151548 y Y18420), SY568 de California (AF001623), NUagA de

Japón (AB046398), Qaha de Egipto (AY340974) y un aislado Mexicano (DQ272579).

Tabla 1. Secuencia y posiciones de los cebadores generales utilizados en la detección del RNA genómico (gRNA) del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). D indica sentido directo y R reverso.

Cebador	Aislado <sup>a</sup>	Secuencia Nucleotídica (5'→3') <sup>b</sup>	Posición
PM197D	T385	CgCcAATTTGATCTGTGAACG	10690-10710 <sup>c</sup>
PM198R	T385	GCGAAaGCAAACATCtcGACTC	10854-10876 <sup>c</sup>
PM223D	T318A	CGcGTGgGTTATTTTTTCGTAC	10726-10746 <sup>d</sup>
PM224R	T318A	CGAAGGCAAACATCtcGACTC	10853-10873 <sup>d</sup>
PM262D	T36	CaCtAATTTGATCTGTGAACG	10716-10736 <sup>e</sup>
PM263R	T36	GCGAAgGCAAACATCctGACTC	10898-10919 <sup>e</sup>
PM261D	T385	<i>TTAATACGACTCACTATAGGCgCcAATTTGATCTGTGAACG</i>	10690-10710 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Aislado de CTV sobre el que se ha basado la secuencia del cebador correspondiente.

<sup>b</sup> Caracteres en negrita y minúscula indican desapareamientos en los cebadores entre aislados suaves y severos o entre T36 y los otros aislados respectivamente. Caracteres en cursiva indican la secuencia del promotor T7.

<sup>c</sup> Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T385 depositada en la base de datos (GeneBank n° de acceso [Y18420](#)).

<sup>d</sup> Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T318A depositada en la base de datos (GeneBank n° de acceso [DQ151548](#)).

<sup>e</sup> Posiciones nucleotídicas relativas a la secuencia genómica de T36 depositada en la base de datos (GeneBank n° de acceso [U16304](#)).

La secuencia nucleotídica de la pareja de cebadores PM197D-PM198R es idéntica a la de los aislados no agresivos T385 y T30, pero tiene un desapareamiento en el cebador PM198R con la secuencia de los aislados agresivos NUagA, T318A, SY568 y VT, y dos y tres desapareamientos en PM197D y PM198R, respectivamente, con la de los aislados T36, Qaha y Mexicano.



Figura 2. Alineamiento múltiple de ocho secuencias en formato de DNA de las regiones 3' terminal de la ORF 1b y 5' terminal de la ORF 2 correspondientes a los aislados de CTV de los que se dispone la secuencia completa de su gRNA en la base de datos (T36 y T30 de Florida, VT de Israel, T318A y T385 de España, SY568R de California, NUagA de Japón y Qaha de Egipto). Se destaca en distintos colores la secuencia nucleotídica de las tres parejas de cebadores diseñadas para ensayar la RT-PCR a tiempo real: PM197D-PM198R (rojo), PM223D-PM224R (verde) y PM262D-PM263R (amarillo). También se indica la posición de los tripletes TGA y ATG que actúan como codones de parada o inicio de las ORFs 1b y 2.

La pareja de iniciadores PM223D-PM224R tiene la misma secuencia nucleotídica que los aislados agresivos pero tiene un desapareamiento en el iniciador PM224R con la secuencia de los aislados no agresivos T385 y T30, y dos desapareamientos en cada iniciador con los aislados T36, Qaha y Mexicano. La tercera pareja de iniciadores, PM262D-PM263R, se diseñó basándose en la secuencia de los aislados T36, Qaha y Mexicano (Tabla 1 y Figura 2).

### 2.2.3. Extracción de RNA

Se extrajo RNA total (RNAt) a partir de 1 a 3 g de tejido fresco de cítrico (corteza joven, hoja, raíces o albedo de fruto) utilizando dos métodos diferentes: i) usando el estuche comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) o ii) con un protocolo estándar que consiste en dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguidas de una precipitación con cloruro de litio 8.4 M (Ancillo *et al.*, 2007). Los extractos de RNAt se resuspendieron en 25  $\mu$ l de agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las concentraciones del RNAt tratado con DNasa se ajustaron aproximadamente a 10 ng/ $\mu$ l y se cuantificaron por duplicado con el Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen Assay Kit (Invitrogen). Las alícuotas se guardaron a -80°C.

### 2.2.4. Curva estándar

Para poder determinar el número absoluto de copias de gRNA en extractos vegetales de RNAt, se sintetizaron *in vitro* transcritos del RNA diana de la región seleccionada y se utilizaron diluciones seriadas de los mismos en ensayos de RT-PCR a tiempo real para generar curvas estándar. El cDNA utilizado como molde para la transcripción *in vitro* se obtuvo mediante RT-PCR usando la pareja de cebadores PM261D-PM198R y extractos de RNAt de corteza joven de naranjo dulce infectado con los aislados de CTV T305 o T36. El cebador PM261D es una versión modificada del iniciador PM197D que incluye la secuencia del promotor T7 en su

extremo 5' (Tabla 1). A partir del producto amplificado por PCR se sintetizaron directamente transcritos *in vitro* de RNA de cadena positiva utilizando la T7 RNA polimerasa (New England BioLabs) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los transcritos se purificaron con el estuche comercial RNaid w/Spin (Q-BIO gene) y se trataron dos veces con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). La concentración en cada preparación se estimó dos veces con el Quant-iT™ RiboGreen Assay Kit (Invitrogen) y posteriormente se prepararon diluciones seriadas (1/10) en extractos de RNA<sub>t</sub> de cítrico sano (10 ng/μl) que contenían de 10<sup>10</sup> a 10<sup>1</sup> copias de RNA. Las alícuotas de las diluciones seriadas se guardaron hasta su uso a -80°C. La concentración del transcrito de RNA (pmol) en cada dilución se calculó con la fórmula  $\mu\text{g de transcrito de RNA} \times (10^6 \text{ pg}/1\mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol}/340 \text{ pg}) \times (1/\text{número de bases del transcrito})$ , y el número de copias de RNA utilizando este valor de concentración y la constante de Avogadro.

Se llevaron a cabo en paralelo reacciones de RT-PCR a tiempo real con y sin retrotranscriptasa para asegurarse de la ausencia de molde de DNA en las preparaciones de transcritos. Se construyeron curvas estándar para los aislados T305 y T36 representando los valores del ciclo umbral (*Ct*) de cuatro ensayos independientes con dos réplicas por dilución con respecto al logaritmo de la concentración de RNA. La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la pendiente de la correspondiente curva utilizando la fórmula  $10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})}$  o la misma fórmula x 100 (cuando se da el valor como un porcentaje).

### 2.2.5. RT-PCR a tiempo real

La reacción de RT-PCR a tiempo real se desarrolló en la plataforma LightCycler® de Roche utilizando capilares de vidrio de 20 μl, y 10 μl de una mezcla que contenía: 2 μl de LightCycler® FastStart DNA MASTER<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche), 4.7 μl de agua libre de RNasas, 0.05 μl de retrotranscriptasa RT MultiScribe (Applied Biosystems), 0.05 μl de Inhibidor de RNasas (Applied Biosystems), 0.3 μM de cada cebador y 2 μl del extracto de RNA<sub>t</sub> (~10 ng RNA/μl). Se incluyeron en cada ronda de RT-PCR

controles como RNAt de cítrico sano, agua en lugar de extracto de RNAt, y por lo menos dos diluciones de transcritos de RNA de la curva estándar. Cada muestra problema de planta se analizó en duplicado en tres ensayos independientes de RT-PCR a tiempo real.

El programa térmico incluyó una etapa de retrotranscripción a 48°C durante 30 min, una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min y 40, 45 o 50 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 60°C y 15 s a 72°C. Se añadió una cuarta etapa en cada ciclo de 2 s a 82°C después de la extensión para obtener medidas de fluorescencia que minimizasen la interferencia de dímeros de cebadores u otros productos de amplificación inespecíficos. La síntesis de productos de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler y mediante separación de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% y posterior tinción con bromuro de etidio.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Optimización del protocolo

Para estimar el número de copias de gRNA en tejidos infectados por CTV los cebadores se diseñaron sobre secuencias conservadas localizadas en las regiones 3' y 5' terminales de las ORFs 1b y 2 respectivamente, evitando así la amplificación no deseada de los sgRNAs más abundantes (sgRNAs 3' co-terminales y 5' co-terminales LMTs 1 y 2) y los dRNAs (Ayllón *et al.*, 1999a; Che *et al.*, 2002, 2003; Guerri *et al.*, 1991; Mawassi *et al.*, 1995b; Yang *et al.*, 1997 y nuestros resultados no publicados) (Figura 3). La pareja de cebadores PM197D-PM198R (Tabla 1) permitió obtener la detección más sensible para todos los aislados de CTV en cualquiera de los tejidos de cítricos, proporcionando los valores de *Ct* más bajos. Inesperadamente, la amplificación del aislado T36, con la pareja de cebadores PM262D y PM263R, que no tenían ningún desapareamiento con la secuencia de T36, fue menos eficiente y dio valores de *Ct* más altos que la pareja de cebadores general PM197D-PM198R. La detección de T36 con

la combinación de cebadores PM197D y PM263R fue similar a la obtenida con la pareja PM197D-PM198R. Por consiguiente, para obtener datos más uniformes, se utilizó sólo la pareja de cebadores PM197D-PM198R en este estudio.

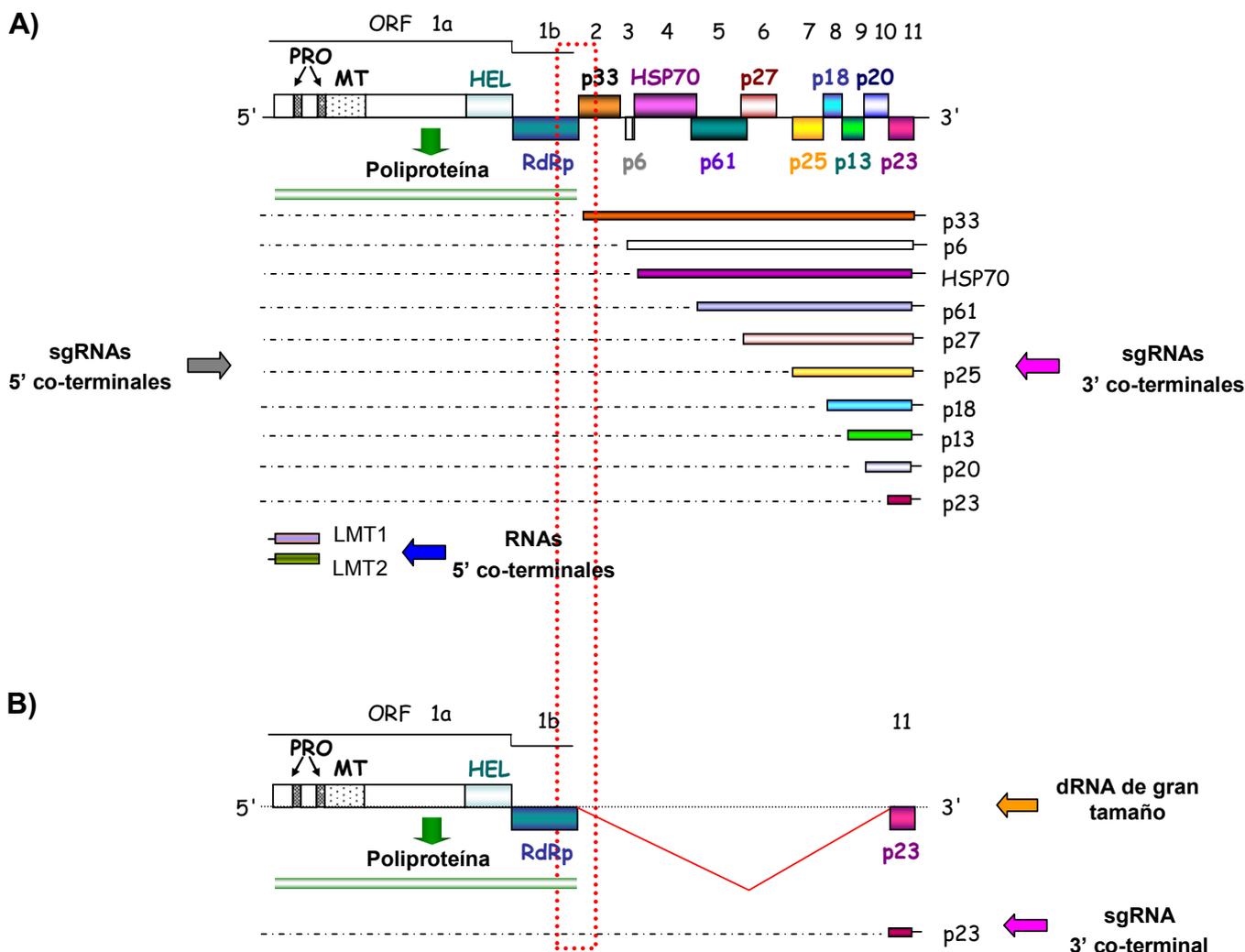


Figura 3. Representación gráfica de la estrategia seguida en el diseño de la pareja de cebadores generales PM197D-PM198R utilizados para la detección y cuantificación de gRNA de CTV. (A) Esquema del genoma de CTV y de los RNAs subgenómicos que se producen en su replicación. Los cebadores anillan en secuencias conservadas de las ORFs 1b y 2 (región acotada por la línea de punteado rojo) y permiten la amplificación del gRNA excluyendo la mayoría de sgRNAs. (B) Esquema de la generación de dRNAs de gran tamaño que son excluidos en la amplificación.

La detección más sensible de CTV mediante RT-PCR a tiempo real se obtuvo con las preparaciones de RNA<sub>t</sub> extraídas con el protocolo de extracción de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por consiguiente este fue el protocolo aplicado en experimentos posteriores. Las condiciones térmicas que proporcionaron la detección más sensible de CTV consistieron en 45 ciclos de amplificación que incluían un cuarto segmento de 2 s a 82°C para medir la intensidad de la fluorescencia. Este segmento adicional eliminó la interferencia de dímeros de cebadores observada en los ensayos previos cuando se utilizaba un programa térmico estándar en tres etapas.

El protocolo optimizado de RT-PCR a tiempo real permitió la detección de CTV en plantas de cítricos de diferentes cultivares, mantenidas en el invernadero o cultivadas en campo e infectadas con aislados de orígenes y características patogénicas diferentes (Tablas 2, 3, 4 y 5). La primera derivada de la curva de fusión proporcionada por el programa del LightCycler ((d/dT) Fluorescencia (530)) mostró en todos los casos un pico único (Figura 4A) confirmando de este modo la ausencia de dímeros de cebadores y la amplificación de productos no deseados. Los análisis de la curva de fusión mostraron dos grupos de aislados de CTV que diferían en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de sus productos de amplificación por RT-PCR. De forma sorprendente, se observó que los valores de  $T_m$  obtenidos a partir de los aislados más agresivos (T36, T305, T318, T318A y T388) oscilaban de 84.90 a 85.08°C, mientras que los obtenidos a partir de los aislados no agresivos (T11, T32 y T385) oscilaron de 83.49 a 83.58°C (Figura 4A). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en todos los casos se observó una banda única del tamaño esperado sin formación de dímeros de cebadores (Figura 4B). Las secuencias de T36, Qaha y el aislado Mexicano tienen una inserción de 18 pb en la región que abarcan los cebadores seleccionados, por lo que las muestras infectadas con aislados de tipo T36 produjeron un producto de amplificación de 204 bp en lugar del producto de 186 bp que se obtiene a partir de otros aislados (Figura 4B).

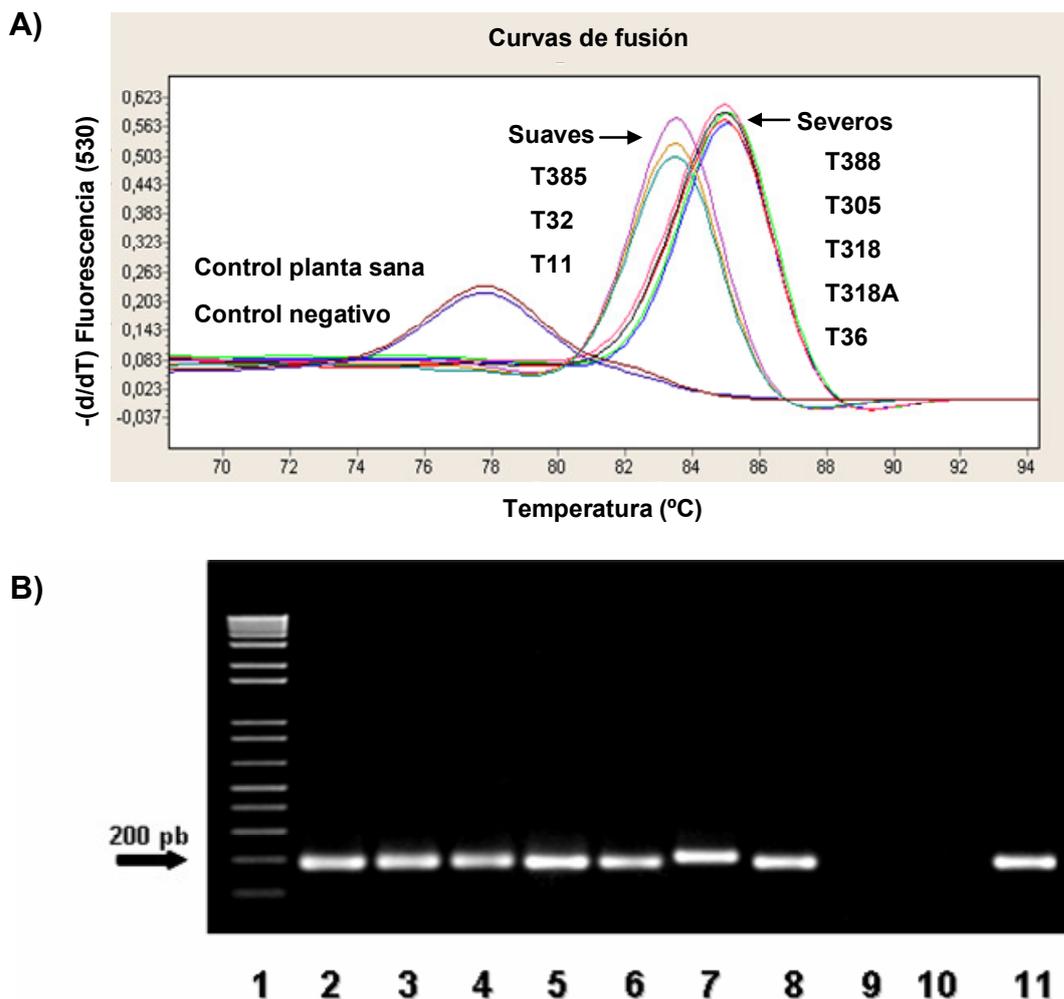


Figura 4. Análisis de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores PM197D-PM198R a partir de RNAt de plantas de naranjo dulce infectadas con ocho aislados de CTV diferentes (cinco agresivos y tres no agresivos). A) Representación gráfica de la primera derivada de las curvas de fusión en función de la temperatura que separa los aislados no agresivos (pico izquierdo) de los agresivos (pico derecho) por su temperatura de fusión. Los controles negativos incluyen extractos de RNAt de planta sana o de planta infectada sin utilizar retrotranscriptasa. B) Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación finales obtenidos. Los carriles 2-8 y 11 corresponden a plantas infectadas con los aislados T385, T32, T11, T388, T305, T36, T318A y T318, respectivamente, y los carriles 9 y 10 a extracto de planta sana o de planta infectada con CTV sin añadir retrotranscriptasa. El aislado T36 tiene una inserción de 18 pb en la región que abarcan los cebadores. Carril 1: Marcador de DNA (1 kb plus ladder DNA, Invitrogen).

Extractos de RNA<sub>t</sub> procedentes de plantas de cítricos infectadas con CPsV o CVV no produjeron ningún producto de amplificación y el perfil de sus curvas de fusión no difirió del obtenido a partir de extractos de plantas sanas. De forma similar, no se observó amplificación con ninguno de los controles negativos que incluían extractos de planta sana, controles sin muestra (con agua) o sin retrotranscriptasa, confirmándose así la especificidad del ensayo.

### **2.3.2. Estimación del número de copias de RNA genómico de CTV**

Para calcular el número de copias de gRNA se prepararon dos curvas estándar utilizando diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA de los aislados T36 o T305, que cubrían el intervalo de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias, para considerar los dos tamaños de amplicón en la región seleccionada (Figura 5). La curva estándar obtenida a partir de T36 se utilizó únicamente para cuantificar este aislado, mientras que la segunda se aplicó al resto de aislados. Ambas cubrían un amplio intervalo dinámico (6-7 unidades logarítmicas de concentración) y mostraron una fuerte correlación lineal con coeficientes de correlación de 0.9969 y 0.9992 (Figura 5), respectivamente, y eficiencias de amplificación superiores al 90%. También se obtuvieron curvas de amplificación a partir de diluciones seriadas de RNA<sub>t</sub> de plantas de cítricos infectadas con diferentes aislados de CTV, y sus eficiencias de amplificación fueron similares a las de las dos curvas anteriores. El protocolo de RT-PCR a tiempo real permitió la detección consistente y reproducible de al menos 100 copias de gRNA en extractos de planta.

Este protocolo y la curva estándar desarrollada con los transcritos de T305, se utilizaron para determinar el número de copias de gRNA en extractos de RNA<sub>t</sub> obtenidos a partir de corteza de naranjo dulce infectada con siete aislados de CTV de la colección del IVIA (Tabla 2). Los valores medios de *C<sub>t</sub>* estuvieron en todos los casos dentro del rango dinámico de la curva estándar y oscilaron entre  $16.30 \pm 0.09$  y  $19.70 \pm 0.05$ . Los valores de los coeficientes de variación (CV%) intra- e inter-ensayo fueron muy bajos y

oscilaron de 0 a 1.87% y de 0.24 a 1.65%, respectivamente, indicando la buena reproducibilidad de la técnica. El número estimado de copias de gRNA para los diferentes aislados osciló de  $2.41 \times 10^5 \pm 3.79 \times 10^3$  a  $2.60 \times 10^6 \pm 8.38 \times 10^4$  por nanogramo de RNA<sub>t</sub>, siendo los aislados T318A y T305 los que mostraron los niveles de acumulación más altos y T388 y T11 los más bajos (Tabla 2).

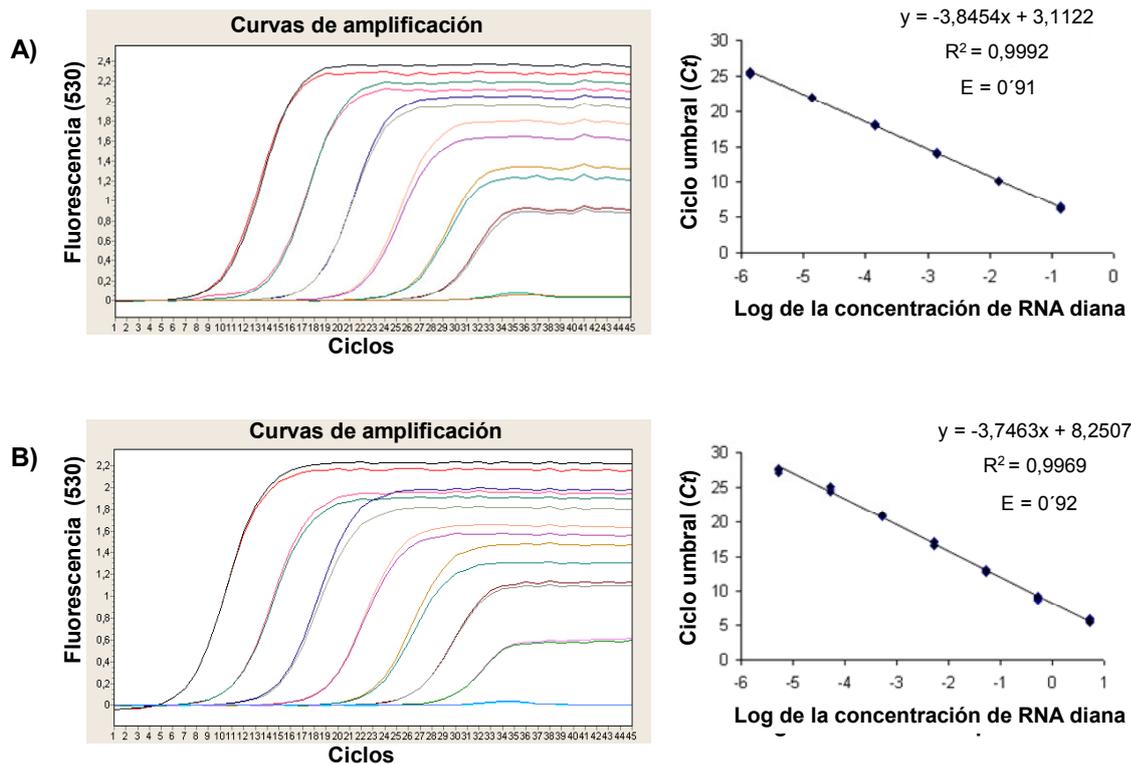


Figura 5. Curvas de amplificación de RT-PCR a tiempo real utilizando diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA de T36 (A) y T318A (B) sintetizados “*in vitro*” a partir de productos de RT-PCR amplificados con PM197D-PM198R. Cada dilución corresponde a un número de copias de RNA diana que oscila de  $10^8$  a  $10^3$  para T36 (A) y de  $10^9$  a  $10^3$  para T305 (B). El eje de las abcisas indica el número del ciclo de PCR mientras que el eje de las ordenadas indica la intensidad de la fluorescencia. Se obtuvieron curvas estándar mediante regresión lineal representando los valores del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración inicial de RNA diana, y las eficiencias de amplificación (E) se calcularon con la siguiente fórmula:  $10E - (-1 / \text{pendiente de la curva estándar})$ .

Tabla 2. Detección y cuantificación absoluta de copias de gRNA de CTV en la corteza de plantas de naranjo dulce infectadas con diferentes aislados de CTV mediante RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.

Aislado	Media Ct $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Número de copias (X $\pm$ S.E.) <sup>c</sup>
T388	19.70 $\pm$ 0.05	0.24	2.41 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 3.79 x 10 <sup>3</sup>
T305	16.30 $\pm$ 0.09	0.55	2.60 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 8.38 x 10 <sup>4</sup>
T318	18.10 $\pm$ 0.12	0.7	7.24 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 3.22 x 10 <sup>4</sup>
T318A	16.60 $\pm$ 0.20	1.22	2.25 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 1.55 x 10 <sup>5</sup>
T385	17.20 $\pm$ 0.15	0.88	1.04 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 5.58 x 10 <sup>4</sup>
T32	17.90 $\pm$ 0.29	1.65	6.46 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 6.29 x 10 <sup>4</sup>
T11	18.80 $\pm$ 0.20	1.06	3.70 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 2.63 x 10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos.

<sup>c</sup> Media del número de copias (X) por nanogramo de RNA<sub>t</sub> y error estándar (S.E.).

### 2.3.3. Acumulación diferencial de CTV en diferentes huéspedes

El efecto de la especie o combinación variedad/patrón en la acumulación de gRNA de CTV se analizó mediante RT-PCR a tiempo real en dos sistemas diferentes. En uno de ellos el aislado T36 se inoculó en plantas de semilla de naranjo dulce Pineapple, lima Mexicana, pomelo Duncan, Citrus macrophylla y naranjo amargo y se estimó la carga viral en la corteza utilizando la curva estándar desarrollada para este aislado. En el otro, combinaciones comerciales de naranjo dulce (Washington navel, Valencia, Berna y Salustiana), mandarina (Clementino de Nules), pomelo (Star Ruby) y zamboa (Pink pummelo) propagadas sobre citrange Carrizo e inoculadas por injerto con el aislado agresivo T318A, como parte de su caracterización biológica (Ver capítulo 1, apartado 1.3.4.), se analizaron en tres brotaciones sucesivas utilizando como control plantas similares no

inoculadas (Figura 6). En este caso la cuantificación se hizo con la curva estándar preparada con transcritos del aislado T305.

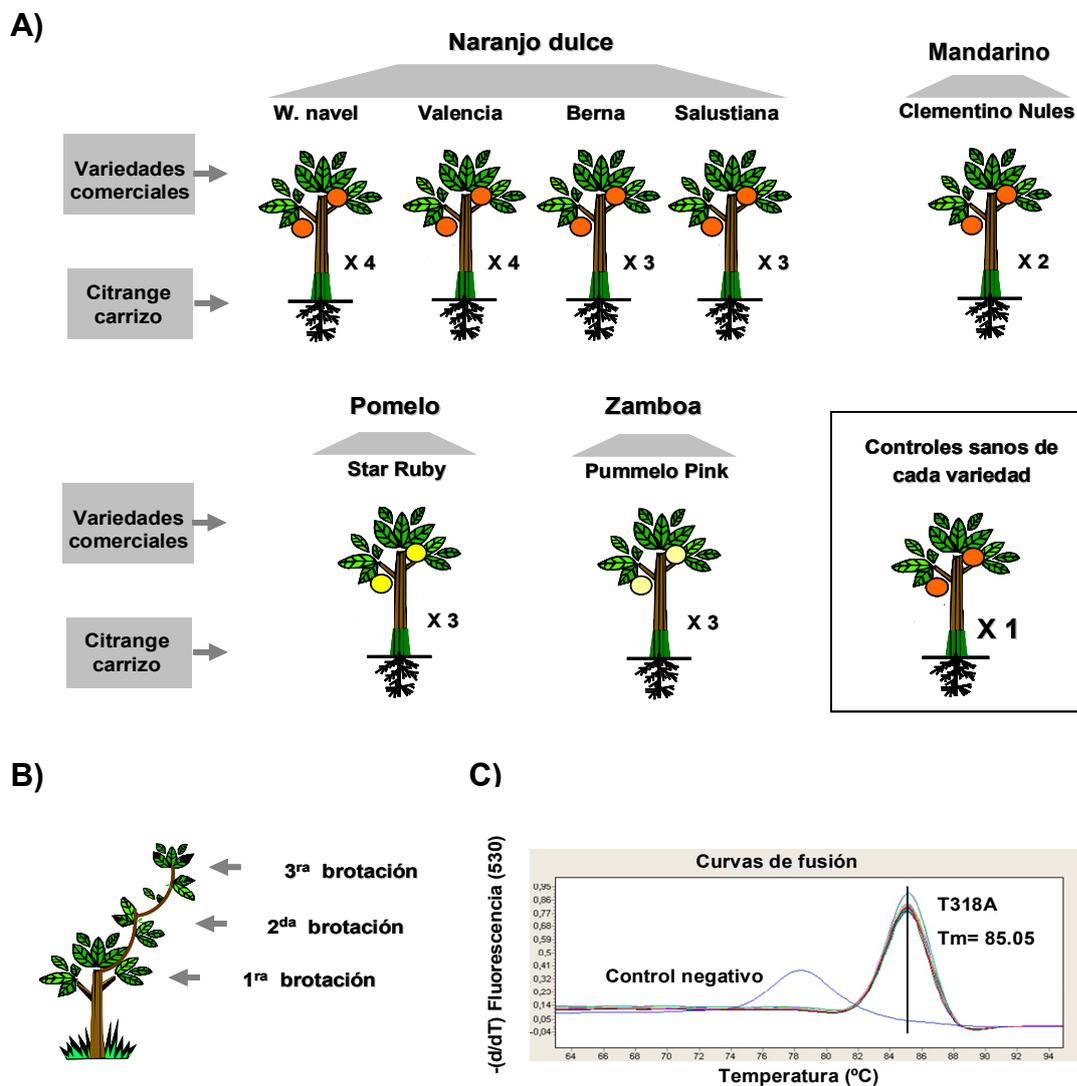


Figura 6. A) Representación gráfica de la inoculación del aislado T318A por injerto de variedades comerciales de naranjo dulce (Washington navel, Valencia, Berna y Salustiana), mandarino (Clementino Nules), pomelo (Star Ruby) y zamboa (Pink pummelo) propagadas sobre citrange Carrizo con el aislado T318A. B) Representación gráfica de la recogida de material vegetal a lo largo de las tres primeras brotaciones. C) Curvas de fusión de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I con la pareja de cebadores PM197D-PM198R y RNAt de cada una de las plantas inoculadas.

Los valores de  $C_t$  obtenidos para T36 en los diferentes huéspedes oscilaron de  $18.80 \pm 0.21$  a  $21.20 \pm 0.20$ , con valores de CV% intra- e inter-ensayo de 0.63 a 1.13%, respectivamente (Tabla 3). El número estimado de copias de gRNA fue de  $1.62 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^3$  a  $2.28 \times 10^4 \pm 1.68 \times 10^3$  por nanogramo de RNAt para naranjo dulce, lima, pomelo y *C. macrophylla*, pero sólo de  $5.03 \times 10^3 \pm 3.42 \times 10^2$  por nanogramo de RNAt para naranjo amargo (Tabla 3 y Figura 7). Todos los productos de amplificación mostraron un único pico en la curva de disociación, con valores de  $T_m$  característicos de los aislados agresivos, indicando la especificidad de la amplificación (Figura 7).

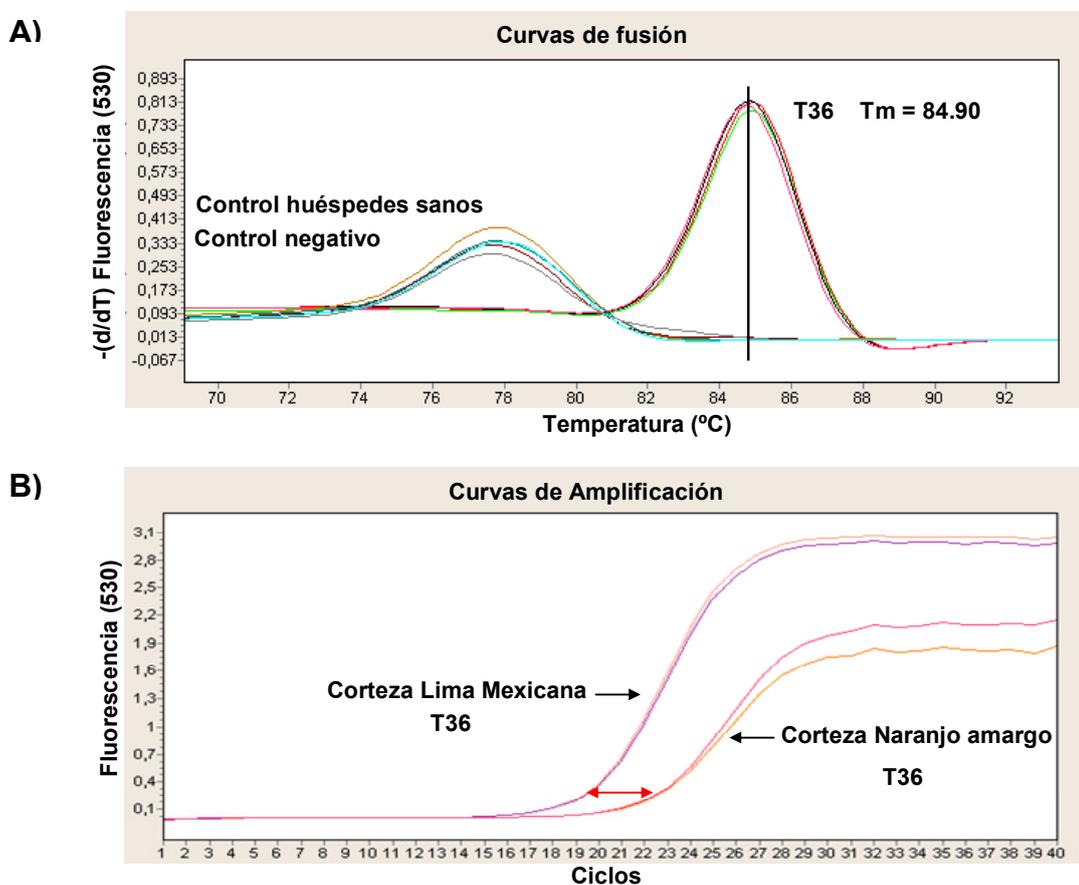


Figura 7. A) Análisis de las curvas de fusión de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I con la pareja de cebadores PM197D-PM198R y preparaciones de RNAt de corteza infectada con el aislado T36 en diferentes especies cítricas. Los controles negativos incluyen extractos de RNAt de los diferentes huéspedes sanos. B) Curvas de amplificación obtenidas con RNAt de corteza infectada con T36 de Lima Mexicana y naranjo amargo.

Tabla 3. Detección y cuantificación absoluta de copias de gRNA de CTV en la corteza de varias especies de cítricos infectadas con el aislado T36 mediante RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.

Aislado	Huésped	Ct ± S.D. <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Número de copias (X ± S.E.) <sup>c</sup>
T36	Naranja dulce	19.70 ± 0.18	0.92	1.62 x 10 <sup>4</sup> ± 1.07 x 10 <sup>3</sup>
	Naranja amargo	21.20 ± 0.20	0.96	5.03 x 10 <sup>3</sup> ± 3.42 x 10 <sup>2</sup>
	Lima Mexicana	18.80 ± 0.21	1.13	2.28 x 10 <sup>4</sup> ± 1.68 x 10 <sup>3</sup>
	Pomelo	19.50 ± 0.21	1.09	1.76 x 10 <sup>4</sup> ± 1.29 x 10 <sup>3</sup>
	Citrus macrophylla	19.30 ± 0.12	0.63	2.03 x 10 <sup>4</sup> ± 7.21 x 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos.

<sup>c</sup> Media del número de copias (X) por nanogramo de RNAt y error estándar (S.E.).

Los valores de Ct obtenidos a partir de las diferentes combinaciones inoculadas con T318A en las distintas brotaciones se resumen en la Tabla 4. La acumulación de gRNA en la primera brotación (otoño) osciló entre 4.02 x 10<sup>5</sup> y 9.45 x 10<sup>6</sup> copias por nanogramo de RNAt para las plantas de naranja dulce, 7.40 x 10<sup>5</sup> y 7.78 x 10<sup>5</sup> para las de clementino, 2.02 x 10<sup>5</sup> y 3.63 x 10<sup>5</sup> para las de pomelo y 1.67 x 10<sup>3</sup> y 4.98 x 10<sup>3</sup> para las de zamboa. El número de copias estimado en la segunda brotación (invierno) fue algo más reducido en todas las combinaciones, variando entre 6.38 x 10<sup>4</sup> y 1.44 x 10<sup>6</sup> por nanogramo de RNAt para las plantas de naranja dulce, 1.96 x 10<sup>5</sup> y 3.58 x 10<sup>5</sup> para las de clementino, 2.73 x 10<sup>4</sup> y 1.14 x 10<sup>5</sup> para las de pomelo y 4.17 x 10<sup>2</sup> y 6.75 x 10<sup>2</sup> para las de zamboa. En la tercera brotación (primavera) se observó un incremento en la acumulación viral en comparación con la segunda, con números de copias que oscilaban entre 3.30 x 10<sup>5</sup> y 2.89 x 10<sup>6</sup> por nanogramo de RNAt para los naranjos dulces, 2.43 x 10<sup>5</sup> y 6.23 x 10<sup>5</sup> para los clementinos, 2.03 x 10<sup>5</sup> y 2.67 x 10<sup>6</sup> para los pomelos y 5.43 x 10<sup>2</sup> y 2.99 x 10<sup>3</sup> para las zamboas (Tabla 4 y Figura 8). En todas las variedades y en las tres brotaciones los valores de CV% intra- e inter-ensayo fueron siempre inferiores al 2%.

Tabla 4. Detección y cuantificación absoluta de copias de gRNA de CTV en la corteza de varias combinaciones comerciales de naranjo dulce (Washington navel, Valencia, Berna y Salustiana), mandarino (Clementino de Nules), pomelo (Star Ruby) y zamboa (Pink pummelo) propagadas sobre citrange Carrizo e inoculadas por injerto con el aislado agresivo T318A mediante RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.

Huésped	Variedad	1 <sup>ra</sup> Brotación		2 <sup>da</sup> Brotación		3 <sup>ra</sup> Brotación	
		Ct ± S.D. <sup>a</sup>	Nº de copias <sup>b</sup>	Ct ± S.D. <sup>a</sup>	Nº de copias <sup>b</sup>	Ct ± S.D. <sup>a</sup>	Nº de copias <sup>b</sup>
Naranjo dulce	Valencia 1	18.13 ± 0.10	8,54 x 10 <sup>5</sup>	20.31 ± 0.06	2,63 x 10 <sup>5</sup>	19.03 ± 0.03	5,16 x 10 <sup>5</sup>
	Valencia 2	16.92 ± 0.41	2,52 x 10 <sup>6</sup>	22.31 ± 0.19	6,38 x 10 <sup>4</sup>	19.15 ± 0.13	6,67 x 10 <sup>5</sup>
	Valencia 3	17.60 ± 0.18	1,48 x 10 <sup>6</sup>	20.02 ± 0.03	2,71 x 10 <sup>5</sup>	19.09 ± 0.12	6,85 x 10 <sup>5</sup>
	Valencia 4	16.90 ± 0.05	3,00 x 10 <sup>6</sup>	20.11 ± 0.09	2,27 x 10 <sup>5</sup>	18.69 ± 0.28	5,97 x 10 <sup>5</sup>
	Navel 1	19.84 ± 0.11	4,02 x 10 <sup>5</sup>	20.25 ± 0.06	3,34 x 10 <sup>5</sup>	19.64 ± 0.02	5,98 x 10 <sup>5</sup>
	Navel 2	14.90 ± 0.07	9,45 x 10 <sup>6</sup>	18.93 ± 0.14	5,07 x 10 <sup>5</sup>	18.61 ± 0.12	9,19 x 10 <sup>5</sup>
	Navel 3	18.10 ± 0.02	1,55 x 10 <sup>6</sup>	19.32 ± 0.33	5,33 x 10 <sup>5</sup>	20.56 ± 0.05	5,15 x 10 <sup>5</sup>
	Navel 4	17.60 ± 0.20	2,10 x 10 <sup>6</sup>	19.51 ± 0.04	4,98 x 10 <sup>5</sup>	16.84 ± 0.12	2,89 x 10 <sup>6</sup>
	Salustiana 1	16.85 ± 0.09	3,15 x 10 <sup>6</sup>	18.54 ± 0.02	9,24 x 10 <sup>5</sup>	18.36 ± 0.18	1,37 x 10 <sup>6</sup>
	Salustiana 2	17.23 ± 0.20	1,82 x 10 <sup>6</sup>	19.49 ± 0.07	4,14 x 10 <sup>5</sup>	18.49 ± 0.07	1,44 x 10 <sup>6</sup>
	Salustiana 3	17.43 ± 0.09	2,26 x 10 <sup>6</sup>	18.99 ± 0.32	6,85 x 10 <sup>5</sup>	19.16 ± 0.14	4,87 x 10 <sup>5</sup>
	Berna 1	16.45 ± 0.26	4,17 x 10 <sup>6</sup>	18.84 ± 0.13	7,30 x 10 <sup>5</sup>	19.68 ± 0.22	3,30 x 10 <sup>5</sup>
	Berna 2	15.98 ± 0.27	6,67 x 10 <sup>6</sup>	17.69 ± 0.06	1,44 x 10 <sup>6</sup>	17.03 ± 0.12	2,13 x 10 <sup>6</sup>
	Berna 2	16.23 ± 0.27	7,54 x 10 <sup>6</sup>	17.89 ± 0.02	1,30 x 10 <sup>5</sup>	17.11 ± 0.13	2,31 x 10 <sup>6</sup>
Mandarino	Nules 1	18.79 ± 0.17	7,40 x 10 <sup>5</sup>	21.20 ± 0.04	1,96 x 10 <sup>5</sup>	20.80 ± 0.01	2,43 x 10 <sup>5</sup>
	Nules 2	18.84 ± 0.04	7,78 x 10 <sup>5</sup>	20.89 ± 0.14	3,58 x 10 <sup>5</sup>	18.92 ± 0.02	6,23 x 10 <sup>5</sup>
Pomelo	Star Ruby 1	20.72 ± 0.10	2,02 x 10 <sup>5</sup>	23.70 ± 1.16	3,36 x 10 <sup>4</sup>	20.72 ± 0.03	3,24 x 10 <sup>5</sup>
	Star Ruby 2	20.06 ± 0.12	3,63 x 10 <sup>5</sup>	24.79 ± 0.13	2,73 x 10 <sup>4</sup>	16.72 ± 0.04	2,67 x 10 <sup>6</sup>
	Star Ruby 3	20.62 ± 0.21	3,20 x 10 <sup>5</sup>	22.12 ± 0.01	1,14 x 10 <sup>5</sup>	20.94 ± 0.07	2,03 x 10 <sup>5</sup>
	Star Ruby 4	20.21 ± 0.12	2,82 x 10 <sup>5</sup>	22.12 ± 0.08	1,08 x 10 <sup>5</sup>	17.95 ± 0.14	1,22 x 10 <sup>6</sup>
Zamboa	Pink pummelo 1	27.16 ± 0.10	4,98 x 10 <sup>3</sup>	30.95 ± 0.46	4,25 x 10 <sup>2</sup>	31.19 ± 0.24	5,43 x 10 <sup>2</sup>
	Pink pummelo 2	28.96 ± 0.02	1,67 x 10 <sup>3</sup>	30.63 ± 0.37	4,17 x 10 <sup>2</sup>	30.34 ± 0.32	8,35 x 10 <sup>2</sup>
	Pink pummelo 3	28.85 ± 0.04	1,85 x 10 <sup>3</sup>	30.73 ± 0.35	6,75 x 10 <sup>2</sup>	27.84 ± 0.14	2,99 x 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Media del número de copias (X) de gRNA por nanogramo de RNAt.

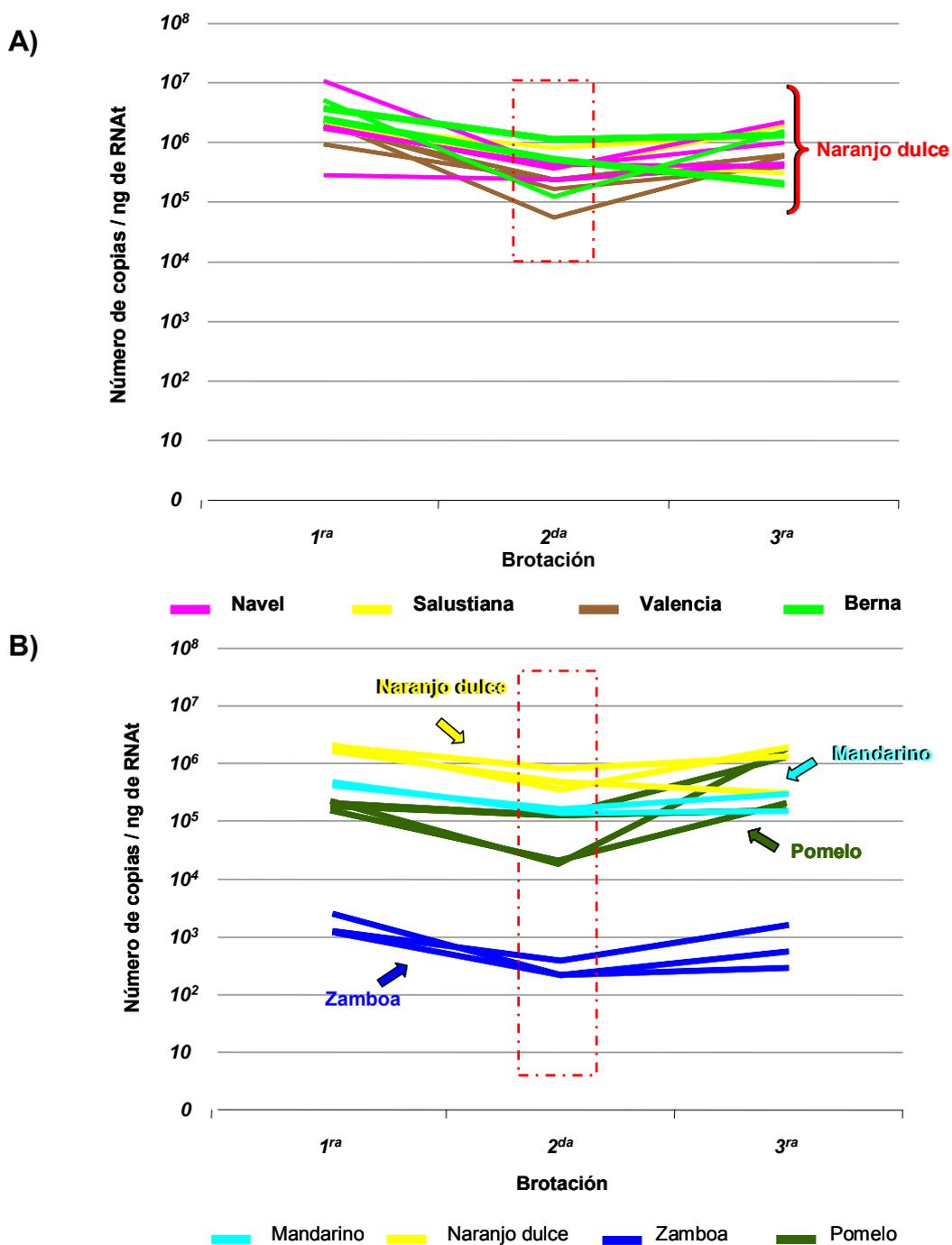


Figura 8. Acumulación diferencial del gRNA del aislado T318A en diferentes variedades comerciales de cítricos a lo largo de las tres primeras brotaciones. A) Acumulación en variedades de naranjo dulce (Washington navel, Valencia, Berna y Salustiana) y B) acumulación diferencial de T318A en naranjo dulce (Salustiana), mandarino (Clementino Nules), pomelo (Star Ruby) y zamboa (Pink pummelo). En el eje abscisas se indican las 3 brotaciones analizadas y en el eje de ordenadas el número de copias/ng de RNAT. Se indican con distintos colores las diferentes variedades comerciales y con punteado rojo la disminución del título viral observado para todas ellas en la segunda brotación.

### 2.3.4. Acumulación de CTV en diferentes tejidos en árboles de campo

Para evaluar la acumulación de CTV en diferentes tejidos de árboles de campo, se recogieron muestras de corteza joven, hojas, albedo de fruto y raíces a partir de árboles de naranjo dulce var. Valencia y tangelo Nova propagados sobre patrones de naranjo amargo y *C. macrophylla*, respectivamente, e infectados con el aislado suave T385. Esta parcela de campo estaba cubierta con una malla antipulgón para prevenir la contaminación natural de otros genotipos de CTV mediante la inoculación por pulgones. El análisis mediante RT-PCR a tiempo real permitió la detección de CTV en extractos de RNAt obtenidos a partir de todos los tejidos infectados. La curva de disociación de los productos de amplificación mostró un valor de  $T_m$  característico de los aislados no agresivos (Figura 9), confirmando así la detección específica del aislado T385. Los valores de  $C_t$  obtenidos estuvieron entre  $18.20 \pm 0.16$  y  $25.90 \pm 0.02$ , y los valores de CV% intra- e inter-ensayo oscilaron de 0 a 0.60% y de 0.07 a 1.25%, respectivamente (Tabla 5). La comparación del número estimado de copias de gRNA para los diferentes tejidos reveló que: (i) la acumulación de CTV más elevada se obtuvo en los tejidos de fruto para ambas combinaciones de variedad/patrón ( $1.19 \times 10^6 \pm 1.02 \times 10^5$  y  $1.28 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^5$  copias por nanogramo de RNAt), (ii) la carga viral en hojas era similar en ambos huéspedes ( $1.10 \times 10^5 \pm 6.67 \times 10^3$  en comparación con  $1.11 \times 10^5 \pm 2.74 \times 10^3$  copias por nanogramo de RNAt) y alrededor de un orden de magnitud más bajo que en frutos, (iii) la acumulación más baja se observó en las raíces de naranjo amargo ( $9.73 \times 10^3 \pm 0.62 \times 10^2$  copias por nanogramo de RNAt) que presentaron una diferencia de 5 ciclos de amplificación con respecto a las raíces de *C. macrophylla* (Figura 9B y Tabla 5), y (iv) la corteza de Nova tangelo acumuló casi el doble de copias de gRNA que la corteza de la variedad Valencia de naranjo dulce ( $6.44 \times 10^5 \pm 4.25 \times 10^4$  en comparación con  $3.49 \times 10^5 \pm 1.77 \times 10^4$  copias por nanogramo de RNAt).

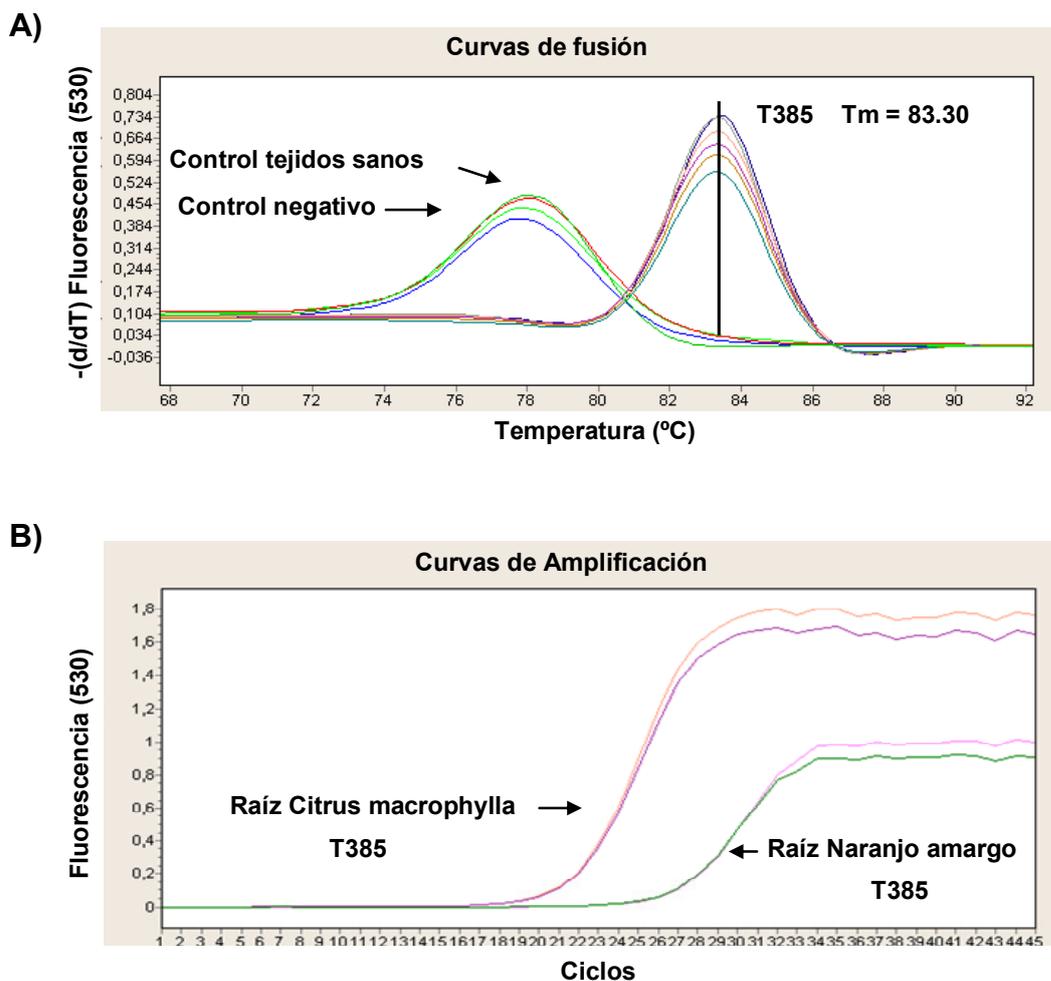


Figura 9. A) Análisis de las curvas de fusión de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores generales PM197D-PM198R utilizando SYBR Green I y preparaciones de RNAt de diferentes tejidos (corteza, hojas, albedo de fruto y raíces) de árboles de naranja dulce var. Valencia y tangelo Nova propagados sobre patrones de naranja amargo y *Citrus macrophylla*, respectivamente e infectados con el aislado de CTV T385. Los controles negativos incluyen extractos de RNAt de tejidos sanos. B) Curvas de amplificación obtenidas con RNAt de raíz de los dos patrones, naranja amargo y *Citrus macrophylla* infectados con el aislado T385.

Tabla 5. Detección y cuantificación absoluta de copias de gRNA en diferentes tejidos a partir de dos árboles de campo infectados con el aislado T385 de CTV mediante RT-PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.

Aislado	Variedad/patrón	Tejido	Ct ± S.D. <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Número de copias (X ± S.E.) <sup>c</sup>
T385	Nova / <i>C. macrophylla</i>	Corteza	18.20 ± 0.16	0.85	6.44 x 10 <sup>5</sup> ± 4.25 x 10 <sup>4</sup>
	Nova / <i>C. macrophylla</i>	Hoja	20.80 ± 0.18	0.84	1.10 x 10 <sup>5</sup> ± 6.67 x 10 <sup>3</sup>
	Nova / <i>C. macrophylla</i>	Raíz	20.80 ± 0.14	0.66	1.64 x 10 <sup>5</sup> ± 7.71 x 10 <sup>3</sup>
	Nova / <i>C. macrophylla</i>	Fruto	20.30 ± 0.23	1.16	1.19 x 10 <sup>6</sup> ± 1.02 x 10 <sup>5</sup>
	Valencia / naranjo amargo	Corteza	19.40 ± 0.12	0.62	3.49 x 10 <sup>5</sup> ± 1.77 x 10 <sup>4</sup>
	Valencia / naranjo amargo	Hoja	20.90 ± 0.07	0.33	1.11 x 10 <sup>5</sup> ± 2.74 x 10 <sup>3</sup>
	Valencia / naranjo amargo	Raíz	25.90 ± 0.02	0.07	9.73 x 10 <sup>3</sup> ± 0.62 x 10 <sup>2</sup>
	Valencia / naranjo amargo	Fruto	18.50 ± 0.23	1.25	1.28 x 10 <sup>6</sup> ± 1.06 x 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos diferentes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos.

<sup>c</sup> Media del número de copias (X) por nanogramo de RNAt y error estándar (S.E.).

## 2.4. DISCUSIÓN

Durante años el diagnóstico de CTV se ha realizado mediante ensayos biológicos en huéspedes indicadores o se ha basado en técnicas serológicas, de hibridación molecular con sondas de DNA o RNA complementario del gRNA viral, o de retrotranscripción y amplificación por PCR (Cambra *et al.*, 1991; Narváez *et al.*, 2000; Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999; Permar *et al.*, 1990; Roistacher, 1991; Vela *et al.*, 1986), pero ninguno de estos procedimientos permite una cuantificación aproximada de la acumulación del virus. En este trabajo hemos desarrollado un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real que por primera vez estima de forma fiable el número de copias de gRNA de CTV en extractos de RNAt de tejidos infectados.

Los dos problemas principales para diseñar cebadores apropiados que amplificasen específicamente el gRNA de CTV eran la presencia en células infectadas por el virus de múltiples especies de sgRNAs y dRNAs, y algunas veces de variantes de secuencia divergentes. Para evitar la amplificación de los sgRNAs más abundantes, que incluyen las cadenas positiva y negativa de los 10 sgRNAs 3' co-terminales (Hilf *et al.*, 1995) y los dos pequeños sgRNAs 5' co-terminales LMTs 1 y 2 (Che *et al.*, 2001; Mawassi *et al.*, 1995a), los cebadores directo y reverso se dirigieron a las ORFs 1b y 2, respectivamente. El anillado en esta región también evitó la amplificación de todos los dRNAs descritos hasta el momento pero no la amplificación de la mayoría de los sgRNAs 5' co-terminales de cadena positiva generados durante la replicación de CTV, aunque la concentración de estas especies de RNA es muy baja comparada con el gRNA, los dRNAs o el resto de los sgRNAs (Ayllón *et al.*, 1999a; Guerri *et al.*, 1991; Gowda *et al.*, 2001; Mawassi *et al.*, 1995b; Yang *et al.*, 1997). Aunque el número real de copias de gRNA en extractos de RNAt podría resultar ligeramente sobrestimado, la región seleccionada para anillar los cebadores es crítica para minimizar este efecto. Por otra parte, como la identidad nucleotídica en la ORF 2 entre diferentes aislados de CTV puede ser muy baja ( $\leq 84\%$ ) (nuestros datos no publicados) algunas variantes de secuencia presentes en la población podrían no amplificarse durante el proceso de RT-PCR. La pareja de cebadores PM197D-PM198R, basada en regiones del gRNA conservadas en todas las secuencias completas disponibles en la base de datos y en secuencias parciales de CTV (Vives *et al.*, 2005), mostró un amplio espectro al amplificar de forma eficiente y sensible aislados de CTV de orígenes y características patogénicas diferentes, algunos de los cuales muestran amplias diferencias de secuencia en otras regiones del gRNA (nuestros datos no publicados). El tamaño de los amplicones obtenidos para el aislado T36 y para el resto de aislados fue diferente como cabría esperar, lo que se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes. La ausencia de amplificación utilizando preparaciones de RNAt de plantas sanas o infectadas con otros virus de RNA, confirmó que nuestros cebadores eran específicos para CTV.

La presencia de un único pico de fluorescencia en el análisis de las curvas de fusión de todas las muestras, refuerza aún más la especificidad de los cebadores y la ausencia de una interferencia debida a señales fluorescentes no específicas. La interferencia debida a la formación de dímeros de cebadores se eliminó únicamente tras incluir una etapa adicional de 82°C durante 2 s en el protocolo de PCR durante la cual se realizaba la adquisición de la fluorescencia (Pfaffl, 2001). Las curvas de fusión también revelaron que la  $T_m$  característica de los aislados no agresivos de CTV (83.5 – 83.6°C) era considerablemente más baja que la de los aislados más virulentos (84.9 – 85.1°C). Aunque el tamaño del producto de PCR del aislado T36 es 18 bp mayor que el del resto de aislados, los valores de  $T_m$  específicos se pueden ver afectados no sólo por el tamaño del producto sino también por el contenido en GC (Ririe *et al.*, 1997). De hecho, el contenido en GC del producto de T36 y del resto de aislados agresivos en esta región, es idéntico y más elevado que el de los aislados no agresivos. Aunque la discriminación entre aislados agresivos y no agresivos basada en las diferencias de sus valores de  $T_m$  puede presentar algunas limitaciones (ver Capítulo 3) el análisis de las curvas de fusión es una herramienta útil para una caracterización preliminar de los mismos. El tamaño del producto de PCR y el perfil de la curva de desnaturalización de los aislados no se vieron afectados por la especie huésped o tejido analizados, lo que confirma la fiabilidad del protocolo de RT-PCR a tiempo real desarrollado para la detección de CTV y la caracterización preliminar de aislados.

El proceso completo se realiza en un solo tubo, lo que permite un procesamiento rápido y un fácil manejo de la muestra, además de minimizar el riesgo de contaminación (Bustin, 2000, 2002; Mackay *et al.*, 2002). En comparación con las sondas específicas de secuencia, el uso de SYBR Green I presenta varias ventajas: i) elimina el coste de síntesis de la sonda, ii) permite una estimación más exacta de la carga viral en un intervalo dinámico más amplio y iii) es más fiable para la cuantificación general de CTV, ya que la detección no se ve afectada por la heterogeneidad de secuencia presente en la región delimitada por los cebadores (Papin *et al.*, 2004). Unos pocos desapareamientos de bases en la región diana pueden

llevar a la pérdida de amplificación de algunas variantes de secuencia o incluso a falsos negativos cuando la detección general se basa en el uso de sondas específicas de secuencia (Read *et al.*, 2001; Varga y James, 2005).

La reproducibilidad en las estimaciones del número de copias de gRNA que se obtuvo con este protocolo de RT-PCR a tiempo real se basó en una cuidadosa normalización de los diferentes etapas y el uso de curvas estándar externas (Fronhoffs *et al.*, 2002; Larionov *et al.*, 2005; Rutledge y Coté, 2003). La concentración de RNA en las preparaciones de RNAt usadas como molde fue cuidadosamente medida con el Quant-iT™ RiboGreen Assay Kit (Invitrogen), un sistema más fiable y sensible que los métodos espectrofotométricos (Hashimoto *et al.*, 2004). La contaminación con DNA se evitó mediante un tratamiento con DNasa libre de RNasas (tratamiento doble en el caso de los transcritos de RNA), y además se incluyeron en cada ensayo los controles sin retrotranscriptasa y sin molde.

Las posibles diferencias en la eficiencia de amplificación entre los transcritos de RNA y los moldes de RNAt se minimizaron: (i) utilizando RNAt de cítricos sanos para preparar las diluciones de transcritos, teniendo en cuenta el posible efecto de los inhibidores potencialmente presentes en los extractos, (ii) extendiendo las curvas estándar a lo largo de un amplio intervalo dinámico (6–7 unidades logarítmicas de concentración de RNA diana), y (iii) incluyendo dos diluciones de transcrito de la curva estándar en cada ronda de RT-PCR para verificar la eficiencia de amplificación. La fuerte correlación lineal de las curvas estándar, la buena eficiencia de amplificación observada para ambas curvas y las diversas preparaciones de RNAt, la reproducibilidad encontrada en los valores *Ct* de las dos diluciones de transcritos incluidas en diferentes reacciones, y el hecho de que los valores de *Ct* para todas las muestras problema estaban dentro del intervalo dinámico de las curvas estándar, apoyan la validez del protocolo de RT-PCR a tiempo real para el cálculo del número de copias de gRNA en extractos de planta infectada. Es más, los valores tan bajos obtenidos para los CV% intra- e inter-ensayo (< 1.7%) con un número de réplicas significativo para cada muestra, confirmó la reproducibilidad y fiabilidad de este procedimiento. El límite de sensibilidad (hasta 100 copias genómicas) se encuentra en el

intervalo de otros ensayos basados en SYBR Green I para la detección de virus (Fabre *et al.*, 2003; Korimbocus *et al.*, 2002; Picó *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2000), que es superior al de los métodos serológicos o de PCR convencionales (Boonham *et al.*, 2002, 2004; Mumford *et al.*, 2000).

Este protocolo permitió estimar el número de copias de gRNA en varios tejidos a partir de diferentes especies de cítricos, cultivados en invernadero o en campo, e infectados con aislados de CTV que difieren en sus características patogénicas. Estas estimaciones pusieron de manifiesto que la acumulación del gRNA de CTV varía con el tipo de tejido y con la especie huésped. Estudios previos basados en la detección por ELISA de la proteína de la cápsida no encontraron diferencias claras en la carga viral de corteza, hoja y pedúnculo de fruto en varias especies de cítricos (Cambra *et al.*, 2002), mientras que nuestros datos sugieren que el número de copias de gRNA en tejidos de corteza y de fruto es más alto que en tejidos de hoja y raíces. Esta diferencia se debe probablemente a que el procedimiento usado aquí detecta principalmente viriones mientras que las lecturas de ELISA pueden detectar viriones y subunidades no ensambladas de la proteína de la cápsida. Aunque las diferencias en el contenido de gRNA detectadas en tejido de corteza de diferentes especies de cítricos susceptibles, como lima Mexicana, naranja dulce o *C. macrophylla* en el caso de T36, o naranja dulce, mandarino y pomelo en el caso de T318A, fueron muy pequeñas, se observó un contenido de CTV muy bajo en naranja amarga (T36) o zamboa (T318A), lo que sugiere que estas especies restringen la acumulación del virus.

Estos datos indican que el procedimiento desarrollado puede ser de ayuda no sólo para el diagnóstico y discriminación preliminar de aislados, sino también en el estudio de diferentes aspectos de la biología de CTV como la comparación de la eficacia biológica de diferentes aislados o el tropismo existente para diferentes órganos de cítricos, los efectos de la acumulación del virus en brotes jóvenes en la expresión de síntomas y en la transmisibilidad por pulgones, o la resistencia relativa de los diferentes cultivares o plantas transgénicas de cítricos a aislados específicos de CTV. Es más, puede ser una herramienta muy útil en experimentos encaminados

a comparar la eficiencia de distintos clones infecciosos de cDNA preparados para la identificación de los determinantes de patogenicidad. Actualmente se dispone de un clon infeccioso de cDNA del gRNA de CTV (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001) y se está evaluando la eficiencia de replicación de distintas construcciones quiméricas.

En resumen, el ensayo de RT-PCR a tiempo real desarrollado en este trabajo permite por primera vez una estimación fiable, sensible y reproducible de la acumulación del gRNA de CTV en tejidos infectados que permitirá abordar nuevas perspectivas en la biología de este virus necesarias para el control de las graves enfermedades que ocasiona.

## **CAPÍTULO 3**

### **DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECÍFICO PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE VARIANTES AGRESIVAS Y NO AGRESIVAS DE CTV EN PLANTAS**



### 3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado en la Introducción general, los aislados de CTV presentan una amplia diversidad biológica, particularmente en su capacidad para inducir síntomas, que probablemente refleja su variabilidad genética, si bien los determinantes específicos de los distintos síndromes son aún desconocidos. Análisis filogenéticos de las nueve secuencias completas de CTV disponibles mostraron tres grupos principales de aislados que incluían: i) los aislados más virulentos como T318A de España (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006), SY568R de California (Vives *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1999), NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001) y VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), que inducen SY y SP en naranjo dulce y/o pomelo, ii) los aislados poco agresivos T30 de Florida (Albiach-Martí *et al.*, 2000a) y T385 de España (Vives *et al.*, 1999), que son esencialmente asintomáticos en la mayoría de las especies huésped, y iii) aislados como T36 de Florida (Karasev *et al.*, 1995; Pappu *et al.*, 1994), Qaha de Egipto (AY340974) y un aislado Mexicano (DQ272579), de secuencia muy similar, de los que al menos T36 induce SY pero no SP.

El control de los daños de CTV depende de la incidencia del virus, de la virulencia de los aislados presentes en cada zona y de la sensibilidad de las variedades o combinaciones cultivadas. En zonas cítricas como las españolas donde CTV tiene una incidencia moderada o alta, la utilización de patrones tolerantes al decaimiento es una medida necesaria pero en el futuro podría resultar insuficiente si se dispersasen aislados capaces de producir SP en las variedades cultivadas, como ha ocurrido en otras zonas del mundo. En esta situación resultaría necesario identificar los aislados potencialmente peligrosos para proceder a su erradicación selectiva o al menos evitar su propagación en los viveros. Si tales aislados alcanzasen una incidencia apreciable incluso podría ser necesario utilizar la protección cruzada con aislados no virulentos. Sin embargo, la implementación de estas medidas necesitaría: i) métodos rápidos y fiables para detectar los aislados potencialmente peligrosos, y ii) conocer la dinámica poblacional de las

variantes de secuencia virulentas y no virulentas cuando co-infectan una misma planta, con objeto de poder controlar la protección cruzada.

Tanto la detección como la caracterización patogénica de los aislados de CTV se ha realizado durante años mediante ensayos biológicos en especies indicadoras sensibles (Roistacher, 1991), un procedimiento laborioso y caro que permitió definir diversos biogrupos en función de los síntomas inducidos en distintos huéspedes (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Garnsey *et al.*, 1991). Tras la purificación de CTV y la obtención de las primeras secuencias de su gRNA se aplicaron con éxito diferentes procedimientos rápidos y sensibles de detección basados en técnicas serológicas, hibridación molecular con sondas de cDNA o cRNA, o retrotranscripción y amplificación por PCR (RT-PCR) (Cambra *et al.*, 1991; Narváez *et al.*, 2000; Niblett *et al.*, 2000; Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999; Vela *et al.*, 1986). Igualmente se desarrollaron distintos métodos de caracterización e identificación de aislados basados en la asociación de sus características patogénicas con diversos marcadores moleculares, entre los que cabe señalar i) la reacción serológica con el anticuerpo monoclonal MCA13 (Permar *et al.*, 1990), ii) la hibridación con sondas de cDNA (Narváez *et al.*, 2000), iii) el polimorfismo en posiciones nucleotídicas específicas (SNPs) o el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción con distintas endonucleasas (RFLPs) (Niblett *et al.*, 2000; Gillings *et al.*, 1993), iv) el polimorfismo conformacional del DNA monocatenario (SSCPs) (Ayllón *et al.*, 1999b; d'Urso *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 1996; Sambade *et al.*, 2002, 2007) o v) la amplificación mediante RT-PCR con parejas de cebadores específicos para diferentes genotipos de CTV (Hilf *et al.*, 1999, 2005), para el tipo de secuencia de la región 5' UTR (Ayllón *et al.*, 2001; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006) o para grupos de secuencia del gen *p23* (Sambade *et al.*, 2003). Sin embargo, estas técnicas padecen de dos limitaciones principales: i) la presencia en las poblaciones virales de distintas variantes de secuencia, a veces muy divergentes (Rubio *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2006), dificulta la asociación de éstas con los síntomas inducidos, y ii) dado que los determinantes de patogenicidad de CTV son aún

desconocidos, la asociación de algunos síndromes con marcadores moleculares puede ser meramente circunstancial.

Recientemente, se han desarrollado protocolos de RT-PCR a tiempo real para la detección general de CTV que han mejorado sustancialmente la sensibilidad de los métodos anteriores (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Saponari *et al.*, 2008). Uno de estos protocolos, desarrollado en el capítulo 2 de esta memoria, ha permitido por primera vez la cuantificación absoluta de gRNA de CTV utilizando una pareja de cebadores diseñados en secuencias conservadas de las ORFs 1b y 2 que minimizan la amplificación de sgRNAs y dRNAs (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Por otra parte, el análisis de la curva de fusión de ocho aislados del virus permitió diferenciar los aislados más virulentos y los de escasa virulencia por el valor de su  $T_m$ , lo que sugería que este parámetro podría ser utilizado para una caracterización preliminar de los aislados virales.

Para poner a punto un método más sensible y específico que permitiese la identificación rápida de los aislados de CTV potencialmente peligrosos para la citricultura española (inductores de SP en pomelo o naranjo dulce), los objetivos de este capítulo fueron: i) verificar si las diferencias en el valor de  $T_m$  eran una herramienta válida para discriminar entre aislados virulentos y no virulentos de CTV, analizando un panel internacional de aislados biológicamente caracterizados, ii) desarrollar un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real utilizando tres sondas TaqMan, específicas para cada uno de los tres grupos filogenéticos de CTV previamente descritos (Moreno *et al.*, 2008), que permitiese estimar la frecuencia de cada genotipo en los aislados analizados, y iii) aplicar en su caso el nuevo protocolo para estudiar el movimiento sistémico y acumulación temporal de dos variantes de secuencia de CTV en la población viral de plantas de naranjo dulce co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático y otro virulento, o viceversa.

Para mejorar el poder discriminatorio de las sondas TaqMan se ensayó el uso de sondas con varios nucleótidos modificados químicamente (*locked nucleic acids*, LNAs) para darles una conformación especial que aumenta la estabilidad y especificidad del dúplex cuando la sonda se une a

su diana (Braasch y Corey, 2001; Petersen y Wengel, 2003). Este aumento de estabilidad incrementa la temperatura de fusión y da lugar a una hibridación más fuerte (Kumar *et al.*, 1998).

### 3.2. MATERIALES Y METODOS

#### 3.2.1. Aislados de CTV

En este estudio se incluyeron un total de 56 aislados de CTV caracterizados biológicamente y divididos en dos grupos. El primer grupo, formado por 23 aislados de la colección del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Tabla 1) incluía: i) 19 aislados de diferentes áreas cítricas de España y un aislado de Japón (T388) que se mantienen en plantas de naranjo dulce [*C. sinensis* (L.) Osb.] injertadas sobre citrange Carrizo [*C. sinensis* X *P. trifoliata* (L.) Raf.] en un recinto de malla antipulgón (Ballester-Olmos *et al.*, 1988,1993; Moreno *et al.*, 1993a, b y nuestros datos no publicados), ii) el aislado T36 de Florida [amablemente proporcionado por el Dr. W.O. Dawson (University of Florida-CREC, Lake Alfred, Florida, EEUU)] (Satyanarayana *et al.*, 2001), que se mantiene en un invernadero con protección anti-insectos y control de temperatura (18/26 °C noche/día), y iii) los aislados 5.14, y 6.10 que pertenecen a un experimento de campo de protección cruzada (datos no publicados). Todas las plantas, excepto los árboles de campo, se cultivaron en macetas con un sustrato artificial (50% turba y 50% arena) y con un sistema de fertilización previamente optimizado (Arregui *et al.*, 1982). El segundo grupo de 33 aislados, procedentes de 19 países distintos y con diferentes características biológicas (Tabla 2), pertenecían a una colección internacional de patógenos exóticos de cítricos que se mantiene en las instalaciones de cuarentena del Departamento de Agricultura de EE.UU., [Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Maryland, U.S.A] (Garnsey *et al.*, 2006) y se analizaron a partir de hojas desecadas y pulverizadas de cítricos. Este grupo incluía aislados de California, Florida y Hawai (EE.UU.), Brasil, Japón, China, Colombia, Perú,

Australia, Costa Rica, India, Taiwán, Indonesia, República Dominicana, Jamaica, Trinidad, Córcega (Francia), Venezuela e Israel.

Los ensayos de caracterización biológica se realizaron en plantas de semilla de lima Mexicana [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.], pomelo Duncan, naranjo amargo y naranjo dulce para la observación de clorosis nervial, SY y SP (Roistacher, 1991), mientras que la capacidad para inducir decaimiento se observó directamente en los árboles fuente de estos aislados, en plantas de naranjo dulce Valencia propagadas sobre naranjo amargo, o en plantas de naranjo amargo propagadas sobre naranjo dulce Pineapple inoculado en el invernadero (Garnsey *et al.*, 2006 y nuestros datos no publicados). Las características biológicas (Tablas 1 y 2) son datos procedentes de dos centros de investigación diferentes y podrían estar sujetas a cierta variabilidad debido a diferencias en las condiciones de cultivo.

### 3.2.2. Diseño de cebadores y sondas LNA

La pareja de cebadores generales (PM197D-PM198R) que anillan en secuencias conservadas de las ORFs 1b y 2 de CTV había sido diseñada y optimizada previamente (ver capítulo 2) utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y un alineamiento múltiple de las secuencias del gRNA de los aislados T36 y T30 de Florida (GenBank N° U16034 y AF260651), VT de Israel (U56902), T318A y T385 de España (DQ151548 y Y18420), SY568 de California (AF001623), NUagA de Japón (AB046398) y Qaha de Egipto (AY340974) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

El mismo programa y alineamiento múltiple se utilizó para diseñar tres sondas TaqMan LNA dentro del segmento genómico delimitado por los cebadores generales, en una región muy variable que discrimina los tres principales grupos filogenéticos de CTV: el de los aislados asintomáticos (tipo T385), el de los aislados más virulentos (tipo T318A) y el de los aislados de virulencia intermedia (tipo T36).

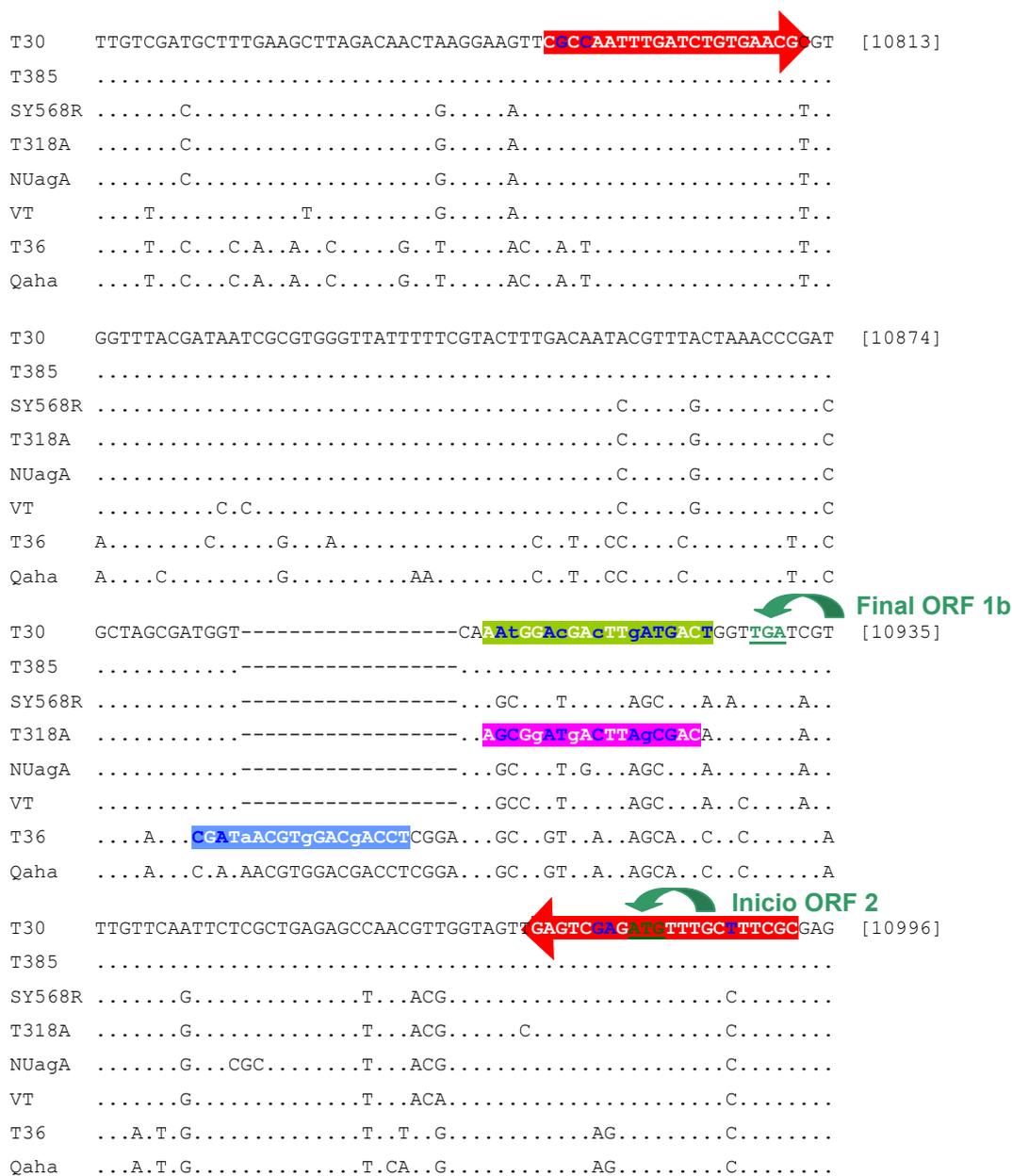


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias en formato de DNA de las regiones 3' terminal de la ORF 1b y 5' terminal de la ORF 2 correspondientes a los aislados de CTV T36 y T30 de Florida, VT de Israel, T318A y T385 de España, SY568R de California, NUagA de Japón y Qaha de Egipto. Se destacan en color rojo los cebadores PM197D-PM198R diseñados previamente, en verde la secuencia de la sonda NV específica de los aislados no virulentos, en fucsia la de la sonda V-SP específica de los aislados virulentos inductores de SP en pomelo o naranja dulce y en azul la de la sonda T-T36 específica para los aislados tipo T36. Las letras minúsculas dentro de cada sonda muestran los nucleótidos modificados LNA y las azules en las sondas y en los cebadores las posiciones polimórficas. Se indican los codones TGA y ATG de parada e inicio de las ORFs 1b y 2, respectivamente.

Las tres sondas tenían una longitud total de 18-19 nucleótidos, incluyendo 3 ó 4 residuos LNA con una separación de 3-6 nucleótidos, y se marcaron con el fluoróforo donante FAM (6-carboxyfluoresceína) en el extremo 5' (marcador) y con el receptor TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rhodamina) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donante y suprime la señal cuando ambos están unidos por la sonda. Como las sondas hibridan en una región interna del producto amplificado con los cebadores PM197D-PM198R, la actividad 5' exonucleasa de la *Taq* DNA polimerasa durante la amplificación del DNA cataliza la hidrólisis del extremo 5' de la sonda unida y libera el fluoróforo donante del receptor, permitiendo así la emisión de fluorescencia por el primero y su medida en el detector del aparato.

Los valores de  $T_m$  de las sondas (69-71°C) se calcularon mediante el programa <http://lna-tm.com>, proporcionados por Exiqon en <http://www.exiqon.com>.

La secuencia de la sonda específica de los aislados no virulentos (sonda NV, AATGGACGACTTGATGACT, en la que los nucleótidos subrayados indican los 4 LNAs) corresponde a los aislados T385 y T30, pero tiene siete y ocho desapareamientos con la secuencia de los aislados virulentos T318A y SY568R, y VT y NUagA, respectivamente, tres de los cuales son LNAs, y diez desapareamientos con los aislados T36, Qaha y Mexicano, cuatro de los cuales son LNAs. La secuencia de la sonda específica de aislados virulentos inductores de SP en pomelo o naranjo dulce (sonda V-SP), AGCGGATGACTTAGCGAC, es idéntica a la de los aislados T318A y SY568R, y tiene un desapareamiento con la secuencia de los aislados VT y NUagA, mientras que tiene seis desapareamientos con la de los aislados asintomáticos T385 y T30, uno de los cuales es un LNA, y tres con la de los aislados T36, Qaha y Mexicano. La secuencia de la sonda específica de aislados tipo T36 (sonda T-T36), CGATAACGTGGACGACCT, es idéntica a la de los aislados T36, Qaha y Mexicano y contiene 13 nt de una inserción de 18 que sólo presentan los genotipos tipo T36 que además incluye todos los LNAs. En las cinco posiciones restantes, compartidas por

otros aislados de CTV, hay dos desapareamientos con las secuencias de los aislados asintomáticos y de los virulentos.

### 3.2.3 Extracción de RNA

Para los aislados de la colección del IVIA se extrajo RNA total (RNAt) a partir de 1–3 g de corteza joven de cítricos utilizando un protocolo estándar basado en dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguidas de una precipitación con cloruro de litio 8.4 M (Ancillo *et al.*, 2007). Para los aislados de la colección internacional del BARC se rehidrataron 100 mg de tejido desecado con un tampón de extracción durante 10 min y a continuación se extrajo RNAt con el mismo protocolo estándar (Ancillo *et al.*, 2007) seguido de un paso de purificación con el estuche comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen). Los extractos de RNAt se resuspendieron en 25  $\mu$ l de agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). La concentración de RNA en estas alícuotas se ajustó a 10 ng/ $\mu$ l aproximadamente, a continuación se midió por duplicado con un espectrofotómetro NanoDrop® UV-Vis para determinar la concentración real y finalmente las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.2.4 Curvas estándar

Para determinar la sensibilidad de detección y poder cuantificar en su caso las dianas de RNA, se prepararon diluciones seriadas de transcritos de RNA sintetizados *in vitro* y se utilizaron en ensayos de RT-PCR a tiempo real con la sonda correspondiente para generar tres curvas estándar externas. Los cDNAs usados como molde en las transcripciones *in vitro* se obtuvieron mediante RT-PCR convencional utilizando extractos de RNAt de corteza de cítricos infectados con los aislados de CTV T385, T318A o T36 y la pareja de cebadores PM261F-PM198R (PM261F es una versión modificada del cebador PM197F que incluye la secuencia del promotor T7 en su extremo 5') (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Los productos de amplificación se utilizaron

directamente como molde para la transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 (New England BioLabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transcritos se purificaron con el estuche comercial RNaid w/Spin (Q-BIO gene), se trataron dos veces con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion) y se determinó su concentración por duplicado con un espectrofotómetro NanoDrop® UV-Vis. Las diluciones seriadas (1/10), que contenían de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias del RNA diana, se prepararon con extractos de RNAt de cítrico sano (10 ng/ $\mu$ l) y se usaron en diferentes ensayos de RT-PCR a tiempo real con las sondas TaqMan LNA, con o sin retrotranscriptasa, para asegurar la ausencia de molde de DNA en las preparaciones de transcritos. La concentración de transcritos de RNA (pmol) en cada dilución se calculó con la fórmula:  $\mu\text{g de transcrito de RNA} \times (10^6 \text{ pg}/1\mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol}/340 \text{ pg}) \times (1/\text{numero de bases del transcrito})$ , y el número de copias de RNA, utilizando este valor de concentración y la constante de Avogadro. Las curvas estándar para los aislados T385, T318A y T36 se construyeron representando los valores del ciclo umbral (*Ct*) de cuatro ensayos independientes con dos réplicas por dilución frente al logaritmo de la concentración de RNA. La eficiencia de la reacción se calculó a partir de la pendiente de la correspondiente curva utilizando la fórmula  $10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})}$  o la misma fórmula  $\times 100$  (cuando se da el valor como un porcentaje). La especificidad de las tres sondas se evaluó individualmente ensayando cada una de ellas mediante RT-PCR a tiempo real con los transcritos de RNA homólogos y heterólogos.

### **3.2.5. Detección general de CTV mediante RT-PCR a tiempo real y análisis de las curvas de fusión**

Las muestras de los cincuenta y seis aislados de CTV incluidos en este estudio se analizaron primero en la plataforma LightCycler® de Roche mediante el protocolo de RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores generales PM197D-PM188R y SYBR Green I en las condiciones descritas en el Capítulo 2 (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Los análisis de las curvas de fusión que proporciona el programa del equipo LightCycler y el análisis

electroforético de los productos de amplificación en geles de agarosa del 2% sirvieron para confirmar la síntesis de un cDNA específico del tamaño esperado.

### **3.2.6 Detección de genotipos específicos de CTV mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA**

Los protocolos de RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA se desarrollaron también en la plataforma LightCycler® de Roche utilizando capilares de vidrio de 20 µl. La concentración de los cebadores y la sonda se optimizó en ensayos preliminares con 0.3, 0.5 o 0.4 µM de cebadores y 0.3, 0.25 o 0.2 µM de sonda, respectivamente, obteniéndose la reacción más eficiente con la combinación 0.5 µM de cebadores y 0.25 µM de sonda.

Las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 10 µl de mezcla de reacción que contenían 2 µl de la preparación de DNA polimerasa LightCycler® TaqMan® Master (Roche), 3.65 µl de agua libre de RNasas, 0.05 µl de retrotranscriptasa RT MultiScribe (Applied Biosystems), 0.05 µl de inhibidor de RNasas (Applied Biosystems), 0.5 µM de cada cebador, 0.25 µM de la sonda correspondiente y 2 µl de la preparación de RNAt (~10 ng RNA/µl). Los controles que se incluyeron en cada ronda de RT-PCR fueron: i) RNAt procedente de cítrico sano, de cítrico infectado con CTV pero sin añadir la retrotranscriptasa, o de cítrico infectado con *Citrus psorosis virus* (CPsV) o *Citrus variegation virus* (CVV), ii) agua en lugar de extracto de RNAt, y iii) al menos una dilución de transcrito de RNA de la correspondiente curva estándar. Cada muestra problema se analizó en duplicado en dos ensayos independientes de RT-PCR a tiempo real. Los ciclos térmicos utilizados incluyeron una etapa de retrotranscripción a 48°C durante 30 min, una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 60°C y 15 s a 72°C. La media ( $\bar{X}$ ) del valor  $C_t$  y de la desviación estándar (S.D.) para cada muestra problema se calcularon a partir de los cuatro valores  $C_t$  obtenidos. El coeficiente de variación intra- e inter-ensayo se calculó como porcentaje del valor de S.D. en comparación con el valor de  $C_t$  ( $\bar{X}$ ).

### **3.2.7. Análisis temporal de la población viral en plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado de CTV asintomático y otro virulento mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA**

La detección y cuantificación de variantes de secuencia específicas nos permite, entre otras cosas, el estudio de la posible eficacia biológica y competencia entre los dos tipos principales de variantes, y la posible protección cruzada obtenida por la pre-inoculación de un aislado suave. Para analizar la evolución temporal de la población de CTV en plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático y otro virulento, i) se inocularon plantas de semilla de naranjo dulce Pineapple con el aislado asintomático T32 o con el aislado virulento T318A, ii) se comprobó la infección de las plantas inoculadas mediante ELISA, iii) se comprobó mediante RT-PCR a tiempo real con las sondas NV y V-SP que la población viral de cada planta infectada era homogénea y sólo reaccionaba con su sonda homóloga, y iv) las plantas infectadas con T32 se re-inocularon por injerto de púa con una estaquilla infectada con T318A, y las plantas infectadas con T318A con una estaquilla infectada con T32, guiando el crecimiento de las plantas de forma que en cada una de ellas hubiese un brote de la estaquilla inóculo (I) y uno o dos de la planta receptora o patrón (P). Se dejaron plantas control de cada tipo sin re-inocular. El movimiento y acumulación temporal de las variantes de secuencia características de T32 y T318A se analizó en brotaciones sucesivas de las zonas I y P de cada planta mediante RT-PCR a tiempo real con las correspondientes sondas TaqMan LNA, estimando el porcentaje de cada una de las variantes sobre el número total de copias de gRNA. Al final del experimento, se examinó la presencia de SP en las zonas I y P de cada planta.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Detección general de aislados de CTV y análisis de sus curvas de fusión

En el capítulo anterior se desarrolló un protocolo de RT-PCR a tiempo real que permite una detección cuantitativa del gRNA de CTV en diferentes huéspedes y tejidos de cítricos utilizando ocho aislados caracterizados biológicamente (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). En este capítulo, se examinaron 48 aislados adicionales con diferentes orígenes y características patogénicas incluyendo: i) 15 aislados nuevos de España que se analizaron a partir de tejido fresco (Tabla 1), y ii) 33 aislados procedentes de 19 países diferentes que se analizaron a partir de hojas recogidas hace 7-9 años de la colección del BARC mantenidas desecadas con silica gel (Tabla 2). Se detectó CTV en todas las muestras, validando así el protocolo de detección general desarrollado en el capítulo anterior, si bien la detección en tejido fresco fue generalmente más sensible que en tejido desecado (valores de  $C_t$  entre 14.06 y 22.11, con una media de 17.68 para el primer grupo, frente a valores de  $C_t$  entre 18.55 a 29.12, con una media de 22.78, para el segundo) (Tablas 1 y 2). Para cada muestra la curva de fusión mostró un pico único confirmando la especificidad del producto y la ausencia de dímeros de cebadores o de otros productos no deseados. El análisis electroforético confirmó la amplificación de un único producto de DNA de 186 pb para la mayoría de aislados, o de 204 pb para los aislados tipo T36, debido a la presencia en estos aislados de una inserción de 18 pb en la región delimitada por los cebadores (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

El valor de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los aislados de CTV osciló entre 81.2 y 85.1°C (Tablas 1 y 2). Sin embargo, mientras los valores de  $T_m$  de la mayoría de los aislados virulentos inductores de SY y/o SP (26 de 28) osciló entre 84.1 (aislado T66-1) y 85.1°C (aislados B83, B255 y B352), los valores de  $T_m$  de la mayoría de aislados no virulentos (24 de 28) varió entre 81.2 (aislado B192) y 83.9°C (aislado B105) (Tablas 1 y 2),

confirmando en gran medida las observaciones previas (Capítulo 2 y Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). Las excepciones fueron los aislados virulentos 6.10 y B156, con valores de  $T_m$  dentro del intervalo de los no virulentos (83.6 y 83.8°C, respectivamente), y los aislados no virulentos T346, T373, B302 y B151, con valores de  $T_m$  en el intervalo del grupo de los virulentos (84.2, 84.3, 84.3 y 85°C, respectivamente). La variación del valor de  $T_m$  entre aislados puede ser debida a un contenido diferente en GC o a su distribución en el producto de amplificación, y a la presencia de mezclas de variantes de secuencia en la población viral. Para examinar esta posibilidad se secuenciaron los productos de amplificación de los aislados no virulentos B192, B29, T385, B105 y T373 que mostraban un intervalo amplio de valores  $T_m$  (Figura 2). En comparación con el aislado T385 ( $T_m$  83.4°C), los aislados B192 y B29 tenían valores de  $T_m$  más bajos (81.2 y 82.2°C,) y 8 y 3 pares de GC menos, respectivamente, mientras que los aislados B105 y T373, con valores de  $T_m$  más altos (83.8 y 84.3°C) tenían 3 y 2 pares de GC adicionales, respectivamente. Por otro lado, la secuenciación del producto de amplificación obtenido del aislado 6.10, con el valor de  $T_m$  más bajo entre los aislados virulentos, reveló posiciones polimórficas características de genotipos virulentos y no virulentos, sugiriendo una mezcla de ambos tipos de variantes en su población. Es de destacar que la planta fuente del aislado 6.10 era parte de un experimento de protección cruzada en campo en el cual esta planta había sido pre-inoculada con el aislado asintomático T385, pero la protección falló y después de 7 años en el campo el inóculo de esta planta inducía SY en naranjo amargo y pomelo y ligero SP en pomelo.

Aunque el 90% de los aislados fueron identificados correctamente como virulentos o no virulentos según su valor de  $T_m$ , el solapamiento entre los rangos de  $T_m$  de ambos grupos limita la fiabilidad de este análisis para predecir las características patogénicas de aislados desconocidos. Además, los aislados con una población mixta de secuencias divergentes son comunes (Rubio *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2006) y esta circunstancia podría producir variaciones en sus valores de  $T_m$  dependiendo de la frecuencia de estas variantes de secuencia en la población viral. Para superar esta

limitación se desarrolló un nuevo procedimiento para detectar y cuantificar las variantes de secuencia específicas presentes en los aislados de CTV.

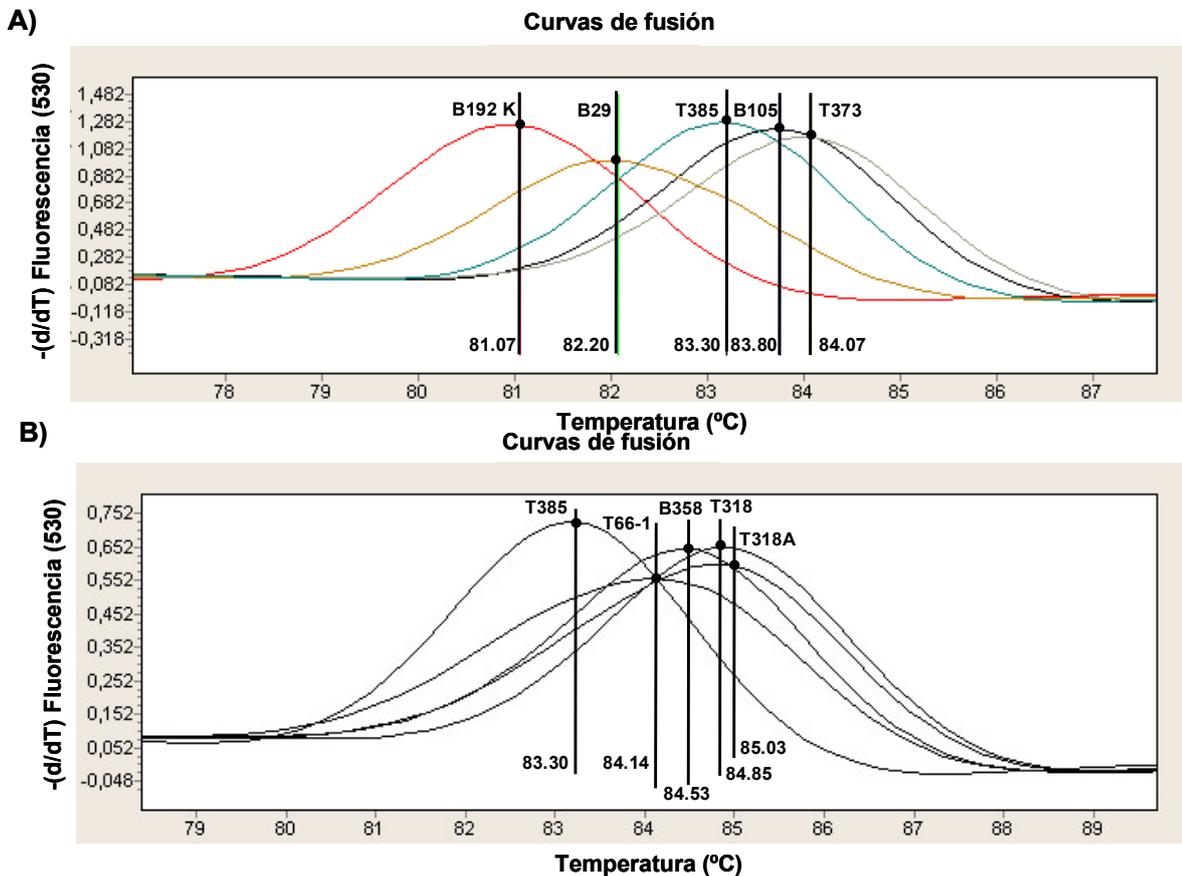


Figura 2. Análisis de las curvas de fusión de los productos obtenidos de 10 aislados diferentes de CTV mediante RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores PM197D-PM198R usando SYBR Green I. Representación gráfica de la primera derivada de las curvas de fusión en función de la temperatura de A) los aislados no virulentos B192K, B29, T385, B105 y T373, y B) el aislado asintomático T385 y los aislados virulentos T66-1, B358, T318 y T318A. Para cada curva de fusión se indica el valor de  $T_m$  en la parte inferior.

### 3.3.2. Detección específica de variantes de secuencia de CTV mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA.

En el protocolo de RT-PCR a tiempo real desarrollado para la detección de variantes de secuencia específicas se usó la pareja de

cebadores generales PM197D-PM198R diseñada previamente (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007) y tres sondas LNA dirigidas a una región variable entre los tres grupos filogenéticos de CTV observados previamente (Moreno *et al.*, 2008 y Figura 3 del Capítulo 1), que se encuentra dentro de la zona delimitada por estos cebadores.

Ninguna de las sondas produjo señal fluorescente con los controles negativos en los que se usó como molde agua o RNAt de plantas de cítricos sanos o infectados con otros virus, o utilizando RNAt de tejido infectado con CTV sin añadir retrotranscriptasa a la mezcla de reacción. Tampoco se observó fluorescencia cuando las sondas se ensayaron con transcritos de RNA de los aislados heterólogos incluso a elevadas concentraciones, confirmando así la ausencia de hibridación inespecífica o de reacción cruzada de las sondas con variantes de secuencia de CTV no homólogas. El ensayo fue muy reproducible, con coeficientes de variación intra- e inter-ensayo siempre por debajo de 1.5% y normalmente dentro del intervalo de 0 a 0.7% (datos no mostrados). Para determinar la sensibilidad de detección con cada una de las sondas LNA, se prepararon tres curvas estándar utilizando diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA de los aislados T385, T318A y T36, que contenían de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias. Las tres curvas proporcionaron un amplio intervalo dinámico (de 6 a 7 unidades logarítmicas de concentración) de amplificación de la diana (Figura 3), y los análisis de regresión demostraron una fuerte relación lineal con coeficientes de correlación de 0.9984 (T385), 0.9894 (T318A) y 0.9983 (T36), y unas eficiencias de amplificación entre el 94% y el 100% (Figura 3A, C y D). En los tres casos el límite de detección fue de unas 100 copias de gRNA de CTV en extractos de plantas (Figura 3 B).

Para evaluar la capacidad de las sondas para detectar pequeñas cantidades de su secuencia homóloga en poblaciones mixtas de variantes de secuencia, cada sonda se evaluó con mezclas que contenían proporciones variables (de 1 al 99%) del transcrito de RNA homólogo y uno de los heterólogos (T385+T318A, T385+T36, o T318A+T36). La especificidad de las sondas de LNA no se vio afectada por las poblaciones mixtas y cada tipo de transcrito de RNA fue detectado únicamente por su

sonda LNA homóloga. Las sondas V-SP y T-T36 dieron detección positiva en mezclas que contenían el 2.5% de transcritos homólogos y el 97.5% de heterólogos, mientras que la sonda NV permitió detectar 1% del transcrito homólogo mezclado con un 99% de transcritos heterólogos.

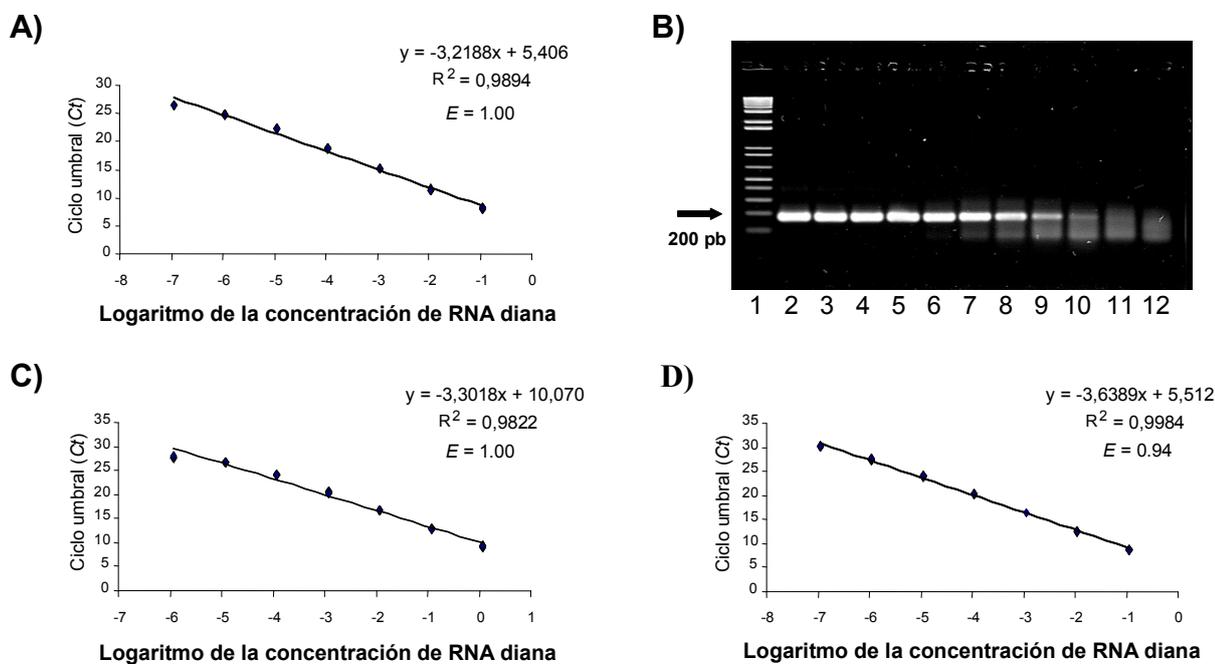


Figura 3. Curvas estándar obtenidas a partir de diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA sintetizados *in vitro* a partir de los aislados de CTV T318A (A), T36 (C) y T385 (D) usando RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA específicas de los genotipos virulento-SP (sonda V-SP), tipo T36 (sonda T-T36) y no virulentos (sonda NV), respectivamente. Las curvas se generaron mediante regresión lineal representando los valores del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración inicial de RNA diana. Cada punto representa la media del valor Ct calculado a partir de cuatro experimentos diferentes con dos réplicas intra-ensayo. Para cada curva se indica el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia de amplificación (E). (B) Electroforesis en gel de agarosa del 2% de los productos de amplificación obtenidos a partir de diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA del aislado T318A que contenían de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias (carriles 2-11, respectivamente). Carril 1: Marcador de DNA (1 kb plus ladder DNA, Invitrogen). Carril 12: Control sin molde. El gel se tiñó con bromuro de etidio.

### 3.3.3. Detección de los tres tipos de variantes de secuencia en aislados de CTV

Se analizó la presencia de variantes de secuencia características de los aislados no virulentos, virulentos inductores de SP, y tipo T36 en un total de 56 aislados de CTV caracterizados biológicamente. Cada muestra problema se analizó por duplicado en dos ensayos independientes de RT-PCR a tiempo real para cada una de las tres sondas LNA. Todos los aislados de CTV de ambas colecciones reaccionaron con al menos una de las sondas, con la única excepción del aislado B151 de California que fue amplificado con la pareja de cebadores generales y detectado con el ensayo de SYBR Green I pero no con las sondas.

Los 27 aislados caracterizados biológicamente como no virulentos debido a que no indujeron SY o SP en pomelo o naranja dulce (excluyendo B151), fueron detectados exclusivamente con la sonda NV. La detección fue más sensible para los aislados del grupo de España, con valores de *Ct* que oscilaron entre 16.1 y 23.9, que para los aislados de la colección del BARC, con valores de *Ct* que oscilaron entre 21.1 y 27.2 (Tablas 1 y 2), un resultado que era de esperar teniendo en cuenta el uso de material fresco para el primer grupo y desecado para el segundo. En cambio, el perfil de reacción de los 28 aislados caracterizados como virulentos (capaces de inducir SY o SP en pomelo o naranja dulce) fue mucho más variable, pero todos reaccionaron con la sonda V-SP, con la sonda T-T36 o con ambas (Tablas 1 y 2). Muchos aislados reaccionaron con una de esas dos sondas y con la sonda NV, pero no se encontró ningún aislado que reaccionara con las tres. Nueve de esos 28 aislados (siete de la colección del BARC y dos de la colección del IVIA) reaccionaron únicamente con la sonda V-SP y dos aislados (T36 y B83) reaccionaron únicamente con la sonda T-T36. Los 17 aislados restantes se detectaron con dos sondas: 12 de ellos con la NV y V-SP, cuatro con NV y T-T36 y uno con V-SP y T-T36. Aunque la reacción con la sonda V-SP (sola o en combinación con otra) se asoció esencialmente con aislados inductores de SP en pomelo o naranja dulce, el aislado de

Brasil B12-1 (un sub-aislado obtenido por transmisión del aislado B12 por pulgón) induce SY intenso pero no SP (Tabla 2). De forma similar, la reacción con la sonda T-T36 (sola o en combinación con la sonda NV) se asoció principalmente con aislados inductores de SY pero no inductores de SP, aunque los aislados B83 y B358 mostraron ocasionalmente síntomas ligeros de SP en pomelo.

La especificidad de las tres sondas LNA fue validada además con la secuenciación de los productos de RT-PCR de un grupo representativo de aislados. Como se esperaba, la secuencia obtenida para los aislados no virulentos B5, B29, B105, B272, B302 y B192 (de la colección del BARC) y T340, T346, T373 y T405 (de la colección del IVIA) estaban genéticamente muy relacionadas con la secuencia del aislado asintomático T385. De forma semejante, las secuencias de los productos de amplificación de los aislados B83 y T36, que solo reaccionaron con la sonda T-T36, se correspondían con la del aislado T36 y presentaban la inserción característica de 18 pb. La mayoría de aislados detectados con dos sondas mostraron un valor de *Ct* similar para ambas sondas utilizando la misma preparación de RNA<sub>t</sub> (Tablas 1 y 2), lo que sugería que ambas variantes de secuencia se encuentran con una frecuencia similar en la población viral. Las secuencias de los productos de RT-PCR obtenidos de los aislados T318, 6.10 y B12, que reaccionaron con las sondas NV y V-SP, o las de los productos de los aislados T308 y T66-1, que reaccionaron con las sondas NV y T-T36 con valores similares de *Ct*, mostraron posiciones polimórficas específicas de los genotipos no virulentos y virulentos-SP en el primer caso, y no virulentos y tipo T36 en el segundo. Por el contrario, la reacción de algunos aislados que mostraron distintos valores *Ct* con las dos sondas, sugerían el predominio de una de las variantes de secuencia en la población viral. Por ejemplo, el valor de *Ct* obtenido para los aislados B181 y B358 con la sonda NV fue ligeramente más alto que el obtenido para la sonda T-T36 (Tabla 2) y para ambos la secuencia obtenida del producto de PCR estuvo relacionada con la del genotipo T36. Una diferencia mayor se observó para el aislado VT que reaccionó con las sondas V-SP y T-T36 con valores de *Ct* de 27.3 y 30.7, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 1. Detección de variantes de secuencia específicas de CTV en plantas infectadas con aislados de diferentes características patogénicas mediante RT-PCR a tiempo real usando tres sondas LNA específicas de cada genotipo.

Aislado	Origen	Lima	Síntomas <sup>a</sup>					Sonda NV <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	Sonda V-SP <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	Sonda T-T36 <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	Tm <sup>c</sup>
			Decaimiento ND/NA	SY <sub>NA</sub>	SP <sub>P</sub>	SP <sub>ND</sub>	SP <sub>+</sub>				
T11	España	-	-	-	-	-	19.1 ± 0.0	-	-	83.5	
T32	España	+/-	-	-	-	-	18.1 ± 0.0	-	-	83.5	
T300	España	+	+	-	-	-	16.6 ± 0.0	-	-	83.6	
T305	España	+	+	+	-	-	18.3 ± 0.1	18.0 ± 0.1	-	84.8	
T306	España	+	nh	-	nh	-	16.7 ± 0.0	-	-	83.6	
T308	España	+	+/-	+/-	-	-	22.6 ± 0.0	-	22.4 ± 0.2	84.9	
T309	España	+	+	-	-	-	18.3 ± 0.0	-	-	83.6	
T311	España	+	+	-	-	-	16.6 ± 0.0	-	-	83.6	
T312	España	+	+	-	-	-	18.0 ± 0.1	-	-	83.6	
T318	España	+	+	+	+	+	19.5 ± 0.0	19.1 ± 0.0	-	84.9	
T318A	España	+	+	+	+	+	-	18.0 ± 0.0	-	85.0	
T340	España	+	+	-	-	-	17.7 ± 0.0	-	-	83.5	
T346	España	+	+	-	-	-	23.9 ± 0.0	-	-	84.2	
T315	España	+	+	-	-	-	18.5 ± 0.0	-	-	83.5	
T362	España	+	+	-	-	-	17.1 ± 0.0	-	-	83.5	
T373	España	+	+	-	-	-	23.8 ± 0.1	-	-	84.3	
T385	España	+	-	-	-	-	17.1 ± 0.1	-	-	83.4	
T388	Japón	+/-	-	+	+	+	-	21.2 ± 0.1	-	85.0	
T390	España	+	+	-	-	-	16.1 ± 0.0	-	-	83.7	
T405	España	+	+	-	-	-	22.1 ± 0.0	-	-	83.3	
5.14	España	+	+	-	-	-	21.5 ± 0.1	-	-	83.4	
6.10	España	+	+	+/-	-	-	21.6 ± 0.0	21.6 ± 0.2	-	83.6	
T36	Florida	+	+	+	-	+	-	-	22.9 ± 0.0	85.0	

<sup>a</sup> Los síntomas incluyeron aclaramiento de las nerviaciones, acopamiento de las hojas, SP y enanismo en lima Mexicana, decaimiento de naranjo dulce (ND) propagado sobre naranjo amargo (NA), SY en naranjo amargo (SY<sub>NA</sub>), y SP en pomelo Duncan (SP<sub>P</sub>) o naranjo dulce (SP<sub>ND</sub>): los síntomas se observaron de forma consistente (+), no se observaron (-), se observaron de forma esporádica o muy débil (+/-), o el ensayo no fue hecho (nh).

<sup>b</sup> Valor de la media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) para cada sonda a partir de dos ensayos diferentes con dos réplicas.

<sup>c</sup> Temperatura de fusión (Tm) del producto de RT-PCR obtenido con la pareja de cebadores PM197D-PM198R y SYBR Green I.

Tabla 2. Detección de variantes de secuencia específicas de CTV en tejido desecado e infectado con aislados de diferentes características patogénicas mediante RT-PCR a tiempo real usando tres sondas LNA específicas de cada genotipo.

Aislado	Origen	Lima	Decaimiento ND/NA	SY <sub>NA</sub>	SP <sub>P</sub>	SP <sub>ND</sub>	Síntomas <sup>a</sup>			Tm <sup>c</sup>
							Sonda NV <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	Sonda V-SP <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	Sonda T-T36 <sup>b</sup> (Ct ± S.D.)	
B5	California	+	-	-	-	-	22.4 ± 0.0	-	-	83.4
B12	Brasil	+	+	+	+	+	24.4 ± 0.0	24.0 ± 0.2	-	84.4
B12-1	Brasil	+	+	-	-	-	25.5 ± 0.0	24.0 ± 0.1	-	84.8
B14	Brasil	+	+	-	-	-	22.7 ± 0.0	23.2 ± 0.1	-	84.6
B29	Japón	+/-	-	-	-	-	21.8 ± 0.0	-	-	82.4
B55	Hawái	+	+	+	+	+	24.5 ± 0.1	24.6 ± 0.1	-	84.7
B65	China	+	+	+	+	+	22.5 ± 0.3	22.7 ± 0.0	-	84.9
B83	China	+	+/-	-	+	-	-	-	26.2 ± 0.1	85.1
B105	California	+	+/-	-	-	-	23.4 ± 0.1	-	-	83.9
B128	Colombia	+	+	+	+	+	19.1 ± 0.1	19.7 ± 0.0	-	84.4
B135	Perú	+	+	+	+	+	-	22.8 ± 0.1	-	84.5
B151	California	+	+	-	-	-	-	-	-	85.0
B156	Australia	+	+	+	+	+	24.7 ± 0.1	24.2 ± 0.1	-	83.8
B181	C. Rica	+	+	+/-	-	-	28.8 ± 0.1	-	27.9 ± 0.0	84.3
B185	Japón	+	+	+	+	+	21.9 ± 0.1	21.1 ± 0.2	-	84.7
B227	India	+	+	+	+	+	-	19.8 ± 0.2	-	84.5
B228	Colombia	+	+	-	-	+/-	-	24.2 ± 0.1	-	84.2
B252	Taiwan	+/-	+/-	-	-	-	24.5 ± 0.2	-	-	83.6
B253	Taiwan	+	+	-	-	+	-	22.8 ± 0.2	-	84.7
B255	Indonesia	+	+	+	+	+	21.5 ± 0.2	21.4 ± 0.3	-	85.1
B272	Colombia	-	-	-	-	-	22.1 ± 0.1	-	-	83.0
B296	D.R.	+/-	+/-	-	-	-	24.2 ± 0.2	-	-	83.8
B302	Jamaica	+	-	-	-	-	27.2 ± 0.2	-	-	84.3
B339	Trinidad	+	-	-	-	-	25.9 ± 0.1	-	-	83.8
B352	California	+	+	+	+	-	-	25.9 ± 0.2	-	85.1
B358	Córcega	+	-	+/-	+	-	28.8 ± 0.2	-	26.8 ± 0.2	84.5
B400	Venezuela	+	nh	-	+	nh	21.1 ± 0.1	-	-	83.8
T3	Florida	+	+	+	+	+	-	26.4 ± 0.2	-	84.5
T4	Brasil	+	+	-	-	-	24.8 ± 0.1	-	-	83.5
T66-1	Florida	+	+	+	+	-	27.7 ± 0.0	-	27.7 ± 0.0	84.1
B28 - T68	Florida	+	+	+	+	-	-	21.6 ± 0.1	-	84.7
VT	Israel	+	+	+	+	+	-	27.3 ± 0.1	-	84.9
B192 - K	Córcega	-	-	-	-	-	23.1 ± 0.0	-	30.7 ± 0.3	81.2

a, b, c Ver Tabla 1.

La única variante de secuencia que se detectó en el producto de RT-PCR estaba muy relacionada con la secuencia característica de los genotipos virulentos inductores de SP, indicando que la variante tipo T36 podría ser una componente minoritaria en la población viral.

Los aislados B12-1 de Brasil y B151 de California mostraron un perfil de reacción anormal. El primero fue el único aislado que reaccionó con la sonda V-SP pero no indujo SP en pomelo ni en naranjo dulce, mientras que el segundo, que es de escasa virulencia, no reaccionó con ninguna de las tres sondas. La secuencia del producto de RT-PCR del aislado B12-1 fue característica de los genotipos inductores de SP, mientras que la variante esperada de su reacción con la sonda NV no se detectó, quizás debido a su bajo título, (sus valores *Ct* fueron 25.5 con la sonda NV y 24 con la sonda V-SP). El análisis del producto de RT-PCR amplificado a partir del aislado B151 reveló: i) la ausencia de la inserción característica de los aislados tipo T36 y ii) la presencia de una recombinación entre secuencias de los genotipos asintomáticos e inductores de SP en la región donde anillan las sondas, que daría lugar a cuatro desapareamientos con la primera y tres con la segunda, evitando así la hibridación con cualquiera de las sondas.

#### **3.3.4. Movimiento sistémico y acumulación temporal de dos variantes de secuencia de CTV en plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático y otro virulento**

Se obtuvieron un total de 8 plantas de naranjo dulce pre-inoculadas con el aislado asintomático T32 y re-inoculadas por injerto de púa con el aislado virulento T318A, y 6 plantas co-inoculadas en el orden inverso. Una vez establecida la infección con el primer aislado, el análisis mediante RT-PCR a tiempo real con las sondas NV y V-SP mostró que las plantas inoculadas con T32 sólo contenían la secuencia característica de los aislados asintomáticos y las plantas inoculadas con T318A sólo la secuencia característica de los aislados virulentos inductores de SP. Tras la re-inoculación con el segundo aislado, en cada planta se analizaron sucesivas brotaciones del patrón (P) y de la estaquilla injertada (I) y se estimó

mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con las sondas NV y V-SP el porcentaje que representaba cada variante de secuencia sobre el total (Figura 4).

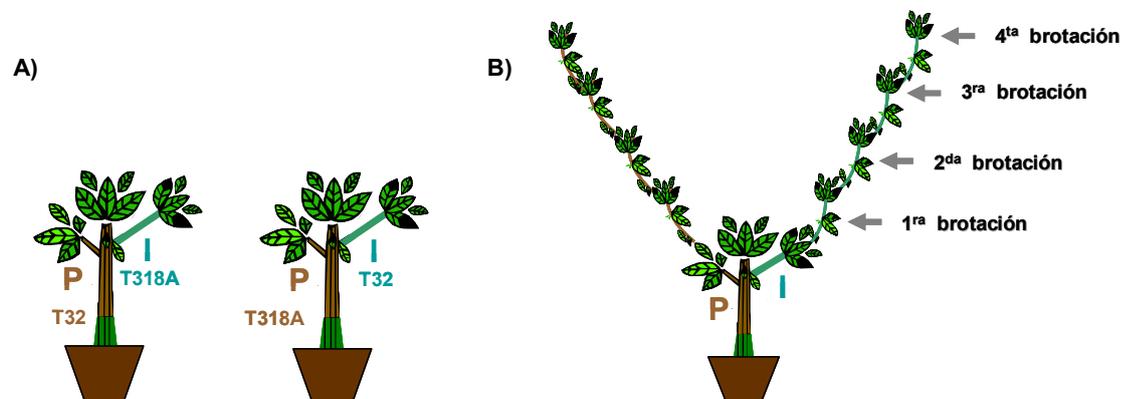


Figura 4. A) Representación gráfica de la inoculación de plantas de semilla de naranjo dulce Pineapple con el aislado asintomático T32 o con el aislado virulento T318A y re-inoculadas por injerto de púa con el otro aislado. B) Esquema de las brotaciones sucesivas del patrón (P) y de la estaquilla injertada (I) que se analizaron en cada planta tras la sobre-inoculación con el segundo aislado.

En dos de las 8 plantas con la combinación T32(P)+T318A(I) el injerto murió después de la primera o segunda brotación, debido posiblemente a una unión insuficiente con el patrón, por lo que no pudieron analizarse las brotaciones siguientes, y en una de las 6 plantas con la combinación T318A(P)+T32(I) el injerto se mantuvo vivo pero no llegó a brotar, por lo que sólo pudo analizarse la brotación del patrón (Tabla 3).

En todas las plantas co-inoculadas, con independencia del orden de inoculación seguido, y tanto en la zona P como en la zona I se detectaron las dos variantes de secuencia, confirmando que los tejidos infectados con cualquiera de los aislados son invadidos por el otro. Esta invasión de los tejidos inicialmente infectados por la otra variante de secuencia se observó, tanto en la zona P como en la zona I, en la primera brotación y se mantuvo a lo largo del experimento. Aunque la acumulación de T32 y T318A fue variable en las distintas brotaciones y plantas (Tabla 3 y Figura 5), se

observó que: i) en la mayoría de las brotaciones y plantas analizadas la acumulación de T32 fue más elevada que la de T318A con independencia de qué aislado se había inoculado en primer lugar (con promedios de 65.6 y 34.4% del total de copias de gRNA en las plantas infectadas inicialmente con T32, y de 73.2 y 26.8% en las infectadas inicialmente con T318A), ii) en las plantas inicialmente infectadas con T32 y re-inoculadas con T318A, la concentración de T318A en la zona P aumentó entre la primera y segunda brotación para luego reducirse de nuevo y estabilizarse en torno al 27%, mientras que en la zona I la concentración se mantuvo estable en las dos primeras brotaciones para luego reducirse en paralelo con el incremento de T32 en esta zona, iii) los cambios de concentración fueron más suaves en las plantas inoculadas inicialmente con T318A, en las que la invasión de la zona P por T32 fue aparentemente muy rápida y desde la primera brotación se mantuvo en niveles medios por encima del 65% de las copias totales de gRNA, y iv) los niveles medios de acumulación de T32 y T318A en la última brotación analizada (aproximadamente al año de la re-inoculación) fue similar en los dos grupos de plantas del experimento (inoculadas primero con T32 o con T318A). En los controles inoculados sólo con T32, o sólo con T318A, nunca se detectó la presencia de la otra variante de secuencia. En la mayoría de las plantas se observó SP de intensidad variable, tanto en la zona P como en la zona I, indicando que pese a la mayor acumulación de T32 en la mayoría de las brotaciones y plantas éstas no quedaron protegidas de los efectos patogénicos de T318A.

### CAPÍTULO 3

Tabla 3. Frecuencia relativa de dos variantes de secuencia de CTV en brotaciones sucesivas de plantas individuales de naranjo dulce pre-inoculadas (P) con los aislados T32 (asintomático) o T318A (inductor de SP) y re-inoculadas por injerto de púa (I) con los aislados T318A o T32, respectivamente. En cada ocasión y planta individual se analizaron separadamente brotes de la zona P y de la zona I mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA específicas de los aislados no virulentos (sonda NV) o de los aislados virulentos inductores de SP (sonda V-SP). Al final del experimento se observó la presencia de SP en ambas zonas.

				1B		2B		3B		4B	
P	I		SP	Sonda V-SP	Sonda NV						
T32-1	T318A	P	+	47.8%	52.2%	22.4%	77.6%	26.2%	73.8%	23.2%	76.8%
		I	+	39.2%	60.8%	57.4%	42.6%	9.3%	90.7%	37.6%	62.4%
T32-2	T318A	P	-	38.1%	61.9%	29.4%	70.6%	19.6%	80.6%	28.5%	71.5%
		I	+	43.7%	56.3%	43.6%	56.8%	29.9%	70.1%	31.4%	68.6%
T32-3	T318A	P	+	43.1%	56.9%	46.6%	53.4%	39.8%	60.2%	29.0%	71.0%
		I	+	39.8%	60.2%	32.6%	67.4%	27.1%	72.9%	52.3%	47.7%
T32-4	T318A	P	+	11.0%	89.0%	46.6%	53.4%	21.5%	78.5%	24.0%	76.0%
		I	+	47.1%	52.9%	39.2%	60.8%	28.5%	71.5%	28.0%	72.0%
T32-5	T318A	P	+	34.9%	65.1%	40.3%	59.7%	17.6%	82.4%	34.4%	65.6%
		I		33.4%	66.6%	*	*	*	*	*	*
T32-6	T318A	P	+	32.9%	67.1%	51.6%	48.4%	29.4%	70.6%	23.2%	76.8%
		I		43.1%	56.9%	42.6%	57.4%	*	*	*	*
T32-7	T318A	P	-	28.5%	71.5%	82.1%	17.9%	24.5%	75.5%	32.0%	68.0%
		I	+	35.4%	64.6%	17.3%	82.7%	24.9%	75.1%	29.4%	70.6%
T32-8	T318A	P	+	18.6%	81.4%	53.5%	46.5%	31.2%	68.7%	24.4%	75.6%
		I	+	48.3%	51.7%	51.7%	48.3%	26.2%	73.8%	20.4%	79.6%
T318A-1	T32	P	+	18.3%	81.7%	19.4%	80.6%	12.4%	87.6%	41.5%	58.5%
		I		*	*	*	*	*	*	*	*
T318A-2	T32	P	+	20.1%	79.9%	16.3%	83.7%	25.9%	74.1%	39.2%	60.8%
		I	+	34.4%	65.6%	24.9%	75.1%	21.2%	78.8%	28.4%	71.6%
T318A-3	T32	P	+	21.0%	79.0%	44.3%	55.7%	17.6%	82.4%	36.5%	63.5%
		I	+	2.3%	97.7%	31.5%	68.5%	73.8%	26.2%	27.1%	72.9%
T318A-4	T32	P	+	15.7%	84.3%	16.6%	83.4%	21.6%	78.4%	27.1%	72.9%
		I	+	25.4%	74.6%	32.4%	67.6%	13.2%	86.8%	36.0%	64.0%
T318A-5	T32	P	+	43.7%	56.3%	72.5%	27.5%	33.1%	66.9%	34.4%	65.6%
		I	+	21.2%	78.8%	19.0%	81.0%	17.9%	82.1%	19.0%	81.0%
T318A-6	T32	P	+	46.6%	53.4%	29.4%	70.6%	23.4%	76.6%	30.4%	69.6%
		I	+	23.5%	76.6%	25.3%	74.7%	27.0%	73.0%	33.6%	66.4%

\* Datos no disponibles.

+ Presencia de SP; - No presencia de SP.

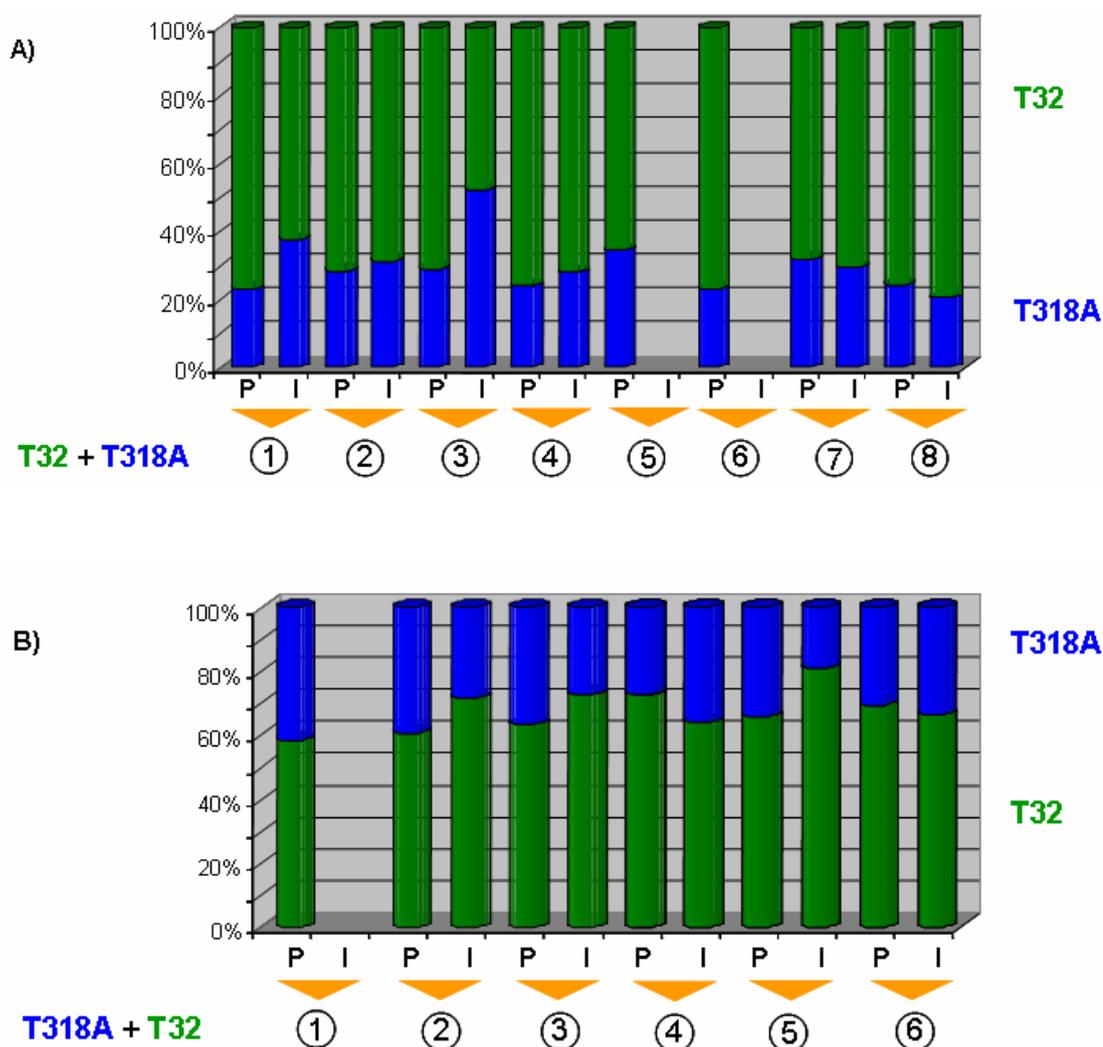


Figura 5. Frecuencia relativa (%) de dos variantes de secuencia de CTV en la última brotación de plantas individuales de naranjo dulce pre-inoculadas (P) con los aislados T32 (asintomático) o T318A (inductor de SP) y re-inoculadas por injerto de púa (I) con los aislados T318A o T32, respectivamente. Los brotes de la zona P y de la zona I de cada planta individual se analizaron separadamente mediante RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA específicas de los aislados no virulentos (sonda NV) o de los aislados virulentos inductores de SP (sonda V-SP). Para cada planta y zona se representa en azul la frecuencia de la variante virulenta (T318A) y en verde la de la variante asintomática (T32).

### 3.4. DISCUSIÓN

En muchos países, CTV ha causado el decaimiento y muerte de árboles propagados sobre patrón naranjo amargo, lo que ha obligado a una reconversión de la citricultura utilizando patrones tolerantes a tristeza; sin embargo, la dispersión de aislados más virulentos capaces de inducir enanismo y SP en variedades de pomelo o naranjo dulce, independientemente del patrón usado, supone una nueva amenaza a la industria citrícola que a largo plazo puede ser tan importante como el síndrome de decaimiento o tristeza (Moreno *et al.*, 2008). El control de esta nueva enfermedad requiere: i) la propagación en vivero de yemas libres de aislados virulentos inductores de SP, y ii) en el futuro podría requerir el uso de la protección cruzada con aislados no virulentos de CTV (Costa y Müller, 1980; van Vuuren *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2008), dos medidas que necesitan procedimientos eficientes para identificar los aislados potencialmente peligrosos. Actualmente el único método fiable para la identificación de estos aislados son los ensayos biológicos en especies indicadoras sensibles (Roistacher, 1991; Garnsey *et al.*, 2006), si bien se han utilizado varios marcadores serológicos y moleculares para la caracterización de aislados con distintos grados de fiabilidad (Permar *et al.*, 1990; Gillings *et al.*, 1993; Narváez *et al.*, 2000; Ayllón *et al.*, 2001; Hilf *et al.*, 2005; Sambade *et al.*, 2003). Algunos de estos marcadores tienden a separar aislados virulentos y no virulentos, pero la presencia de poblaciones mixtas en árboles de campo, la limitada sensibilidad y especificidad de algunos de estos métodos y el hecho de que no se conozcan aún los determinantes de patogenicidad de CTV, hacen arriesgado su uso práctico para predecir el comportamiento patogénico de aislados desconocidos (Sieburth *et al.*, 2005).

En el capítulo anterior, se desarrolló un protocolo de RT-PCR a tiempo real para una detección y cuantificación fiable del gRNA de CTV en tejidos infectados y se observó que el análisis de las curvas de fusión de los productos de amplificación permitían la discriminación de aislados virulentos y no virulentos por su valor de  $T_m$  (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). En este capítulo,

la aplicación de este protocolo a un grupo de 56 aislados caracterizados biológicamente procedentes de 20 países diferentes permitió confirmar que el método de detección es lo bastante sensible como para detectar CTV en tejidos de cítricos desecados 7-9 años antes, y permite detectar de una forma fiable aislados de CTV con orígenes y características patogénicas muy diferentes. Por otro lado, los análisis de las curvas de fusión confirmaron que los valores  $T_m$  de los aislados virulentos abarcaban un rango reducido de alrededor de 1°C y eran normalmente más altos que los de los aislados no virulentos. Aunque las diferencias de  $T_m$  permitieron la identificación correcta de 51 aislados como virulentos o no virulentos, cuatro aislados del segundo grupo y dos del primero mostraron valores de  $T_m$  anormalmente altos o bajos, respectivamente. El valor de  $T_m$  de fragmentos de DNA con el mismo tamaño se ve afectado principalmente por el contenido en GC y la secuencia del fragmento (Ririe *et al.*, 1997; Nicolas *et al.*, 2002). La secuenciación de los productos de PCR permitió confirmar que: i) el contenido en GC en estos aislados no virulentos era más alto que en otros, y ii) la secuencia de los dos aislados virulentos tenía polimorfismos de secuencia característicos de las variantes de secuencia virulenta y no virulenta que hicieron desplazarse la curva de fusión hacia valores de  $T_m$  más bajos. La mezcla de variantes de secuencia es frecuente en aislados de CTV de campo (Ayllón *et al.*, 2001, 2006; Rubio *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2003) y puede limitar la precisión en la caracterización de aislados por su valor de  $T_m$ , aún cuando el 91% de los aislados aquí estudiados fueron clasificados correctamente.

Para superar esta limitación desarrollamos un procedimiento más específico basado en RT-PCR a tiempo real usando sondas TaqMan LNA. Las sondas TaqMan sólo emiten fluorescencia cuando se unen a su diana y la actividad 5' exonucleasa de la *Taq* DNA polimerasa hidroliza el extremo 5' de la sonda, separando el fluorocromo donante del aceptor (Bustin, 2002; Mackay *et al.*, 2002). Sin embargo, una limitación de estas sondas es que a menudo no son lo suficientemente específicas para discriminar entre variantes de secuencia que contienen 1 o pocos desapareamientos (Latorra *et al.*, 2003). La identificación de genotipos de CTV con sondas TaqMan

requería: i) la selección de una pareja de cebadores generales basados en secuencias conservadas que amplificasen todas las variantes de secuencia en la población viral, y ii) el diseño de sondas eficientes y específicas de cada genotipo dentro de la región delimitada por la pareja de cebadores generales. Mientras la amplificación de todas las variantes de secuencia se logró con la pareja de cebadores generales desarrollada previamente (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007), la detección específica de genotipos se realizó con tres sondas TaqMan LNA específicas para variantes de secuencia características de los aislados asintomáticos, virulentos inductores de SP, y tipo T36 (Moreno *et al.*, 2008). Como la región diana seleccionada en el genoma de CTV es muy variable se mejoró la sensibilidad y especificidad mediante: i) el uso de sondas cortas (menos de 20 nt) para reducir el número de potenciales posiciones polimórficas, y ii) la introducción de 3 a 4 residuos modificados LNA en cada sonda para incrementar su  $T_m$  hasta unos 70°C, para que las variantes de secuencia con al menos un desapareamiento pudieran hibridar con la sonda y ser detectadas durante el proceso de PCR. Este incremento en la  $T_m$  de las sondas está en el intervalo descrito previamente para otras sondas LNAs, con un incremento de 1 a 8°C por nucleótido LNA incorporado, dependiendo de la posición dentro de la secuencia de la sonda (Kumar *et al.*, 1998; Latorra *et al.*, 2003). Nuestra metodología incluyendo un primer paso de amplificación de CTV y detección con SYBR Green I fue útil para confirmar la infección por CTV y proporcionó algunas pistas acerca de la calidad de las preparaciones de RNA<sub>t</sub>, sobre todo de aquellas obtenidas a partir de material desecado. Además permitió la detección del aislado B151, aún cuando este aislado no reaccionó con ninguna de las tres sondas debido a la presencia de recombinación en la región diana de la sonda.

La especificidad de las sondas se evaluó con diferentes diluciones y mezclas con transcritos de RNA heterólogos. La ausencia de señal fluorescente o reacción cruzada con variantes de secuencia no homólogas confirmó que las sondas eran específicas de genotipo y que podían ser utilizadas para la discriminación de aislados. El aumento de especificidad proporcionado por la incorporación de LNAs en las sondas TaqMan ha sido

descrito para otros virus (Dreier *et al.*, 2006). Nuestras sondas LNA permitieron la detección de su diana específica en mezclas que contienen menos del 2.5% de la secuencia homóloga. Los valores de CV intra- e inter-ensayo fueron siempre muy bajos (< 1.5%) confirmando la alta reproducibilidad de este protocolo, mientras que la fuerte correlación lineal, la elevada eficiencia de amplificación y el amplio intervalo dinámico de las tres curvas estándar, mostró su validez en ensayos de cuantificación. El límite de detección para las tres sondas fue de unas  $10^2$  copias de gRNA, lo cual está en el intervalo de sensibilidad obtenido previamente para la detección de CTV y otros virus de plantas utilizando SYBR Green I o sondas TaqMan convencionales (Agindotan *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007).

Los análisis de aislados de CTV con orígenes geográficos y características patogénicas diferentes confirmaron la sensibilidad y especificidad de las sondas LNA para la detección general de CTV y la caracterización de aislados, incluso usando tejido de cítricos desecado años antes. Con la excepción del aislado B151, que tenía una secuencia recombinante en la región diana seleccionada y no reaccionó con ninguna de las tres sondas, el resto de aislados reaccionaron al menos con una de las sondas. Los perfiles de reacción observados en los diferentes aislados, que incluyeron la hibridación con las sondas NV, V-SP o T-T36, o con las combinaciones NV + V-SP, NV + T-T36 o V-SP + T-T36, reflejaron la diversidad genética de sus poblaciones virales. La correlación entre el perfil de reacción y la estructura poblacional se confirmó mediante secuenciación de los productos de RT-PCR amplificados a partir de algunos aislados. Así, mientras los productos de RT-PCR obtenidos a partir de los aislados T318A y T388 de la colección del IVIA, que sólo reaccionaron con la sonda V-SP, contenían únicamente una variante de secuencia estrechamente relacionada con la de otros aislados virulentos inductores de SP, los productos obtenidos a partir de los aislados, T318 y T305, que reaccionaron con las sondas NV y V-SP, mostraron dos variantes de secuencia genéticamente relacionadas con aislados no virulentos y virulentos, respectivamente. También se obtuvieron resultados coherentes secuenciando los productos de PCR

obtenidos a partir de otros 21 aislados (diez no virulentos, dos tipo T36 y nueve virulentos inductores de SP).

Resultó interesante observar que mientras todos los aislados no virulentos reaccionaron únicamente con la sonda NV, sugiriendo una población genéticamente homogénea, la mayoría de los aislados virulentos (alrededor del 61%) reaccionaron con dos sondas, indicando que sus poblaciones son más complejas, como se ha sugerido previamente analizando con técnicas diferentes otras regiones del gRNA (Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2002, 2003). En la mayoría de casos, los valores de *Ct* obtenidos con las dos sondas a partir del mismo extracto de RNA<sub>t</sub> fueron muy similares, indicando que las dos variantes de secuencia se encontraban en la planta infectada con una frecuencia parecida. Alrededor del 78.6% de los aislados virulentos reaccionaron con la sonda V-SP (el 32% sólo con esta sonda, el 43% con las sondas NV y V-SP y el 3.6% con las sondas V-SP y T-T36), pero sólo el 25% se detectó con la sonda T-T36 (el 7.1% sólo con esta sonda, el 14.3% con NV y T-T36 y el 3.6% con las sondas T-T36 y V-SP). La reacción con la sonda V-SP se asoció esencialmente con los aislados inductores de SP, mientras que la reacción con la sonda T-T36 principalmente identificó aislados inductores de SY pero no de SP. Sólo dos aislados inductores de SP (B83 y B358) no reaccionaron con la sonda V-SP, si bien fueron identificados como virulentos por su reacción con la sonda T-T36, y sólo un aislado (B12-1, obtenido por transmisión del aislado inductor de SP B12 por pulgones) que reaccionó con la sonda V-SP no indujo SP, si bien causaba SY intenso. Los aislados B83 y B358 se encontraron previamente asociados con el aislado T36 utilizando el marcador POL, y también el marcador K17 en el caso aislado B358, propuestos por Hilf *et al.* (2005). Globalmente, las variantes de secuencia de tipo no virulento se detectaron en un 77% de los aislados, las de tipo virulento inductor de SP en un 39% y las de tipo T36 en un 12.5%, confirmando datos previos que indicaban que las variantes de secuencia características de los aislados no virulentos son las más extendidas (Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2003).

Los ensayos anteriores para predecir las características patogénicas de los aislados de CTV por su asociación con distintos marcadores

serológicos o moleculares tenían dos inconvenientes principales: i) se hicieron con un número de aislados limitado o sólo se había realizado una caracterización biológica incompleta de los mismos, y ii) se encontraron excepciones fácilmente, y por tanto, se necesitaban varios ensayos para predecir de una forma más fiable la amenaza potencial de aislados desconocidos. Sieburth *et al.* (2005) usaron varios métodos serológicos y basados en ácidos nucleicos para discriminar aislados inductores y no inductores de SP y clasificaron correctamente el 75% de los aislados, teniendo en cuenta la combinación de todos los resultados. En este trabajo se han utilizado 56 aislados bien caracterizados procedentes de 20 países diferentes y nuestra sonda V-SP identificó un 96% de los aislados inductores de SP, mientras que la reacción con la sonda NV identificó el 100% de los aislados no virulentos. Es más, la reacción con las sondas V-SP o T-T36, permitió la identificación de todos los aislados potencialmente agresivos (inductores de SY y/o SP en pomelo o naranja dulce). Aunque este protocolo incluye tres reacciones separadas de RT-PCR a tiempo real (una para cada sonda LNA), resulta mucho más rápido, sensible y específico que otros protocolos previos. Además, permite estimar la proporción de los diferentes genotipos presentes en la población viral. El hecho de que aislados de CTV de orígenes geográficos diferentes, pero con características patogénicas similares, diesen perfiles de reacción similares apoya la validez del método desarrollado para discriminar entre aislados virulentos y no virulentos. Este protocolo basado en sondas LNA puede ser una herramienta útil para: i) programas de cuarentena y certificación con objeto de evitar la introducción o propagación de aislados potencialmente peligrosos en áreas afectadas por aislados no virulentos, ii) examinar la incidencia y epidemiología de aislados virulentos en áreas endémicas de CTV, iii) evaluar la resistencia frente a aislados específicos de CTV de distintos genotipos de cítricos o plantas transgénicas, iv) evaluar la estabilidad de la protección cruzada, o v) analizar la eficacia biológica relativa o efectuar ensayos de competición con genotipos de CTV obtenidos a partir de clones infecciosos de cDNA (Satyanarayana *et al.*, 2001; Tatineni *et al.*, 2008).

Como ejemplo de lo que podría ser el control de un ensayo de protección cruzada, se utilizó la detección específica y cuantificación de dos variantes de secuencia para estudiar la evolución temporal de la población viral en plantas de naranjo dulce co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático (T32) y otro inductor de SP (T318A). Este ensayo permitió poner de manifiesto que cada una de las variantes de secuencia era capaz de invadir los tejidos previamente infectados por la otra, independientemente del orden de inoculación utilizado. Además, en contra de lo esperado por resultados previos con otras técnicas (Sambade *et al.*, 2007), la variante de tipo asintomático se acumuló en los tejidos infectados a un nivel superior al de la variante de tipo virulento, incluso en los tejidos infectados inicialmente con ésta última, si bien ambas alcanzaron un equilibrio y ninguna consiguió desplazar completamente a la otra. Aunque la variante de tipo virulento no resultó finalmente predominante, su presencia fue suficiente para que la mayoría de los brotes mostrase SP de intensidad variable. La técnica de análisis de la población viral utilizada en este ensayo podría reducir la duración de los ensayos de campo con aislados asintomáticos como potenciales protectores para implementar la protección cruzada.

## **CAPÍTULO 4**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA GENÉTICO EFICIENTE  
BASADO EN LA AGROINFILTRACIÓN DE TEJIDOS DE *N.  
BENTHAMIANA* CON CLONES DE cDNA DE UN AISLADO  
AGRESIVO DE ORIGEN ESPAÑOL INDUCTOR DE  
ACANALADURAS EN LA MADERA**



#### 4.1. INTRODUCCIÓN

La identificación de los determinantes de patogenicidad de los virus de plantas requiere disponer de un sistema genético eficiente basado en la obtención de clones de cDNA infecciosos en los que introducir mutaciones específicas y estudiar su efecto en el fenotipo del virus. En los virus de RNA, la obtención de RNAs infecciosos implica la síntesis previa de cDNAs complementarios al RNA genómico mediante RT-PCR, seguida de la clonación y ensamblaje en vectores para su mantenimiento y amplificación en bacterias. A partir del cDNA de un genoma viral completo se puede obtener un RNA infeccioso mediante transcripción *in vitro* o *in vivo*, utilizando vectores de transcripción *in vitro* o de expresión (transcripción *in vivo*). En el primer caso, el cDNA se clona a continuación de un promotor específico reconocido por una RNA polimerasa dependiente de DNA que lleva a cabo la síntesis del RNA viral *in vitro* y éste se puede introducir en la célula hospedadora mediante diversos métodos (lipofección, electroporación, transfección, inoculación mecánica, etc.). En el segundo caso, los cDNAs se clonan bajo el control de promotores constitutivos y se introducen directamente en la célula hospedadora. En el núcleo de ésta se produce la transcripción a partir del promotor eucariótico mediante la RNA polimerasa II celular, y una vez que este RNA viral se traduce en el citoplasma puede iniciar su replicación mediante la replicasa viral. Este último método no requiere la manipulación directa del RNA, más susceptible a la degradación que el DNA, pero como el RNA es sintetizado en el núcleo las secuencias genómicas de virus que replican en el citoplasma pueden ser reconocidas y modificadas por la maquinaria celular de procesamiento de intrones. El promotor más utilizado en este tipo de experimentos es el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

Existen numerosos factores que pueden afectar la infectividad del cDNA o del RNA viral transcrito *in vitro* o *in vivo*. Así, las enzimas que intervienen en los diferentes procesos de síntesis del cDNA y transcripción del RNA viral pueden introducir mutaciones en el genoma viral y

comprometer su infectividad. Por otra parte, es frecuente que las secuencias virales resulten tóxicas e inestables en células procarióticas y que los clones amplificados sufran mutaciones y reorganizaciones de diversa índole que reducen o anulan su infectividad (Ruggli *et al.*, 1996; Polo *et al.*, 1997). En ocasiones se puede mejorar la estabilidad de cDNAs virales en bacterias mediante el cambio de cepa bacteriana o la utilización de un plásmido con un número reducido de copias por célula. Otras veces es necesario recurrir a la división del genoma viral por la zona tóxica y obtener dos clones parciales estables (Rice *et al.*, 1989; Sumiyoshi *et al.*, 1992; Yount *et al.*, 2000, 2002). La introducción de mutaciones que modifican la pauta de lectura cerca de las regiones o secuencias tóxicas, puede reducir la toxicidad, tal y como se observó con clones de CTV (Satyanarayana *et al.*, 2003). Finalmente, se puede impedir la expresión de la proteína tóxica o interrumpir la pauta de lectura de ésta mediante la inserción de uno o más intrones en distintas regiones del cDNA (Johansen, 1996; Yang *et al.*, 1998; Lopez-Moya y Garcia, 2000; Gonzalez *et al.*, 2002; Marillonnet *et al.*, 2005), ya que el RNA viral se sintetiza a partir de un promotor eucariótico en el núcleo de las células y los intrones se eliminan por la maquinaria de procesamiento celular.

Un problema adicional en la obtención de los RNAs infecciosos es la similitud de los extremos del RNA sintetizado con los del genoma parental. A veces la construcción de un cDNA que produzca un RNA con el extremo 5' preciso es incompatible con un buen rendimiento en la transcripción *in vitro*, y al contrario, asegurar un rendimiento de transcripción superior puede implicar que el RNA transcrito lleve en su extremo 5' uno o más nucleótidos no virales que den lugar a una disminución de su infectividad (Boyer y Haenni, 1994). Por otro lado, la precisión del extremo 3' de los transcritos de RNA sintetizados *in vitro* depende del sitio de restricción escogido para linearizar el cDNA antes de la transcripción, por lo que generalmente se incluye algunos nucleótidos extra no virales al final de las secuencias. En el caso de RNAs sintetizados *in vivo*, mientras algunos virus no requieren un procesamiento exacto del extremo 3' de sus RNAs y algunos nucleótidos extra no comprometen su infectividad (Boyer y Haenni, 1994), otros requieren un procesamiento exacto y no toleran ningún nucleótido extra en el

extremo 3'. En el primer caso, la adición de secuencias terminadoras de la transcripción como la del gen de la nopalina sintasa (NOS-T) es suficiente para obtener RNAs viables, mientras que en el segundo caso se puede añadir una secuencia ribozimática como la de la ribozima del virus delta de la hepatitis (*Hepatitis delta virus*, HDV) inmediatamente después del extremo 3' del cDNA viral, de forma que tras la transcripción se libere un RNA con el extremo 3' idéntico al del RNA viral (Dzianott y Bujarski, 1989; Ball, 1992). En cuanto a la precisión del extremo 5', para generar RNAs sin nucleótidos extra no virales se utilizan versiones del promotor 35S del CaMV adecuadamente modificadas (Dessens *et al.*, 1993).

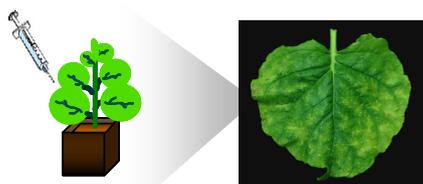
El único sistema genético disponible para CTV al inicio de esta memoria, desarrollado en el laboratorio del Dr. Dawson (University of Florida, C.R.E.C., Lake Alfred, EEUU), se basa en el uso de clones de cDNA bajo el control de promotores fágicos, que permiten sintetizar transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. Los viriones producidos en éstos, convenientemente amplificados mediante pases sucesivos por nuevos lotes de protoplastos, pueden inocularse mecánicamente en cítricos y dan lugar a una infección sistémica con síntomas similares a los del aislado T36 original (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001). Uno de los problemas de este protocolo es que el gran tamaño del genoma de CTV y la toxicidad de algunas de sus regiones génicas reducen extraordinariamente el crecimiento de las bacterias y dificultan mucho la manipulación y mantenimiento de los clones (Satyanarayana *et al.*, 2003). La re-secuenciación de los clones infecciosos iniciales reveló la presencia de una uridina (U) extra entre las posiciones nucleotídicas 3726 y 3731, que producía un cambio en la pauta de lectura y generaba un codón de parada en la posición 3734. La corrección de esta mutación en las construcciones de cDNA produjo un incremento de la infectividad de los transcritos de dos órdenes de magnitud, pero causó un aumento de toxicidad en *E. coli*, donde los clones que no sufrían reorganización necesitaban 3 a 4 días para desarrollar colonias visibles (Satyanarayana *et al.*, 2003). El uso de un minireplicón de T36 con la mayor parte de los genes de la mitad 3' suprimidos permitió obtener mayor infectividad y elevados niveles de replicación en protoplastos, y facilitó

enormemente la disección de las funciones de distintos genes en la replicación y expresión de CTV.

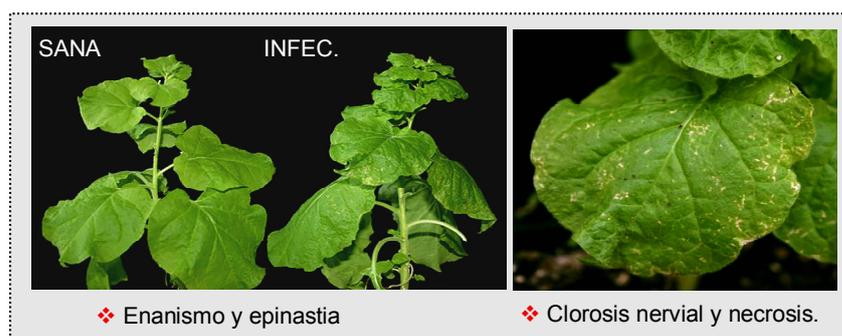
A pesar de los avances obtenidos con el sistema de protoplastos, éste presenta importantes limitaciones que hacían necesario desarrollar un sistema alternativo más eficiente. En particular, la baja infectividad de los transcritos en protoplastos (Gowda *et al.*, 2005), la necesidad de hacer al menos 6 pases a nuevos protoplastos para acumular suficientes viriones para la inoculación de cítricos, y la frecuente contaminación de los cultivos de protoplastos, hacen el sistema muy lento e incierto en sus resultados. Para obviar estas dificultades se iniciaron ensayos dirigidos a utilizar el sistema de expresión de los clones de cDNA de CTV *in vivo*, preparando *cassettes* de expresión en los que el cDNA de CTV se colocaba bajo el control del promotor 35S del CaMV, seguido de una ribozima y del terminador NOS-T para asegurar un procesado correcto de los transcritos. La posterior subclonación de estos *cassettes* en vectores binarios permitía la inoculación directa de plantas mediante agroinfiltración. Numerosos ensayos de agroinfiltración directa de cítricos efectuados con distintas cepas de *A. tumefaciens* en nuestro laboratorio y en el del Dr. Dawson no dieron lugar a infección sistémica ni a expresión detectable del RNA viral en los tejidos infiltrados (Gowda *et al.*, 2005 y Ambrós *et al.*, datos no publicados). En cambio, la co-infiltración de hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transfectados con vectores pCAMBIA portadores del cDNA del genoma completo de CTV, y con el gen *p19* de tombusvirus, que codifica un potente supresor del silenciamiento de RNA (Voinnet *et al.*, 2003), dio lugar a la infección local de algunas plantas y a la producción de viriones normales de CTV (Gowda *et al.*, 2005). Estos resultados se confirmaron en nuestro laboratorio utilizando un vector binario híbrido, de bajo número de copias (tipo BAC), en el que se había subclonado el cDNA completo de T36 con un intrón de patata insertado en la región más tóxica del genoma para estabilizar las construcciones en bacterias (Ambrós *et al.*, 2006). El análisis temporal de la acumulación de CTV en las hojas infiltradas mostró que en nuestras condiciones dicha acumulación aumentaba progresivamente después de los 9 días que Gowda *et al.* (2005) habían utilizado en sus ensayos para detectar

y extraer los viriones. Más aún, se observó que con el tiempo nuestras plantas de *N. benthamiana* mostraban infección sistémica y una sintomatología característica que consistía en enanismo progresivo y epinastia, a partir del primer mes o mes y medio, seguida de clorosis nervial, necrosis de las hojas nuevas y el colapso generalizado y muerte al cabo de los 2-3 meses (Figura 1).

**1) Expresión *in vivo* de clones de cDNA de CTV (aislado T36) mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana***



**2) CTV se acumula e induce una infección sistémica acompañada de síntomas en *N. benthamiana* tras 30-45 DPI**



**3) Los viriones purificados a partir de estas plantas son inoculados mecánicamente en cítricos donde reproducen los síntomas del aislado original.**

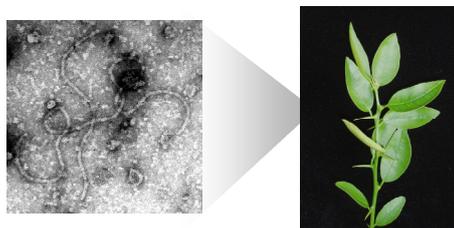


Figura 1. Esquema gráfico de la expresión *in vivo* de clones de cDNA de CTV (aislado T36) mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, posterior purificación de viriones a partir de las plantas infectadas sistémicamente e inoculación de cítricos donde se reproducen los síntomas del aislado original.

La distribución del virus en las plantas infectadas se limitaba inicialmente a los tejidos floemáticos pero con el tiempo se extendía a toda la planta, lo que permitía producir gran cantidad de viriones que tenían elevada infectividad en cítricos y reproducían los síntomas del aislado original. Estos resultados abrían la posibilidad de utilizar un sistema genético para CTV mucho más eficiente (Ambrós *et al.*, 2008 y Ambrós *et al.*, datos no publicados).

Para el estudio de los determinantes genéticos responsables de la producción del síndrome de acanaladuras en la madera de pomelo y naranjo dulce, resultaba más conveniente utilizar un clon de cDNA infeccioso de un aislado que produjese estos síntomas, ya que el aislado T36 produce SY y acanaladuras en la madera de lima Mexicana, pero no de pomelo o naranjo dulce. El objetivo de este capítulo fue la obtención de clones infecciosos de cDNA del aislado de origen español T318A, utilizando las diversas herramientas desarrolladas para el aislado T36.

## **4.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Detección de dRNAs de gran tamaño en plantas infectadas con el aislado T318A**

A partir de 10 g de corteza joven de una planta infectada con el aislado original T318A y de tres propagaciones de ésta, se obtuvieron preparaciones ricas en dsRNA mediante cromatografía en columna de celulosa no iónica tipo CF-11 (Moreno *et al.*, 1990). Los extractos obtenidos se separaron en geles de agarosa-formaldehído al 0.9%, se transfirieron a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche) siguiendo el protocolo previamente establecido (Lewandowski y Dawson, 1998) y se analizaron mediante hibridación molecular tipo Northern-blot utilizando sondas específicas de cRNA de los extremos 5' y 3' del aislado marcadas con digoxigenina (DIG).

#### **4.2.2. Caracterización molecular de una familia de dRNAs de gran tamaño presentes en el aislado T318A**

Las regiones genómicas adyacentes al punto de recombinación de los dRNAs de mayor tamaño detectados en el aislado T318A se amplificaron mediante RT-PCR utilizando extractos ricos en dsRNA, previamente desnaturalizados con hidróxido de metil mercurio y la pareja de cebadores PM180D-PM2/37R (Tabla1). La reacción de RT se realizó a 60°C con la retrotranscriptasa TS y la amplificación del DNA mediante PCR con la enzima *Pfu* Hotstart DNA polymerase (Stratagene) utilizando 1 µl del cDNA sintetizado y los siguientes ciclos térmicos: desnaturalización inicial de 2 min a 92°C, 10 ciclos de 10 s a 92°C, 20 s a 60°C y 5 min a 68°C, 28 ciclos de 10 s a 92°C, 20 s a 65°C y 5 min a 68°C para el primer ciclo y un incremento de 10 s/ciclo para los sucesivos, y una extensión final de 10 min a 68°C.

Los productos de PCR procedentes de cada una de las plantas analizadas se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, se purificaron con el estuche comercial ULTRACLEAN™ 15 DNA Purification (MO BIO) y se clonaron individualmente en vectores tipo pUC19 de extremos romos (Fermentas). Para cada producto de PCR de tamaño diferente se seleccionaron tres clones y se secuenciaron en ambas direcciones utilizando un secuenciador ABI PRISM DNA 377 (PE Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia completa del aislado T318A original realizando alineamientos múltiples con el programa ENMA (CLUSTAL W interface).

#### **4.2.3. Aislamiento y transfección de protoplastos de *Nicotiana benthamiana* con viriones de CTV**

Con objeto de comprobar si los viriones procedentes de plantas infectadas con el aislado T318A eran capaces de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana*, se aislaron protoplastos de mesófilo de esta especie para inocularlos con viriones de CTV. Un total de 4-5 hojas expandidas se

sumergieron en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5-7 min, se lavaron con agua estéril y se cortaron con un bisturí en pequeñas secciones de 1-2 mm a lo largo de la hoja. Las hojas cortadas se incubaron durante toda la noche en una solución enzimática que contenía 0.50% de celulasa (Onozuka Cellulase RS, Yakult Onza, Japón) y 0.25% de pectinasa (Macerase Pectinase, Calbiochem, USA) y al día siguiente se aislaron los protoplastos siguiendo el protocolo de Navas-Castillo *et al.* (1997).

Los viriones de CTV se obtuvieron a partir de corteza joven de plantas infectadas con el aislado T318A y con otros aislados control como T36, T305 y T385 pulverizada con nitrógeno líquido e incubada con tampón fosfato 40 mM a pH 8.2 (1:5 g/ml) durante 15 min en hielo. A continuación, lotes que contenían de 1 a 1.5 millones de protoplastos se inocularon con 100 µl de extracto de planta infectada con cada uno de los aislados siguiendo el protocolo de Mawassi *et al.* (2000b) y se incubaron en oscuridad durante un máximo de 5 días a una temperatura de 24-25 °C. Tras este período se aisló RNAt de los protoplastos con 400 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS) y realizando dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25v:24v:1v), seguidas de una precipitación con etanol absoluto. Los extractos de RNAt se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 0.9%, se transfirieron a una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche) y se analizaron mediante hibridación molecular en formato Northern-blot con una sonda específica de RNA-DIG del extremo 3' del aislado T318A. La cinética de acumulación de viriones de T318A en protoplastos de *N. benthamiana* se estudió analizando diariamente el RNAt durante los cinco días posteriores a la transfección.

#### 4.2.4. Construcción y ensayo de infectividad de minireplicones de cDNA de T318A basados en dRNAs de gran tamaño

##### 4.2.4.1 Obtención de minireplicones de T318A en vectores de transcripción *in vitro*

Las secuencias de cDNA basadas en los dRNAs de T318A se clonaron bajo el control del promotor del bacteriófago T7 en el vector de transcripción 2.0 (amablemente cedido por el Dr. Andrew Ball, Universidad de Alabama, Birmingham) para poder sintetizar transcritos de RNA *in vitro*. El vector 2.0 es un vector plasmídico de alto número de copias derivado de pUC que contiene la secuencia del promotor del fago T7 seguida de dos G, de los sitios de restricción *StuI* y *SmaI*, de la secuencia antigenómica de la ribozima del virus delta de la hepatitis (*Hepatitis delta virus*, HDV) y de la secuencia terminadora del fago T7 (Pattnaik *et al.*, 1992) (Figura 8A).

Los tres cDNAs RT1, RT2 y RT3 basados en los dRNAs de T318A se sintetizaron mediante retrotranscripción con TS a 60°C utilizando los cebadores PM142R, PM195R y PM193D (para RT1, RT2 y RT3, respectivamente) (Tabla 1) y dsRNA de T318A desnaturalizado con hidroximetil mercurio. A partir de los cDNAs se amplificaron mediante PCR tres fragmentos solapantes de DNA de gran tamaño (A, B y C) que cubrían cada uno de los tres dRNAs (Figura 7). La amplificación se llevó a cabo utilizando alícuotas de 0,5-1 µl de cada uno de los cDNAs, cebadores específicos de T318A (Tabla 1) y la enzima *Pfu* Hotstart DNA polymerase (Stratagene) en las condiciones recomendadas por el fabricante para obtener la máxima fidelidad de copia. El fragmento A (6.7 kb) se amplificó a partir del cDNA RT1 con la pareja de cebadores PM192D-BD11R (que incorpora en su extremo 5' el sitio de restricción *ApaI*) (Tabla 1) utilizando una desnaturalización inicial a 92°C durante 2 min, 10 ciclos de 15 s a 92°C, 20 s a 65°C y 10 min a 68°C, 28 ciclos de 15 s a 92°C y 10 min a 68°C el primer ciclo y un incremento de 10s/ciclo en los ciclos sucesivos, y una extensión final de 10 min a 68°C; los fragmentos B (3.2 kb) y C (1.3-2.5 kb, dependiendo del dRNA) se amplificaron a partir de los cDNAs RT2 y RT3 con las parejas de cebadores

BD1-BD2 y PM193D-PM2/37R, respectivamente, utilizando ciclos térmicos similares a los del fragmento A salvo que las extensiones de cada ciclo fueron de 5 min a 68°C para el primero de los ciclos y un incremento de 5 s/ciclo en los ciclos sucesivos. Los fragmentos de DNA sintetizados se purificaron con el estuche comercial ULTRACLEAN™ 15 DNA Purification (MOBIO) y se clonaron sucesivamente en el vector de transcripción 2.0 previamente digerido con *SmaI* (que deja extremos romos) y desfosforilado con fosfatasa Antártica (New England Biolabs) según el esquema de la Figura 8B. Los plásmidos portadores de las distintas construcciones se utilizaron para transfectar células competentes de *E. coli* de la cepa JM109 mediante choque térmico. En primer lugar, se clonó el fragmento C con extremos romos previamente fosforilados con la polinucleótido kinasa (PNK, New England Biolabs). Se seleccionaron un total de 5 clones para cada dRNA y se utilizó una mezcla de éstos como vector base para la siguiente clonación. Los vectores con el fragmento C se digirieron con las enzimas de restricción *Apal* y *Stul* (que deja extremos romos) para clonar el fragmento A previamente digerido con *Apal*. Se seleccionaron a su vez 5 clones para cada dRNA y una mezcla de éstos se digirió con *Stul* y *Apal* para clonar el fragmento B previamente digerido con estas mismas enzimas (Figura 8B). Finalmente, se seleccionaron un total de 32 clones de longitud completa para el dRNA 1, 8 para el dRNA 2 y 7 para el dRNA 3.

#### **4.2.4.2 Síntesis de transcritos de RNA *in vitro* e inoculación de protoplastos de *Nicotiana benthamiana***

Un total de 12 clones basados en el dRNA 1 de T318A, 6 del dRNA 2 y 6 del dRNA 3 se utilizaron para la síntesis de transcritos de RNA *in vitro* usando la T7 RNA polimerasa (New England Biolabs) y las condiciones previamente descritas (Satyanarayana *et al.*, 1999). La transfección de protoplastos de *N. benthamiana* se realizó con ~10 µg de transcritos de RNA procedente de cada uno de los dRNAs incluyendo como control un minireplicón de T36 en el que suprimió la región comprendida entre la ORF 2 a la ORF 11 (Satyanarayana *et al.*, 1999). La infectividad de los clones se

evaluó mediante hibridación tipo Northern-blot con sondas RNA-DIG específicas de T318A en comparación con el minireplicón control de T36.

#### **4.2.4.3 Obtención de minireplicones de T318A en vectores de expresión *in planta***

##### **4.2.4.3.1 Adición de un intrón de planta**

El intrón IV2 del gen ST-LS1 de patata (Eckes *et al.*, 1986; GenBank accession no. X04401) se introdujo interrumpiendo la ORF 1a de los cDNAs derivados de T318A siguiendo una estrategia de PCR solapante (Figura 9). Para ello, se obtuvieron 3 productos de amplificación: 2 fragmentos de DNA (A1 y A2) que cubrían las primeras 6.1 kb de la secuencia del aislado T318A, obtenidos mediante RT-PCR, y un fragmento de DNA de 189 pb sintetizado por PCR que correspondía a la secuencia del intrón IV2 del gen ST-LS1 de patata en la versión modificada por Vancanneyt *et al.* (1990). Para obtener los fragmentos A1 y A2 se sintetizó un único cDNA con la TS a 60°C utilizando el cebador PM270R y dsRNA desnaturalizado con hidróxido de metil mercurio. Los fragmentos A1 (4.3 kb) y A2 (1.8 kb) se amplificaron por PCR a partir del cDNA con las parejas de cebadores PM192D-PM266R y PM271D-BD11R, respectivamente (ver Tabla1). El fragmento de DNA correspondiente al intrón de patata se amplificó mediante PCR con las parejas de cebadores PM267D-PM268R a partir del plásmido 35S-pGUS intrón (Vancanneyt *et al.*, 1990). Los cebadores PM266R y PM271D anillan en sus extremos 3' con las secuencias 3'-terminal de A1 (25 nt) y 5'-terminal de A2 (30 nt), respectivamente, y en sus extremos 5' con las secuencias 5'-terminal (21 nt) y 3'-terminal (23 nt), respectivamente, del intrón (Figura 9A y 9B). De la misma forma, los cebadores PM267D y BD268R que amplifican el intrón, anillan en sus extremos 3' con los dos extremos del intrón (21 o 25 nt, respectivamente) y en sus extremos 5' con las secuencias 3'-terminal del fragmento A1 (21 nt) y 5'-terminal del fragmento A2 (16 nt), respectivamente. Con los fragmentos amplificados A1, A2 e Intrón (Int) se generó un primer producto de fusión mediante PCR de extensión entre el fragmento A2 y el

intrón (A2 + Int) utilizando la enzima TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa) y los siguientes ciclos térmicos: desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, 6 ciclos de 10 s a 98°C, 1 min a 60°C, 3 min a 68°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. A continuación, el fragmento fusionado A2 + Int se amplificó por PCR utilizando alícuotas de 0,5-1 µl del producto de extensión, la enzima *Pfu* Hotstart DNA polymerase (Stratagene), la pareja de cebadores PM267D-BD11R y unas condiciones similares a las anteriores. Por último, el fragmento A1 se incorporó al producto A2 + Int mediante una PCR de extensión con ambos fragmentos y alícuotas de este producto (A1+ A2 + Int) se amplificaron de forma similar a la descrita para A2 + Int utilizando los cebadores externos PM192D y BD11R.

#### **4.2.4.3.2. Preparación de las construcciones para la expresión *in planta***

Para obtener construcciones de cDNA de los minireplicones de T318A, se generaron mediante RT-PCR dos fragmentos de DNA denominados B y C (ver apartado 4.2.4.1.), que junto con el fragmento A1 + Int + A2 obtenido en 4.2.4.3.1., cubrían la longitud completa de los dRNAs. Los fragmentos de DNA solapantes sintetizados para cada dRNA (A + Int + A2, B y C) se purificaron como habitualmente y se clonaron de forma sucesiva en el vector 35S-8 modificado (Ambrós *et al.*, datos no publicados y Vives *et al.*, 2008). El vector 35S-8 es un pUC19 modificado que contiene la secuencia del promotor 35S (35S x 2) del CaMV (amplificada a partir del plásmido p35Se-NOS B amablemente cedido por el Dr. Juan José López Moya) seguida de dos G, de los sitios de restricción *Stu*I y *Sma*I, de la secuencia antígenómica de la ribozima del virus delta de la hepatitis (*Hepatitis delta* virus, HDV) (amplificada a partir del vector de transcripción 2.0) y de la secuencia del terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS-T) (amplificada a partir del vector pBl 101) (Figura 10A). Este *cassette* de expresión bajo 35S está flanqueado por dos sitios de restricción *Not*I que permiten liberarlo por completo.

El vector 35S-8 se digirió con *Sma*I (que deja extremos romos), se purificó y se desfosforiló como habitualmente para poder clonar el fragmento C. Se seleccionaron un total de 5 clones para cada dRNA y se utilizó una mezcla de éstos como vector base para la siguiente clonación. Esta mezcla de clones se digirió con la enzima de restricción *Stu*I (que deja extremos romos) para clonar el fragmento de fusión A1 + Int + A2, y una mezcla de 5 clones de cada dRNA se digirió con las enzimas *Stu*I y *Apa*I para clonar el fragmento B previamente digerido con estas enzimas. Todas las ligaciones se transformaron en células competentes de la cepa JM109 de *E. coli* mediante choque térmico. Finalmente, se seleccionaron un total de 14 clones de longitud completa para el dRNA 1 (35S-T318AdRNA1) y 8 para el dRNA 2 (35S-T318AdRNA2) (Figura 10B).

#### **4.2.4.3.3. Subclonación de las construcciones en vectores BAC para la expresión *in planta***

Un total de 5 clones de cDNA completos de cada dRNA (clones 35S-T318AdRNA1 y 35S-T318AdRNA2) se digirieron con la enzima de restricción *Not*I para liberar los *cassettes* de expresión completos y poder subclonarlos en un vector binario de tipo BAC (pCH20) previamente digerido con *Not*I. El vector pCH20, amablemente cedido por la Dra. Hamilton de la Cornell Research Foundation, es un vector de gran tamaño (23 kb) con secuencia híbrida de plásmido binario y cromosoma artificial de bacteria (BAC) (Figura 11A). El vector pCH20 fue modificado para clonar en su T-DNA la secuencia del *cassette* de expresión del gen marcador GUS-intrón presente en los vectores pCAMBIA y obtener así el vector modificado pCH20-(3)-GUSInt (Ambrós *et al.*, datos no publicados) (Figura 11B), en el que se subclonaron los *cassettes* de expresión preparados previamente (Figura 11C). Con las mezclas de ligación se transformaron células competentes de la cepa DH10B de *E. coli* mediante electroporación y se seleccionaron un total de 11 clones BAC-T318AdRNA1 y 12 clones BAC-T318AdRNA2) en placas de cultivo de LB con 50 mg/l de kanamicina y sacarosa al 5%.

**4.2.4.3.4. Agroinfiltración de *N. benthamiana* con vectores BAC-CTV**

Los clones de los dRNAs 1 y 2 obtenidos en el vector pCH20-(3)-GUSInt se utilizaron para transfectar 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* (amablemente proporcionado por la Dra. Hamilton, de la Cornell Research Foundation). Colonias individuales de bacterias transfectadas se cultivaron a 28°C durante la noche en un medio líquido LB (Luria-Bertani) que contenía 50 mg/l de kanamicina y 5 mg/l de tetraciclina. Estos cultivos se utilizaron para inocular 50 ml de medio de inducción (LB con 10 mM de MES, 20 µM de acetosiringona y 5 mg/l de tetraciclina) que se incubó a 28°C durante toda la noche. Estos cultivos se centrifugaron, se resuspendieron las células en el medio de infiltración (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES y 150 µM de acetosiringona) ajustando la concentración a una DO<sub>600</sub> de 1 (salvo indicación contraria) y se incubaron entre 3 y 5 h a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, las suspensiones bacterianas se co-infiltraron en los espacios intercelulares de hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* transfectados con un plásmido binario portador del gen *p19* del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), que codifica un potente supresor del silenciamiento de RNA (Voinnet *et al.*, 2003), en una proporción de 2:1 (cultivo clon CTV: supresor). Se infiltraron un total de 3 plantas por clon y ensayo en dos ensayos independientes, incluyendo como control el minireplicón obtenido para el aislado T36 en vectores BAC (BAC-CTV-T36MiniR, Ambrós *et al.*, datos no publicados).

A los 7, 14, 21 y 28 días post-inoculación (DPI) se extrajo RNA<sub>t</sub> siguiendo el protocolo habitual (apartado 4.2.3) y se analizó la expresión de las construcciones en plantas individuales mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (ver siguiente apartado 4.2.5) e hibridación en formato Northern-blot.

#### 4.2.5. Detección y cuantificación de dRNAs de T318A mediante RT-PCR a tiempo real

**Diseño de los cebadores.** Con el fin de poner a punto un ensayo de RT-PCR a tiempo real para detectar y cuantificar los dRNAs de T318A, se diseñó la pareja de cebadores PM274F-PM275R, que anillan en secuencias conservadas de la ORF 11 (p23) de CTV (Tabla 1) utilizando el programa Primer Express y un alineamiento múltiple de todas las secuencias completas del gRNA de CTV disponibles en la base de datos, que corresponden a los aislados T36 y T30 de Florida (U16034 y AF260651), VT de Israel (U56902), T318A y T385 de España (DQ151548 y Y18420), SY568 de California (AF001623), NUagA de Japón (AB046398), Qaha de Egipto (AY340974) y un aislado Mexicano (DQ272579). La secuencia nucleotídica de la pareja de cebadores PM274D-PM275R es idéntica a la de los aislados agresivos T318A y NUagA, pero los aislados agresivos SY568 y VT tienen un desapareamiento en el cebador PM275R y los aislados T36, Qaha, T385 y T30 presentan uno o dos desapareamientos en PM274D y PM275R, respectivamente (Tabla 1).

**Extracción de RNA.** Se extrajo RNA total (RNA<sub>t</sub>) a partir de 0.1 g a 0.3 g de tejido fresco de *N. benthamiana* con un protocolo estándar que consiste en dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguidas de una precipitación con cloruro de litio 8.4 M (Ancillo *et al.*, 2007). Los extractos de RNA<sub>t</sub> se resuspendieron en 25 µl de agua libre de RNasas y una alícuota se trató con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion). Las concentraciones del RNA<sub>t</sub> tratado con DNasa se ajustaron aproximadamente a 10 ng/µl y se midieron por duplicado utilizando el estuche comercial Quant-iT™ RiboGreen Assay Kit (Invitrogen). Las alícuotas se guardaron a -80°C.

**Preparación de una curva estándar.** Para poder determinar el número absoluto de dianas de p23 en extractos vegetales de RNA<sub>t</sub>, se sintetizaron transcritos *in vitro* del RNA diana y se utilizaron diluciones seriadas de los mismos en ensayos de RT-PCR a tiempo real para generar curvas estándar (Figura 14A). El cDNA utilizado como molde para la

transcripción *in vitro* se obtuvo mediante RT-PCR usando la pareja de cebadores PM274F-T7/PM275R (Tabla 1) y extractos de RNAt de hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas con los diferentes clones de cDNA del minireplicón de T318A o con el minireplicón de T36. El cebador PM274-T7 es una versión modificada del iniciador PM274F que incluye la secuencia del promotor T7 en su extremo 5' (Tabla 1). A partir del producto amplificado por PCR se sintetizaron directamente transcritos *in vitro* de RNA de cadena positiva utilizando la T7 RNA polimerasa (New England BioLabs) y las condiciones recomendadas por el fabricante. Los transcritos se purificaron con el estuche comercial RNaid w/Spin (Q-BIO gene), se trataron dos veces con DNasa libre de RNasas (Turbo DNA-free, Ambion), se estimó su concentración dos veces usando el estuche comercial Quant-iT™ RiboGreen Assay Kit (Invitrogen) y se prepararon diluciones seriadas (1/10) que contenían de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias de RNA en extractos de RNAt de *N. benthamiana* sana (10 ng/μl). Las alícuotas de las diluciones se guardaron a -80°C hasta su uso. La concentración del transcrito de RNA (pmol) en cada dilución se calculó con la fórmula:  $\mu\text{g de transcrito de RNA} \times (10^6 \text{ pg}/1\mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol}/340 \text{ pg}) \times (1/\text{número de bases del transcrito})$ , y el número de copias de RNA utilizando este valor de concentración y la constante de Avogadro.

Para asegurarse de la ausencia de molde de DNA en las preparaciones de transcritos se llevaron a cabo en paralelo reacciones de RT-PCR a tiempo real con y sin retrotranscriptasa. Se construyeron curvas estándar para el aislado T318A representando los valores del ciclo umbral (Ct) de cuatro ensayos independientes con dos réplicas por dilución con respecto al logaritmo de la dilución. La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la pendiente de la correspondiente curva utilizando la fórmula  $10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})}$  o la misma fórmula x 100 (cuando se da el valor como un porcentaje).

**RT-PCR a tiempo real.** La reacción de RT-PCR a tiempo real se desarrolló en la plataforma LightCycler® de Roche utilizando capilares de vidrio de 20 μl, y 10 μl de una mezcla de reacción que contenía: 2 μl de LightCycler® FastStart DNA MASTER<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche), 4.7 μl de agua libre de RNasas, 0.05 μl de retrotranscriptasa RT MultiScribe (Applied

Biosystems), 0.05 µl de Inhibidor de RNAsas (Applied Biosystems), 0.3 µM de cada cebador y 2 µl del extracto de RNAt (~10 ng RNA/µl). Se incluyeron en cada ronda de RT-PCR controles como RNAt de *N. benthamiana* sana, agua en lugar de extracto de RNAt, y por lo menos dos diluciones de transcritos de RNA de la curva estándar. Cada muestra problema de planta se analizó en duplicado en dos ensayos independientes de RT-PCR a tiempo real.

El programa térmico incluyó una etapa de retrotranscripción a 48°C durante 30 min, una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 2 s a 95°C, 10 s a 60°C y 15 s a 72°C. Se añadió un cuarto segmento de 2 s a 82°C después de la etapa de extensión para obtener medidas de fluorescencia que minimizaran la interferencia de dímeros de cebadores u otros productos de amplificación inespecíficos. La síntesis de un único producto de DNA del tamaño deseado se confirmó mediante análisis de las curvas de fusión utilizando el programa del LightCycler y mediante separación electroforética de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% y posterior tinción con bromuro de etidio.

#### **4.2.6. Construcción y ensayo de infectividad de clones de cDNA de longitud completa de T318A**

##### **4.2.6.1. Obtención de clones de cDNA de longitud completa de T318A en vectores de expresión *in planta***

Para obtener los clones de longitud completa de T318A, se digirieron una mezcla de minireplicones de cDNA del dRNA 1 con las enzimas de restricción *Apal* y *BamHI*, ambas de corte único en la secuencia de T318A y no presentes en la secuencia del vector, y se les insertó la región central del genoma digerida con estas mismas enzimas. La amplificación de esta región se realizó mediante RT-PCR en dos fragmentos (D y E) (Figura 16). La síntesis del cDNA se efectuó con el cebador PM193D, utilizando TS a 60°C y dsRNA de T318A desnaturalizado con hidroximetil mercurio. La amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando alícuotas de 0,5-1 µl del cDNA, la enzima *Pfu* Hotstart DNA polymerase (Stratagene) y las parejas de

cebadores PM193D-PM191R para la síntesis del fragmento D (2.4 kb) o PM133D-PM194R para la del fragmento E (6.5 kb). El fragmento A se fosforiló con la T4 polinucleotido kinasa (NEB), se ligó en el vector pUC19 linearizado con *Sma* I (Fermentas Life Sciences) y éste se utilizó para transfectar por electroporación células de *E. coli* JM109. Un total de 5 clones se digirieron con la enzima de restricción *EcoRV*, con punto de corte en el extremo 3' del fragmento D, y se ligaron con el fragmento E previamente fosforilado y digerido con la misma enzima. Una mezcla de 10 clones se digirió con las enzimas de restricción *Apal* y *Bam*HI y el fragmento D-E así escindido se subclonó en los minireplicones del dRNA 1 previamente digeridos con las mismas enzimas.

#### **4.2.6.2. Subclonación de las construcciones en un vector BAC y agroinfiltración en *N. benthamiana***

El *cassette* de expresión con el cDNA del genoma completo de T318A se subclonó en el vector BAC como se ha indicado en el apartado 4.2.4.3.3. de este capítulo. Se seleccionaron un total de 21 clones denominados BAC-T318AFL. La transfección de células de *A. tumefaciens* y la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con los cultivos transfectados se efectuaron como se ha descrito en el apartado 4.2.4.3.4. Generalmente las plantas se co-infiltraron con un cultivo transfectado con clones de CTV T318A (individuales o mezclas de cultivos de dos clones a partes iguales) y otro similar para expresar el supresor de silenciamiento p19 en una proporción de 2:1 (clon/mezcla de clones de CTV:supresor p19). Sin embargo, en un experimento se co-infiltraron clones de los aislados T318A (BAC-T318AFL) y T36 (BAC-T36FL) junto con el supresor de silenciamiento p19 en las proporciones 1:1:1.

Se extrajo RNAt de las plantas infiltradas a los 7, 14, 21 y 28 DPI como se indica en el apartado 4.2.4.3.4 y la expresión de las construcciones se detectó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (siguiendo el protocolo de detección general desarrollado en el segundo capítulo de esta memoria) y mediante hibridación molecular tipo Northern-blot. En el

experimento de co-inoculación de T318A y T36 la expresión de cada genotipo se analizó por separado utilizando el protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real con sondas TaqMan LNA desarrollado en el tercer capítulo de esta memoria.

Tabla 1. Secuencia y posiciones de los cebadores utilizados en las amplificaciones de RT-PCR sobre el gRNA de T318A.

Región	Cebadores <sup>a</sup>	Secuencia Nucleotídica 5' - 3' <sup>b</sup>	Posiciones
3' UTR	PM2/37R	TGGACCTATGTTGGCCCCCATAGGGACAGTGTGTTG	19260-19296
5' UTR	PM192D	AATTTCTCAAATTCACCCGTACCCTCCG	1-28
ORF 1a	PM142R	TTCTTGACGTTATGTCACGTGCGACGGGATA	7792-7823
ORF 1a	PM193D	GTTTTGAATAGCAGGAGATACGACAAGACCGCTTCCA	9036-9073
ORF 1a	BD1D	GGGGAGTGGTCTTAGCAAACGTGTGAGGGCGC	5823-5853
ORF 1a	BD11R	CCTATTACACAACCTCGTAACGCAACGGGGAG	6564-6596
ORF 1b	PM195R	GTCTCTACTAACAACCTCAATTTCTCTAAGACCACC	10503- 10538
ORF 1b	PM180D	GCTAGGGCTACCACGTTAGA	10075-10094
ORF 1b	BD2R	CCAACCCAGCGTTCGTCATTTTCGGTAAAGACAC	9865-9898
ORF 1a	PM267D	CCGCGGCGTGAAAGGTAGgtaagttctgcttctacc	4139-4157
ORF 1a	PM266R	ccatctctgctttgaatgGATGGAAAGTGCGGGCGCCTGTC	4135-4157
ORF 1a	PM271D	ccaaaatttgatgtgtagcGCAGAACGCAGAAGCGTTTTCTAGGCG	4158- 4185
ORF 1a	PM268R	CGAAGACGCAAGACGgacgtgtagtggttaaaaccag	4158-4172
ORF 2	PM133D	AACGGGACTCATAAAATTCGAGCGCACGTGCATAATCA	11096-11133
ORF 9	PM194R	TTCTGGATCCGCTTATTACGCAACAGGATTTTCATTCTG	17577- 17608
ORF 11	PM274D	GGTTGATTTGGCCGCTGAA	18757-18775
ORF 11	PM274D-T7	<i>TTAATACGACTCACTATAGGGGTTGATTTGGCCGCTGAA</i>	18757-18775
ORF 11	PM275R	CAGCGTTGATGTCCGGTAACA	18867-18887

<sup>a</sup> D indica sentido mensajero (directo) y R antisentido (reverso).

<sup>b</sup> Caracteres en minúscula o en cursiva indican secuencias del intrón IV2 del gen ST-LS1 de patata y secuencia del promotor T7, respectivamente.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Detección y caracterización molecular de dRNAs de gran tamaño de T318A

Extractos de dsRNA de cuatro plantas infectadas con el aislado T318A, una infectada con el aislado original y tres propagaciones de ésta, se analizaron mediante hibridación tipo Northern-blot con sondas específicas de RNA-DIG de ambas polaridades de los extremos 5' y 3' del gRNA de T318A. El análisis reveló además del gRNA (~19.3 kb), varios RNAs de gran tamaño (10-13 Kb) que reaccionaban con las sondas de ambos extremos y por tanto correspondían a moléculas de dRNA (Figura 2A). En todas las plantas analizadas se detectaron dos o tres dRNAs de este tipo (Figura 8 del capítulo 1 y Figura 2A de este capítulo), si bien el nivel de acumulación de éstos varió a lo largo del tiempo (datos no mostrados).

Para caracterizar molecularmente estos dRNAs nos basamos en la estructura de los descritos previamente en el aislado VT (Che *et al.*, 2002), asumiendo que los detectados en T318A pudieran tener una organización similar. Los dRNAs de gran tamaño de VT poseen todos los genes necesarios para replicarse autónomamente, ya que contienen las ORFs 1a y 1b completas en la porción 5' terminal y el extremo 3' UTR y parte de la ORF 11 en la porción 3' terminal. Para caracterizar la zona de fusión de los dRNAs de T318A se obtuvieron cDNAs específicos mediante RT-PCR utilizando extractos de dsRNA de las tres propagaciones infectadas con este aislado y una pareja de cebadores que anillan dentro de la ORF 1b y en el extremo 3' UTR (Tabla 1). Los productos de amplificación procedentes de cada planta se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y en todos los casos se observó un perfil de tres bandas diferentes, con migración similar en las distintas plantas pero con intensidad variable (Figura 2B). A partir de una planta en la que las tres bandas tenían una intensidad similar, se purificó y clonó cada uno de los productos y se secuenciaron tres clones de cada amplicón. La secuencia de los tres clones fue idéntica en todos los

casos y permitió caracterizar la zona de recombinación de los tres dRNAs de gran tamaño detectados.

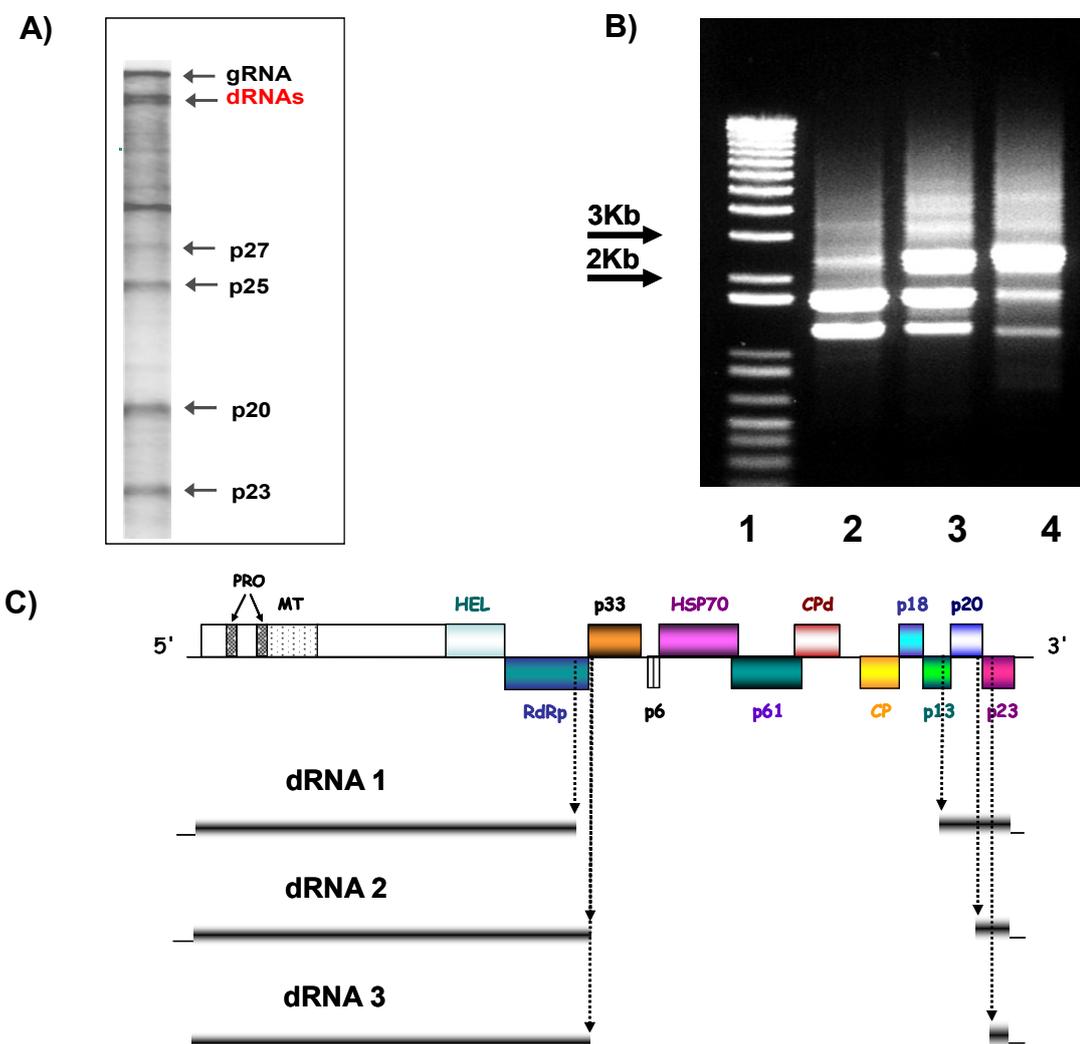


Figura 2. A) Análisis tipo Northern-blot de dsRNA de una planta infectada con T318A. La membrana se hibridó con una sonda RNA-DIG de polaridad negativa del extremo 3' del aislado. Las flechas indican la posición del gRNA, diferentes dRNAs de gran tamaño y algunos sgRNAs 3' co-terminales. B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de dsRNA de tres plantas infectadas con T318A utilizando la pareja de cebadores PM180D-PM2/37R. Los carriles 2-4 corresponden a tres plantas infectadas con el aislado T318A y el carril 1 al marcador de DNA (1 kb plus ladder, Invitrogen). C) Representación del genoma de CTV (ver detalles en Figura 6 de la Introducción general). En la parte inferior se muestra un esquema de la posible organización genómica de los dRNAs de T318A. Las flechas verticales delimitan las regiones génicas que faltan en cada caso.

El dRNA 1 tendría una longitud de 12535 nt, con una región de 10800 nt en el lado 5' del punto de recombinación, que comprendería el extremo 5' UTR y la ORF 1 excepto los últimos 12 nt de la ORF 1b, y otra de 1735 nt en el lado 3' que comprendería parte de la ORF 9, las ORFs 10 y 11 completas y el extremo 3' UTR (Figura 2C).

El dRNA 2 tendría una longitud de 11754 nt, con una región 5' de 10818 nt compuesta por el extremo 5' UTR y las ORFs 1a y 1b completas, y una región 3' de 936 nt que incluye parte de la región intergénica (R.I.) entre las ORFs 10 y 11, toda la ORF 11 y el extremo 3' UTR (Figura 2C). Este dRNA poseería todos los genes necesarios para la replicación autónoma, aunque al tener interrumpida la secuencia promotora necesaria para la expresión de la ORF 11, cabría esperar que su replicación no generara ningún sgRNA.

Por último, el dRNA 3 tendría una longitud de 11333 nt, con una región 5' de 10816 nt que comprendería el extremo 5' UTR y las ORFs 1a y 1b completas, y una región 3' de 517 nt que comprendería parte de la ORF 11 y el extremo 3' UTR (Figura 2C). Como los dRNAs anteriores tendría todos los genes necesarios para una replicación autónoma y al igual que el dRNA 2 tampoco expresaría ningún sgRNA.

La comparación entre la secuencia de los dRNAs de T318A y las correspondientes regiones genómicas del gRNA mostró que eran colineares y presentaban una identidad nucleotídica del 100% en todos los casos. La organización genómica de estos tres dRNAs, es por tanto similar a la descrita por Che *et al* (2003) para el grupo 1 de dRNAs de VT. Por otra parte, la caracterización de las zonas del genoma próximas al punto de unión de los dRNAs de T318A mostró la presencia de grupos de 2 a 4 nucleótidos repetidos en las dos regiones del genoma en que se produjo la recombinación, que no forman parte de la unión pero están muy próximos a ella (ver Figuras 3B, 4B y 5B), de forma similar a la observada previamente en otros dRNAs de menor tamaño (Ayllón *et al.*, 1999a). La estructura secundaria de mínima energía libre proporcionada por el programa MFOLD para las regiones del gRNA que flanquean el sitio de recombinación de cada dRNA (Figuras 3A, 4A y 5A) mostró que el nucleótido donde se libera la

polimerasa se encuentra en un tallo en el dRNA1 y en un bucle en los dRNAs 2 y 3 de la estructura secundaria, mientras que el nucleótido donde se reinicia la síntesis se encuentra en un bucle en el dRNA 1 y en un tallo en los dRNAs 2 y 3 (Figura 3A, 4A y 5A).

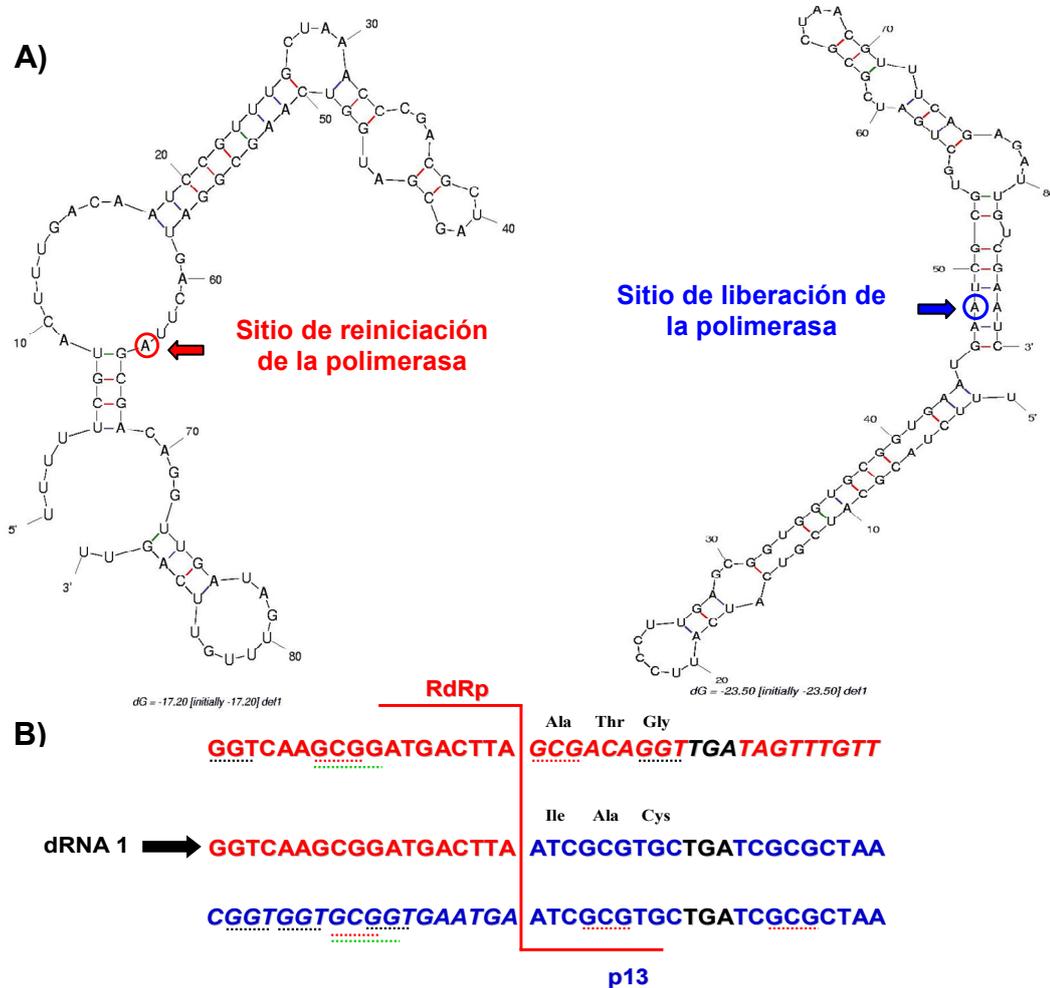
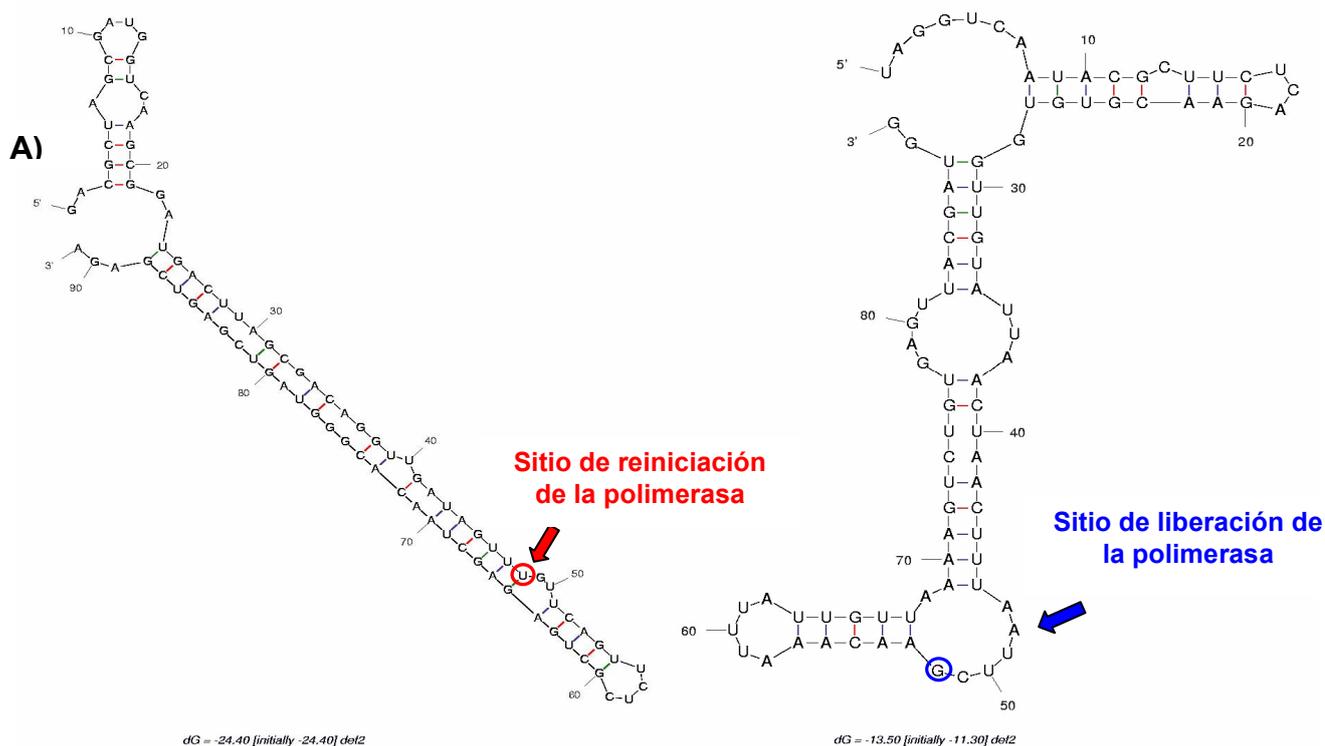


Figura 3. A) Estructuras secundarias de mínima energía libre predichas con el programa MFOLD para las regiones génicas que flanquean el punto de unión del dRNA 1 en el lado 5' (izquierda) y 3' (derecha). Se indican en colores azul y rojo los nucleótidos de liberación y reinicio de la polimerasa, suponiendo que la recombinación ocurre durante la síntesis de la cadena negativa. B) Arriba y abajo se muestran las regiones de las ORFs 1b (RdRp) y 9 (p13), del gRNA próximas al punto de recombinación. En medio se muestra la secuencia obtenida para el dRNA 1 en la zona de fusión. La línea quebrada de color rojo indica el punto de recombinación entre estas regiones. Los nucleótidos del gRNA no pertenecientes al dRNA se indican en *itálicas* y las repeticiones de nucleótidos en ambas mitades del genoma próximas al punto de unión se han subrayado en diferentes colores. Sobre la secuencia de la RdRp se indica en negro el codón de parada.



**R. I. RdRp-p33**

**B)**

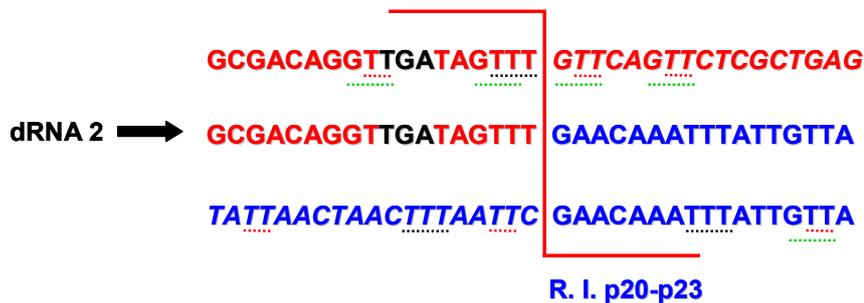


Figura 4. A) Estructuras secundarias de mínima energía libre predichas con el programa MFOLD para las regiones génicas del dRNA 2 que flanquean el punto de unión en el lado 5' (izquierda) y 3' (derecha). Se indican en colores azul y rojo los nucleótidos de liberación y reinicio de la polimerasa, suponiendo que la recombinación ocurre durante la síntesis de la cadena negativa. B) Arriba y abajo se muestran las regiones intergénicas (R.I.) entre las ORF 1b (RdRp) y la ORF 2 (p33) o entre las ORFs 10 (p20) y 11 (p23), respectivamente, del gRNA próximas al punto de recombinación. En medio se muestra la secuencia obtenida para el dRNA 2 en la zona de fusión. En el esquema superior de la R. I. entre las ORFs 1b y 2 y en el del dRNA 2 (en medio) se muestran en color negro los nt del codón de parada de la ORF 1b. Para el resto de detalles ver la Figura 3.

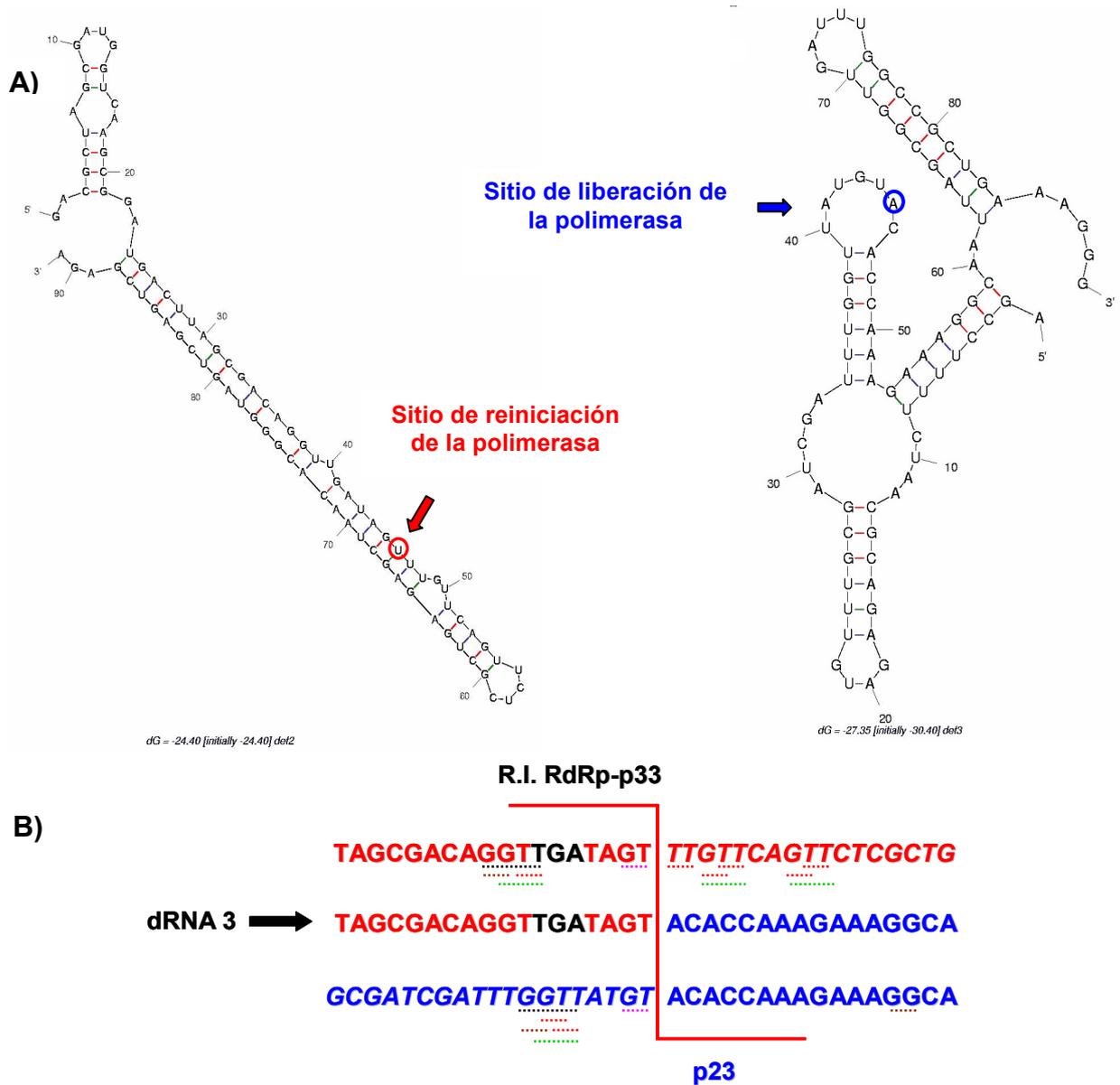


Figura 5. A) Estructuras secundarias de mínima energía libre predichas con el programa MFOLD para las regiones génicas que flanquean el punto de unión en el lado 5' (izquierda) y 3' (derecha) del dRNA 3. Se indican en colores azul y rojo los nucleótidos de liberación y reinicio de la polimerasa, asumiendo que la recombinación ocurre durante la síntesis de la cadena negativa. B) Arriba y abajo se muestran regiones del gRNA de CTV próximas al punto de recombinación de la región intergénica (R. I.) entre la ORF 1b (RdRp) y la ORF2 (p33) o del gen p23, respectivamente. En el esquema superior de la R. I. entre las ORFs 1b y 2 y en el del dRNA 3 (en medio) se muestran en color negro los nt del codón de parada de la ORF 1b. Para el resto de detalles como en la Figura 3.

### 4.3.2. Inoculación de viriones de T318A en protoplastos de *Nicotiana benthamiana*

Para ver si era posible desarrollar un sistema genético para el genotipo T318A, basado en la replicación de clones infecciosos en *N. benthamiana*, se ensayó en primer lugar la infectividad de sus viriones en células de esta especie, transfectando protoplastos con viriones purificados de plantas infectadas con los aislados T318A, T385, T305 o T36. En todos los casos los protoplastos se incubaron en oscuridad durante 5 días a una temperatura de 24-25°C y cada día se extrajo RNA<sub>t</sub> para analizar la presencia del gRNA de CTV y los sgRNAs derivados de la replicación y expresión viral.

La hibridación en formato Northern-blot con una sonda de RNA-DIG específica del extremo 3' del aislado T318A mostró que los tres aislados agresivos inductores de SP y/o SY (T318A, T305 y T36) sí tenían capacidad para replicarse en protoplastos de *N. benthamiana* mientras que el aislado asintomático T385 no se replicaba (Figura 6). A los 5 DPI la acumulación del aislado T318A en protoplastos era similar a la del genotipo control T36, mientras que la intensidad observada para el otro aislado agresivo de origen español (T305) fue bastante menor.

El análisis diario de los protoplastos transfectados con T318A mostró que tanto el gRNA como los sgRNAs de p20 y p23 empezaban a detectarse a los 3 DPI (Figura 6). Asimismo se observó una banda de RNA por debajo del gRNA que podría corresponder a uno de los dRNAs de gran tamaño presentes en este aislado. A los 5 DPI las bandas correspondientes al gRNA y a los sgRNAs de p25, p20 y p23 mostraban una intensidad similar a las del control T36 (Figura 6).

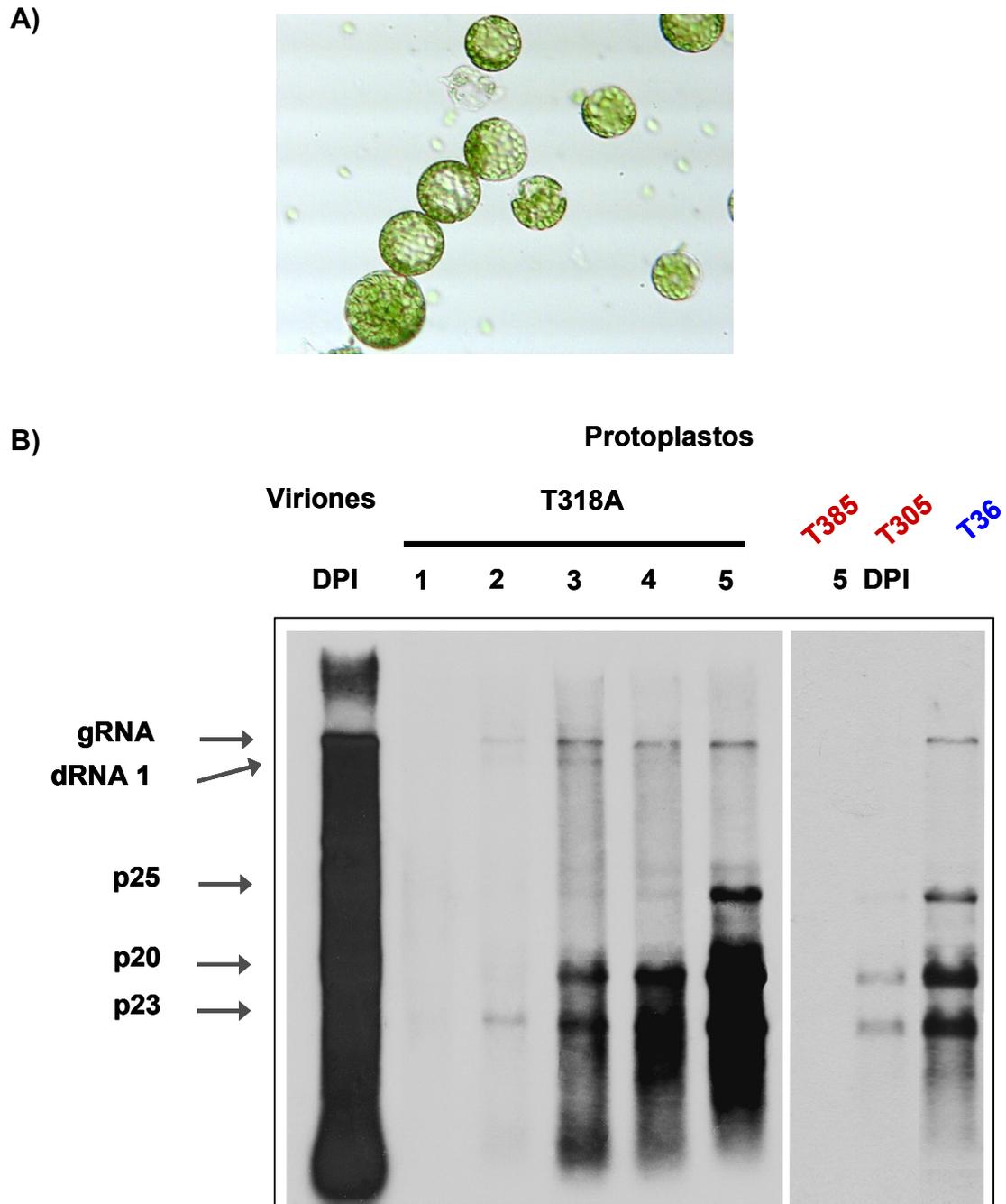


Figura 6. A) Protoplastos aislados de mesófilo de *N. benthamiana*. B) Hibridación molecular tipo Northern-blot de RNA de protoplastos transfectados con viriones purificados de plantas infectadas con los aislados T318A, T385, T305 o T36 a diferentes días post-inoculación (DPI). La membrana se hibridó con una sonda de RNA-DIG de polaridad negativa del extremo 3' del aislado T318A. A la izquierda se indican las posiciones del gRNA, de los sgRNAs 3' co-terminales p20, p23 y p25, y de al menos un dRNA de gran tamaño presente en T318A.

### **4.3.3. Desarrollo de minireplicones de cDNA basados en dRNAs de gran tamaño del aislado T318A**

Una vez comprobada la capacidad de replicación de T318A en protoplastos de *N. benthamiana*, el siguiente objetivo era obtener clones infecciosos de cDNA basados en los tres dRNAs de gran tamaño que pudieran servir de minireplicones en un sistema genético basado en este aislado. Para ello, se siguieron dos estrategias: 1) obtener clones de cDNA bajo la acción del promotor del fago T7 con los que poder sintetizar *in vitro* transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*, y 2) obtener clones de cDNA bajo la acción del promotor 35S del CaMV para la expresión del RNA infeccioso directamente en planta.

#### **4.3.3.1. Obtención de minireplicones de T318A en vectores de transcripción *in vitro* e inoculación de protoplastos de *N. benthamiana***

Como se ha descrito en la Introducción general de esta memoria, el único sistema genético disponible para CTV al comienzo de este trabajo estaba basado en clones infecciosos del aislado T36 de Florida y protoplastos de *N. benthamiana*. Al comprobar la replicación eficiente de T318A en este tipo de protoplastos, decidimos obtener minireplicones del nuevo aislado y ensayar su infectividad. Estos ensayos se llevaron a cabo durante una estancia breve en el laboratorio del Dr. Dawson (University of Florida, C.R.E.C., Lake Alfred, EEUU), que posee gran experiencia en este campo, con objeto de aprovechar la metodología e infraestructura desarrolladas en este laboratorio.

Para obtener las construcciones se sintetizaron tres cDNAs (RT1, RT2 y RT3) basados en los dRNAs de T318A y se amplificaron en reacciones de PCR independientes para generar tres fragmentos solapantes de DNA de gran tamaño (A, B y C) que cubrían el gRNA completo de cada dRNA (Figura 7). La clonación de los tres fragmentos (A, B y C) se realizó de forma sucesiva en el vector 2.0 haciendo uso de dos sitios de restricción de corte

único en la secuencia de T318A (esquema de la Figura 8B). De este modo, los cDNAs de CTV se colocaban bajo la acción del promotor del fago T7, e inmediatamente después de su secuencia se localizaban las secuencias de la ribozima del virus delta de la hepatitis y la terminadora del fago T7 (Pattnaik *et al.*, 1992) (Figura 8A y 8B) para hacer posible la síntesis de transcritos con un extremo 3' preciso.

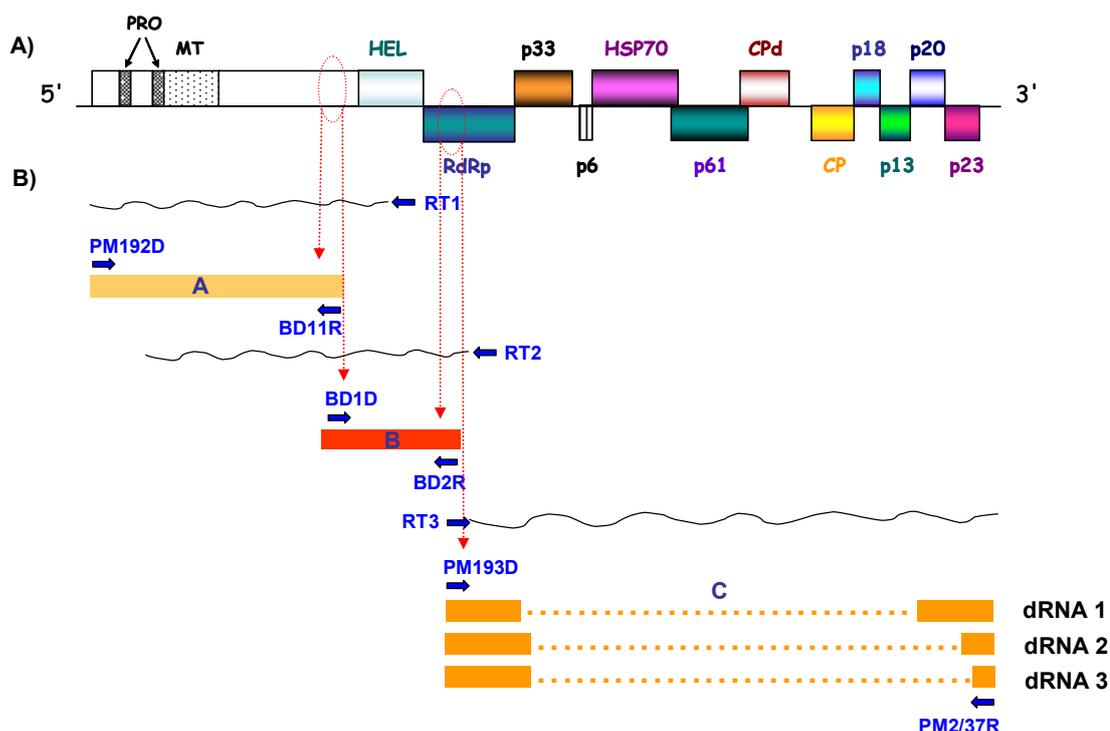


Figura 7. Esquema de la estrategia utilizada para la obtención mediante RT-PCR larga de tres amplicones solapantes que cubren cada uno de los dRNAs de T318A. A) Organización genómica de CTV. Las cajas representan pautas de lectura abierta (ORFs) y junto a ellas se indican los productos proteicos potencialmente codificados. Las elipses y flechas rojas de línea punteada delimitan las regiones solapantes entre los productos sintetizados. B) Extensión y localización de los tres cDNAs (RT1, RT2 y RT3) obtenidos mediante RT y de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR para generar los tres fragmentos solapantes de cDNA (A, B, y C). Para el fragmento C se representa mediante una línea punteada la región génica delecionada en cada uno de los tres dRNAs de T318A.

Se obtuvieron un total de 32 minireplicones de longitud completa para el dRNA 1, 8 para el dRNA 2 y 7 para el dRNA 3, y 22 de ellos (12 del dRNA 1 y 6 de cada uno de de los dRNAs 2 y 3), se utilizaron para sintetizar

transcritos *in vitro* que una vez purificados se transfectaron en protoplastos de *N. benthamiana* para probar su infectividad. La hibridación tipo Northern blot con sondas DIG específicas del aislado reveló que ninguno de los transcritos procedentes de estos clones de T318A era infeccioso en protoplastos, mientras que transcritos similares de un clon control del aislado T36 se replicaron normalmente (Satyanarayana *et al.*, 1999) (datos no mostrados).

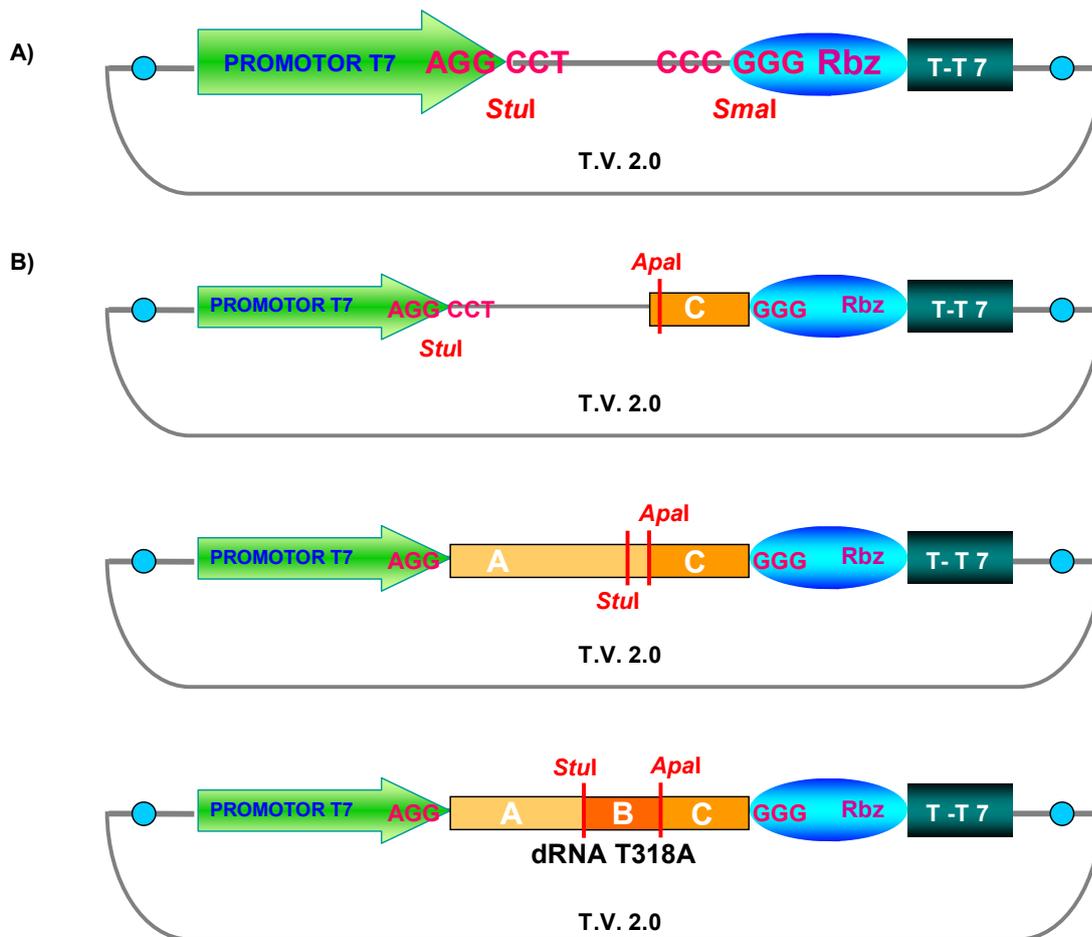


Figura 8. A) Representación gráfica del vector plasmídico 2.0 que contiene la secuencia del promotor del fago T7 seguida de dos G, de los sitios de restricción *Stul* y *SmaI*, de la secuencia antigenómica de la ribozima del virus delta de la hepatitis y de la secuencia terminadora del fago T7 (tomado de A. Ball, comunicación personal). B) Esquema mostrando los pasos seguidos en la clonación sucesiva de los tres fragmentos solapantes de DNA de gran tamaño (A, B y C), que cubren el gRNA completo de cada uno de los tres dRNAs, en el vector 2.0.

#### **4.3.3.2 Desarrollo y ensayos de infectividad de minireplicones de T318A en vectores de expresión *in planta***

La falta de infectividad de los transcritos de RNA de tantos minireplicones de T318A en protoplastos de *N. benthamiana* podría ser debido a una reorganización de los plásmidos correspondientes. A su vez, el lento crecimiento de las bacterias portadoras de estos plásmidos, sugería la existencia de un grave problema de toxicidad. Como se ha descrito en la Introducción de este capítulo, este problema también existe con los clones derivados del aislado T36 (Satyanarayana *et al.*, 2003; Ambrós *et al.*, datos no publicados) y se había solventado en gran medida insertando un intrón de planta en la secuencia del virus y/o subclonando las construcciones obtenidas en vectores de bajo número de copias (Ambrós *et al.*, datos no publicados). En el caso del aislado T318A el problema de toxicidad de la secuencia viral parece aún más exacerbado que con T36. Por ello, en este apartado se abordó una segunda estrategia consistente en obtener clones de cDNA de este aislado en un vector de bajo número de copia bajo la acción del promotor 35S de CaMV para poder expresar el RNA infeccioso directamente en planta.

##### **4.3.3.2.1. Estabilización de las construcciones añadiendo un intrón de planta y desarrollo de *cassettes* de expresión *in planta***

Con objeto de reducir la posible toxicidad de la secuencia de T318A en células procarióticas, se insertó en primer lugar la secuencia del intrón IV2 del gen ST-LS1 de patata dentro de una región de la ORF 1a en la que previamente se había descrito la presencia de secuencias tóxicas ricas en U en el aislado T36 (Satyanarayana *et al.*, 2003).

La inserción del intrón se realizó siguiendo una estrategia de PCR solapante (Figura 9) en la que se sintetizaron 3 productos de amplificación que consistieron en 2 fragmentos de DNA (A1 y A2) obtenidos mediante RT-PCR que cubrían las primeras 6.1 kb de la secuencia del aislado T318A, y un fragmento de DNA de 189 pb sintetizado mediante PCR, que correspondía a

la secuencia del intrón (Int) (Vancanneyt *et al.* 1990). Con los fragmentos amplificados A2 e Int se generó un primer producto de fusión (A2+Int) mediante PCR de elongación (e-PCR) y posteriormente se incorporó a este producto el fragmento A1 utilizando una nueva e-PCR.

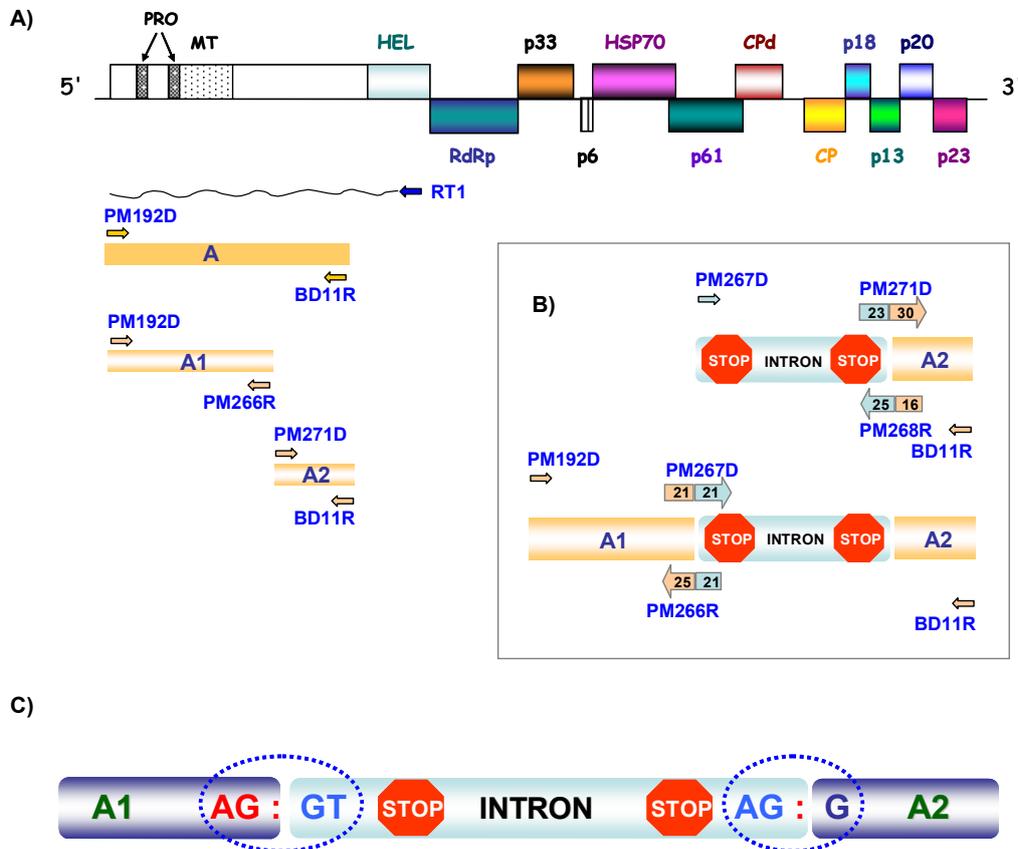


Figura 9. A) Organización genómica de CTV y estrategia utilizada para la inserción del intrón IV2 ST-LS1 de patata interrumpiendo el fragmento A (apartado 4.3.3.1). A la izquierda se muestra el fragmento A completo, los fragmentos parciales A1 y A2 sintetizados mediante RT-PCR a partir del cDNA RT1 y los cebadores utilizados. B) Esquema de la estrategia de PCR solapante utilizada para la introducción del intrón entre los fragmentos A1 y A2. Arriba y abajo obtención de los productos de fusión Int+A2 o A1+Int+A2, respectivamente, y cebadores utilizados. Para los cebadores de las zonas de fusión se indica con un número y el mismo color los nt homólogos a las regiones amplificadas y/o fusionadas. El icono de STOP en la secuencia del intrón indica la existencia de numerosos codones de parada en las tres pautas de lectura. C) Representación esquemática de las uniones exon A1-intrón-exón A2 de la región genómica A1+Int+A2. Las elipses delimitan las secuencias de reconocimiento conservadas en las uniones intrón-exón para el procesamiento por la maquinaria celular de “splicing” de la planta.

De esta forma el producto final fusionado contenía un primer exón con la secuencia del fragmento A1, seguida del intrón de patata y de un segundo exón con el fragmento A2 (Figura 9 B y C). El intrón presenta en su secuencia numerosos codones de parada en las tres pautas de lectura para evitar cualquier posible expresión de la secuencia viral de A1 en la bacteria, y por otra parte, las uniones exón-intrón-éxón siguen el consenso de plantas para asegurar la correcta escisión del intrón en el núcleo de la célula vegetal (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Para obtener las construcciones de cDNA completas de los minireplicones de T318A se generaron mediante RT-PCR dos fragmentos adicionales de DNA (B y C) que cubrían el resto de la secuencia de los dRNA 1 y 2 hasta el extremo 3' (Figura 10).

La clonación de los fragmentos, A1+Int+A2, B y C se realizó de forma sucesiva en el vector 35S-8 haciendo uso de los sitios de restricción *Stu*I y *Sma*I con punto de corte único en la secuencia de T318A. Este vector contiene el promotor 35S de CaMV cuyo inicio de transcripción se modificó para obtener transcritos virales con extremos 5' precisos. Por otra parte, la secuencia terminadora de la transcripción NOS-T y de la ribozima  $\delta$ -HDV al otro lado del punto de clonación aseguran la terminación de la transcripción y el procesamiento correcto y preciso del extremo 3' de la secuencia viral clonada.

Se seleccionaron un total de 14 clones del dRNA 1 (35S-T318AdRNA1) y 8 del dRNA 2 (35S-T318AdRNA2), cuyo crecimiento en *E. coli* mostró una toxicidad reducida y fue similar al de los minireplicones de T36 que contienen el intrón (datos no mostrados).

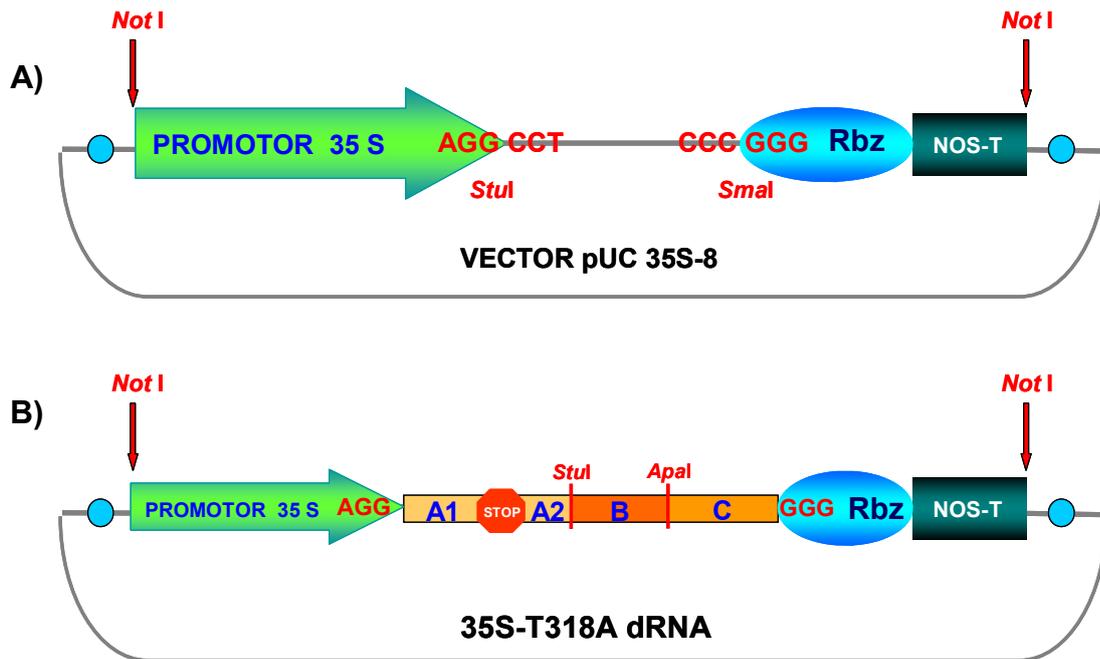


Figura 10. A) Representación esquemática del vector plasmídico 35S-8 modificado (Ambrós *et al.*, datos no publicados) que contiene la secuencia del promotor 35S (35S x 2) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), seguida de dos G, de los sitios de restricción *StuI* y *SmaI*, de la secuencia antigénica de la ribozima del virus delta de la hepatitis y de la secuencia terminadora NOS-T. Los sitios de restricción *NotI* que flanquean el cassette de expresión se muestran con una flecha roja. B) Esquema de la clonación de los fragmentos solapantes de DNA de gran tamaño (A1+Int+A2, B y C) que cubren el gRNA completo de cada uno de los tres dRNAs en el vector 35S-8. El icono de STOP dentro de la secuencia del intrón indica la existencia de codones de parada en las tres pautas de lectura. Se indica la localización de los sitios de restricción *StuI* y *Apal* utilizados en el proceso de ensamblaje de los fragmentos.

#### 4.3.3.2.2. Estabilización de las construcciones mediante subclonación en vectores BAC y agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Con objeto de reducir la acumulación de secuencias virales tóxicas en células bacterianas, en una segunda etapa se subclonaron las construcciones de los minireplicones de T318A en un vector de bajo número de copias. Se seleccionó el vector pCH20 (Figura 11A) que tiene una secuencia híbrida entre un plásmido binario de expresión en planta y un

BAC, y que produce 1-2 copias por célula. Los clones 35S-T318AdRNA1 y 35S-T318AdRNA2 se digirieron con la enzima de restricción *NotI* para liberar los *cassettes* de expresión completos y subclonarlos en el vector pCH20-(3)-GUSInt previamente digerido con *NotI* (Figura 11B y C). Se obtuvieron un total de 11 clones del dRNA 1 (BAC-T318AdRNA1) y 12 del dRNA 2 (BAC-T318AdRNA2) con un buen crecimiento de las bacterias *E. coli* transfectadas.

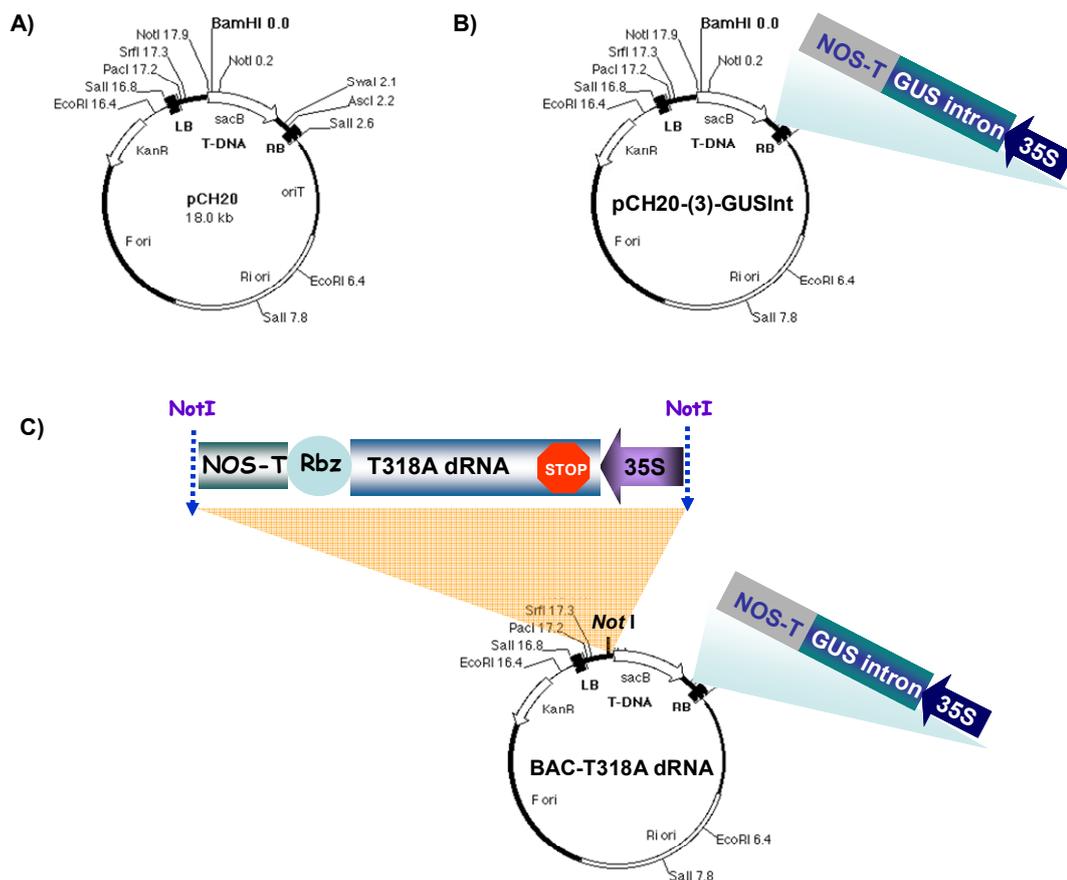


Figura 11. Representación gráfica de los vectores binarios de tipo BAC utilizados para la clonación de los dRNAs de T318A. A) Genoma del vector pCH20 (tomado de Hamilton CM, 1997). B) Modificación del vector pCH20 para obtener el vector pCH20-(3)-GUSInt (Ambrós *et al.*, datos no publicados) que contiene en el T-DNA la secuencia del *cassette* de expresión del gen marcador GUS-intrón presente en los vectores pCAMBIA. C) Esquema de la clonación de los *cassettes* de expresión completos de los dRNAs de T318A en el vector modificado pCH20-(3)-GUSInt.

Para comprobar su infectividad mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, 8 clones BAC con el dRNA 1 y 6 con el dRNA 2 se utilizaron para transfectar la cepa COR 308 de *A. tumefaciens* (que contiene copias extra de genes de virulencia). Los cultivos bacterianos inducidos se co-infiltraron con el supresor p19 en la cara abaxial de todas las hojas de plantas de 2-3 semanas de edad siguiendo el protocolo previamente establecido por Ambrós *et al.* (datos no publicados). En cada ensayo se recolectaron trozos de hoja infiltrada de todas las plantas a los 7, 14, 21 y 28 DPI, se mezclaron las de cada grupo de clones y se extrajo el RNA para detectar la replicación de las distintas construcciones mediante análisis Northern-blot y estudiar la cinética de acumulación de los dRNAs de T318A (ver el siguiente apartado). Se observó replicación con todas las mezclas de clones, al detectar la presencia del RNA de longitud completa de cada dRNA en las hojas infiltradas, y se confirmó que la replicación de los dRNAs 1 generaba dos RNAs adicionales que correspondían a los sgRNAs de *p20* y *p23*, mientras que las hojas infiltradas con dRNAs 2 no contenían sgRNAs (Figura 12). Una vez comprobada la replicación de todas las mezclas de clones, se llevaron a cabo experimentos adicionales de agroinfiltración utilizando los clones individuales con objeto de determinar su eficiencia relativa. Los análisis Northern-blot confirmaron la replicación de todos los clones ensayados.

Para hacer un seguimiento temporal de la acumulación de los minireplicones y comparar la eficacia relativa de los clones individuales se optimizó un nuevo protocolo de qRT-PCR con SYBR Green I (ver siguiente apartado), ya que los dos sistemas previamente desarrollados para CTV (capítulos 2 y 3) utilizan un cebador que anilla dentro de la ORF 2 y por tanto no permiten la amplificación de los dRNAs de T318A que carecen de esta ORF.

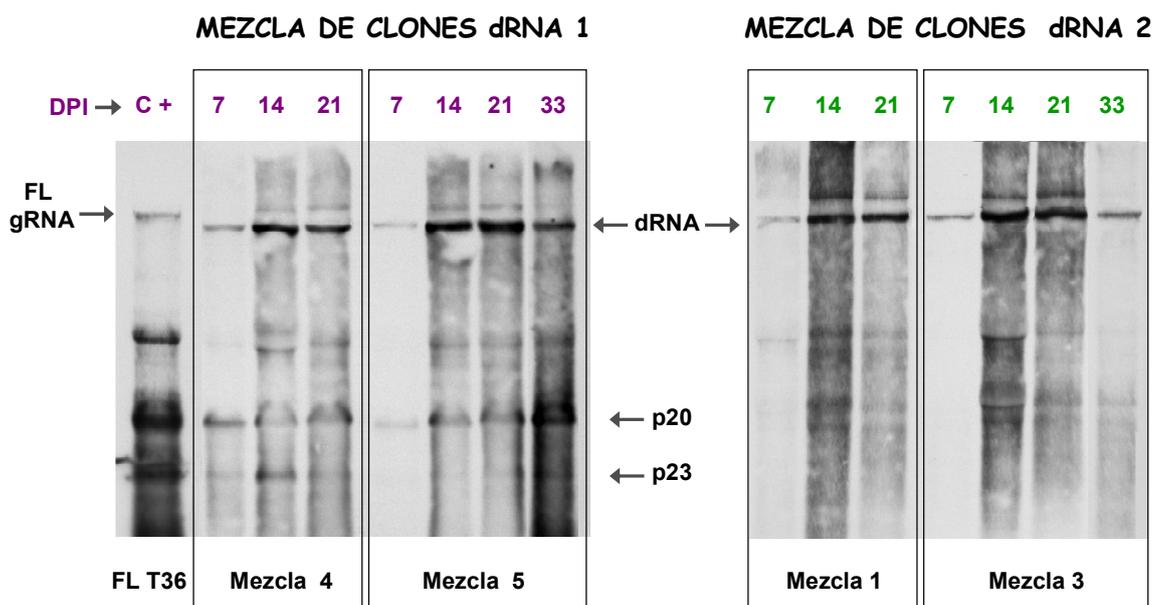


Figura 12. Hibridación molecular de tipo Northern-blot de RNAt de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con mezclas de clones BAC de los dRNAs 1 y 2 de T318A a los 7, 14, 21 y 28 DPI. Como control se incluyó RNAt de hojas infiltradas con el clon completo de T36 en vectores BAC. Las membranas se hibridaron con una sonda de RNA-DIG de polaridad negativa del extremo 3' del aislado T318A. Para los clones de T36 y del dRNA 1 se indican las posiciones del gRNA de T36, de los dRNAs 1 y 2 y de los sgRNAs 3' co-terminales *p20* y *p23*.

#### 4.3.3.2.3. Desarrollo de un nuevo protocolo de RT-PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de dRNAs de T318A.

Para poder amplificar los dRNAs de T318A se diseñaron cebadores específicos sobre secuencias conservadas de la ORF 11 (gen *p23*), una región génica presente en los tres tipos de dRNAs caracterizados. El ensayo de RT-PCR a tiempo real permitió la detección y cuantificación de dianas de *p23* en aislados de CTV con orígenes y características patogénicas diferentes como T318A y T36. La primera derivada de la curva de fusión proporcionada por el programa del LightCycler ((d/dT) Fluorescencia (530)) mostró en todos los casos un pico único, confirmando la ausencia de dímeros de cebadores y la amplificación de productos no deseados (Figura 13).

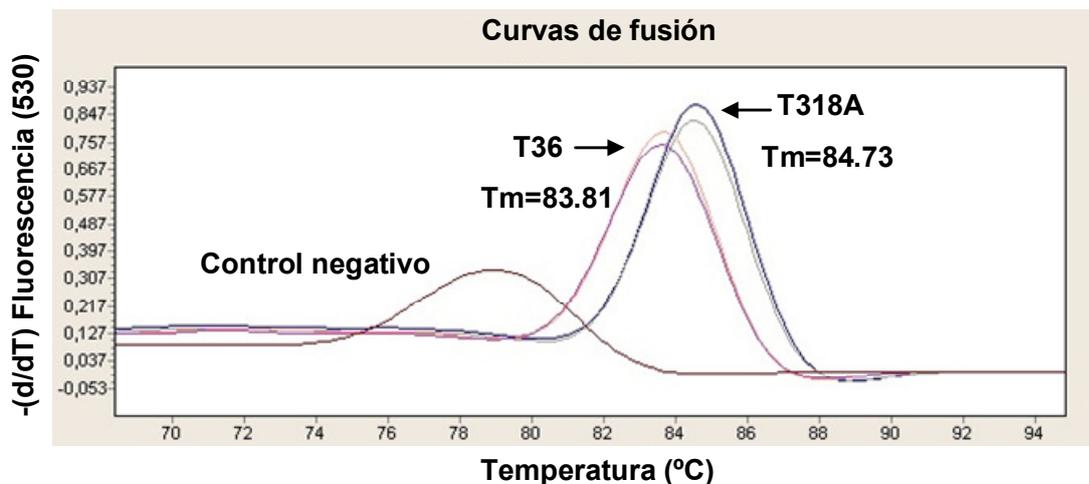


Figura 13. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores PM274D-PM275R a partir de RNAt de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los clones BACT318AdRNA o BAC-CTV-T36MiniR. Representación gráfica de la primera derivada de las curvas de fusión en función de la temperatura. El control negativo es un extracto de RNAt de planta sana.

Asimismo, el análisis electroforético de los productos amplificados mostró una banda única de DNA de 131 pb sin formación de dímeros de cebadores. No se observó amplificación con ninguno de los controles negativos que incluían extractos de planta sana y controles sin muestra (con agua) o sin retrotranscriptasa, lo que confirmaba la especificidad del ensayo y que la amplificación no estaba generada por la contaminación del vector de expresión utilizado en la agroinfiltración.

Para calcular el número de dianas del gen *p23* se preparó una curva estándar utilizando diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA del aislado T318A que cubría el intervalo de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias. Esta curva estándar se utilizó para cuantificar minireplicones de T318A y de T36, ya que en ambos aislados se genera un amplicón del mismo tamaño. La curva cubría un amplio intervalo dinámico (6 unidades logarítmicas de concentración) y mostró una fuerte correlación lineal con un coeficiente de correlación de 0.9984 y una eficiencia de amplificación del 90% (Fig. 13A). El

ensayo de RT-PCR a tiempo real permitió la detección consistente y reproducible de al menos  $10^2$  copias de *p23* en extractos de planta (Figura 14B).

El protocolo de qRT-PCR desarrollado para *p23* se aplicó para estudiar la cinética de acumulación de los minireplicones de T318A en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, estimando el número de copias de este gen en los extractos de RNAt obtenidos a los 7, 14, 21 y 28 DPI. Los valores medios de *Ct* de todos los clones estuvieron dentro del intervalo dinámico de la curva estándar y oscilaron entre  $15.64 \pm 0.05$  y  $28.99 \pm 0.17$  para los minireplicones producidos por los clones BAC-T318AdRNA1 y entre  $18.32 \pm 0.15$  y  $22.93 \pm 0.09$  para los minireplicones control de T36 de estos experimentos. Por otra parte, los valores obtenidos con los clones BAC-T318AdRNA2 oscilaron entre  $20.50 \pm 0.22$  y  $28.95 \pm 0.21$ , y para el minireplicón de T36 de estos ensayos entre  $18.55 \pm 0.15$  y  $21.57 \pm 0.13$ . En todos los casos, los valores de los coeficientes de variación (CV%) intra- e inter-ensayo fueron muy bajos y siempre se mantuvieron por debajo del 2%, lo que indicaba la buena reproducibilidad de la técnica. El número estimado de dianas de *p23* para los diferentes clones BAC-T318AdRNA1 osciló de  $0.06 \times 10^3$  a  $0.08 \times 10^5$  por nanogramo de RNAt, siendo los clones 1-2, 1-7, 1-24 y 1-5 los que mostraron los niveles de acumulación más elevados y los de 1-13 y 1-23 los más bajos (Tabla 2). En el caso de los clones BAC-T318AdRNA2, el número de dianas de *p23* varió de  $0.03 \times 10^3$  a  $1.04 \times 10^5$  por nanogramo de RNAt, observándose los niveles de acumulación más altos para los clones 2-11, 2-2 y 2-3 y los más bajos para los clones 2-9, 2-10 y 2-7 (Tabla 3). Para la mayoría de clones de los dRNA 1 y 2 de T318A el número de copias de *p23* aumentó de D7 a D21 y descendió de D21 a D28, una cinética de acumulación que también se observó para el minireplicón de T36 (Tablas 2 y 3). Hay que destacar que el mayor número de dianas de *p23* observado para la mayoría de los minireplicones BAC-T318AdRNA1, en comparación con el minireplicón de T36, se debe probablemente a la expresión del sgRNA de *p20* además del de *p23* en los primeros, con el consiguiente aumento del número de dianas de este gen. Por el contrario, el menor número de copias de *p23* detectado en los BAC-T318AdRNA2 en

comparación con el minireplicón de T36, podría deberse a la ausencia de expresión del sgRNA de p23 en estos últimos clones por estar incompleta la secuencia promotora necesaria.

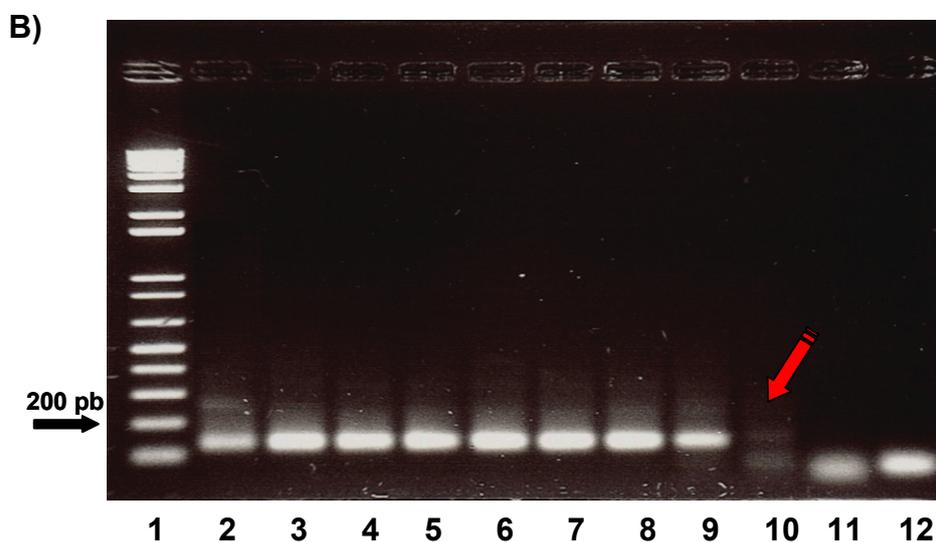
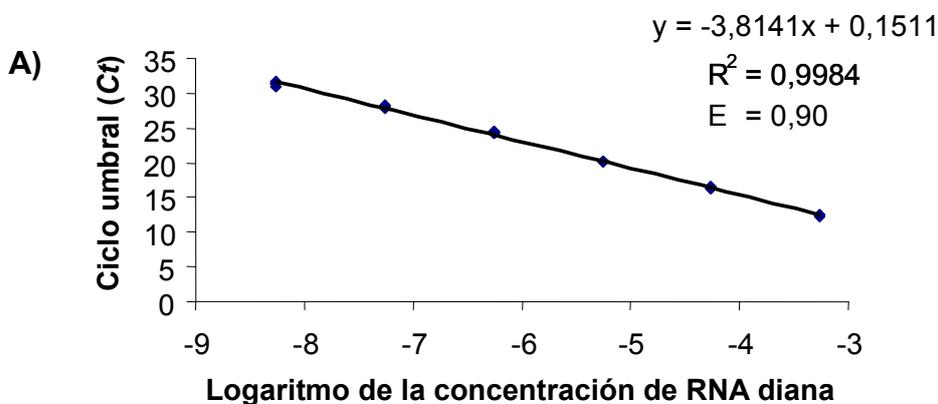


Figura 14. (A) Curva estándar obtenida a partir de diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA sintetizados *in vitro* a partir del aislado T318A mediante RT-PCR a tiempo real con la pareja de cebadores PM274D-PM275R. Las curvas se generaron mediante regresión lineal representando los valores del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo de la concentración de RNA diana utilizada. Cada punto representa la media del valor Ct de cuatro experimentos diferentes con dos réplicas intra-ensayo. Se indica el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia de amplificación (E). (B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos a partir de diluciones seriadas (1/10) de transcritos de RNA del aislado T318A que contenían de  $10^{10}$  a  $10^1$  copias (carriles 2-11, respectivamente). Carril 1: Marcador de DNA (1 kb plus ladder, Invitrogen). Carril

12: Control sin molde. El gel se tiñó con bromuro de etidio. La flecha roja en el carril 10 señala la detección de 100 copias.

Tabla 2. Detección y cuantificación de dianas de *p23* mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con 8 clones BAC-T318AdRNA1 y el control BAC-CTV-T36MiniR, por separado, a los 7, 14, 21 y 28 DPI.

	Día	Media Ct $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Número de copias de p23 <sup>c</sup>
<b>dRNA1-2</b>	<b>D7</b>	18.40 $\pm$ 0.21	1.11	1.29 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D14</b>	16.77 $\pm$ 0.04	0.25	2.71 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	15.64 $\pm$ 0.05	0.32	8.00 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	16.22 $\pm$ 0.04	0.26	3.98 x 10 <sup>4</sup>
<b>dRNA1-5</b>	<b>D7</b>	19.98 $\pm$ 0.18	0.92	4.14 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	17.23 $\pm$ 0.13	0.74	3.53 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	16.68 $\pm$ 0.03	0.17	4.46 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	21.77 $\pm$ 0.02	0.10	2.82 x 10 <sup>3</sup>
<b>dRNA1-6</b>	<b>D7</b>	22.79 $\pm$ 0.17	0.74	1.83 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	20.25 $\pm$ 0.25	1.22	5.07 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D21</b>	19.74 $\pm$ 0.13	0.68	5.87 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D28</b>	22.49 $\pm$ 0.05	0.22	1.34 x 10 <sup>3</sup>
<b>dRNA1-7</b>	<b>D7</b>	18.34 $\pm$ 0.05	0.27	1.22 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D14</b>	16.86 $\pm$ 0.01	0.04	2.93 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	15.76 $\pm$ 0.01	0.04	7.17 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	20.94 $\pm$ 0.01	0.07	2.75 x 10 <sup>3</sup>
<b>dRNA1-8</b>	<b>D7</b>	25.59 $\pm$ 0.24	0.94	2.89 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	19.68 $\pm$ 0.06	0.29	7.88 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D21</b>	19.56 $\pm$ 0.16	0.80	7.06 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D28</b>	22.76 $\pm$ 0.08	0.37	1.24 x 10 <sup>3</sup>
<b>dRNA1-13</b>	<b>D7</b>	25.05 $\pm$ 0.22	0.88	3.90 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	26.28 $\pm$ 0.20	0.75	1.80 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	27.26 $\pm$ 0.11	0.39	1.00 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D28</b>	26.99 $\pm$ 0.05	0.18	1.30 x 10 <sup>2</sup>
<b>dRNA1-23</b>	<b>D7</b>	26.44 $\pm$ 0.14	0.53	1.50 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	26.54 $\pm$ 0.07	0.27	1.20 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	24.73 $\pm$ 0.06	0.26	2.70 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D28</b>	28.99 $\pm$ 0.17	0.59	6.00 x 10 <sup>1</sup>
<b>dRNA1-24</b>	<b>D7</b>	21.31 $\pm$ 0.06	0.20	3.49 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	17.05 $\pm$ 0.01	0.08	3.67 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	16.78 $\pm$ 0.01	0.04	4.93 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	19.92 $\pm$ 0.10	0.5	4.35 x 10 <sup>3</sup>
<b>MRT36</b>	<b>D7</b>	22.93 $\pm$ 0.09	0.4	2.34 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	19.10 $\pm$ 0.02	0.11	1.35 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	18.32 $\pm$ 0.15	0.81	2.51 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	21.39 $\pm$ 0.24	1.12	1.87 x 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos.

<sup>c</sup> Número de copias de p23 por nanogramo de RNAt.

Tabla 3. Detección y cuantificación mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real de dianas de p23 en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas por separado con 8 clones BAC-T318AdRNA2 y con el control BAC-CTV-T36MiniR a los 7, 14, 21 y 28 DPI.

	<b>Día</b>	<b>Media Ct ± S.D.<sup>a</sup></b>	<b>CV%<sup>b</sup></b>	<b>Número de copias de p23<sup>c</sup></b>
<b>dRNA2-2</b>	<b>D7</b>	24.04 ± 0.08	0.35	5.20 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	22.81 ± 0.07	0.31	8.70 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	20.50 ± 0.22	1.10	4.15 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D28</b>	25.03 ± 0.02	0.08	2.70 x 10 <sup>2</sup>
<b>dRNA2-3</b>	<b>D7</b>	25.55 ± 0.12	0.47	1.80 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	22.60 ± 0.13	0.56	1.52 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D21</b>	21.04 ± 0.03	0.84	2.64 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D28</b>	20.72 ± 0.02	0.55	4.18 x 10 <sup>3</sup>
<b>dRNA2-7</b>	<b>D7</b>	23.24 ± 0.02	0.09	8.30 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	24.56 ± 0.25	0.12	4.20 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	26.12 ± 0.01	0.03	1.60 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D28</b>	27.04 ± 0.06	0.21	1.00 x 10 <sup>2</sup>
<b>dRNA2-9</b>	<b>D7</b>	26.83 ± 0.04	0.16	1.00 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	24.34 ± 0.03	0.12	5.00 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	24.46 ± 0.01	0.06	7.50 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D28</b>	23.78 ± 0.06	0.27	7.00 x 10 <sup>2</sup>
<b>dRNA2-10</b>	<b>D7</b>	28.95 ± 0.21	0.71	3.00 x 10 <sup>1</sup>
	<b>D14</b>	23.37 ± 0.07	0.30	8.40 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D21</b>	23.42 ± 0.12	0.51	8.00 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D28</b>	25.54 ± 0.01	0.06	2.50 x 10 <sup>2</sup>
<b>dRNA2-11</b>	<b>D7</b>	25.60 ± 0.22	0.44	2.70 x 10 <sup>2</sup>
	<b>D14</b>	20.92 ± 0.10	0.10	3.50 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D21</b>	18.93 ± 1.16	1.16	1.04 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	21.36 ± 0.63	0.63	2.27 x 10 <sup>3</sup>
<b>MRT36</b>	<b>D7</b>	21.33 ± 0.08	0.40	2.90 x 10 <sup>3</sup>
	<b>D14</b>	18.67 ± 0.17	0.91	1.14 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D21</b>	18.55 ± 0.15	0.80	1.22 x 10 <sup>4</sup>
	<b>D28</b>	21.57 ± 0.13	0.59	2.04 x 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo.

<sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos.

<sup>c</sup> Número de copias de p23 por nanogramo de RNAt.

En resumen, para la mayoría de los clones los niveles de acumulación más elevados se observaron entre la segunda y tercera semana después de la infiltración, lo que se correlaciona con lo observado mediante hibridación tipo Northern-blot (Figura 12 y 15).

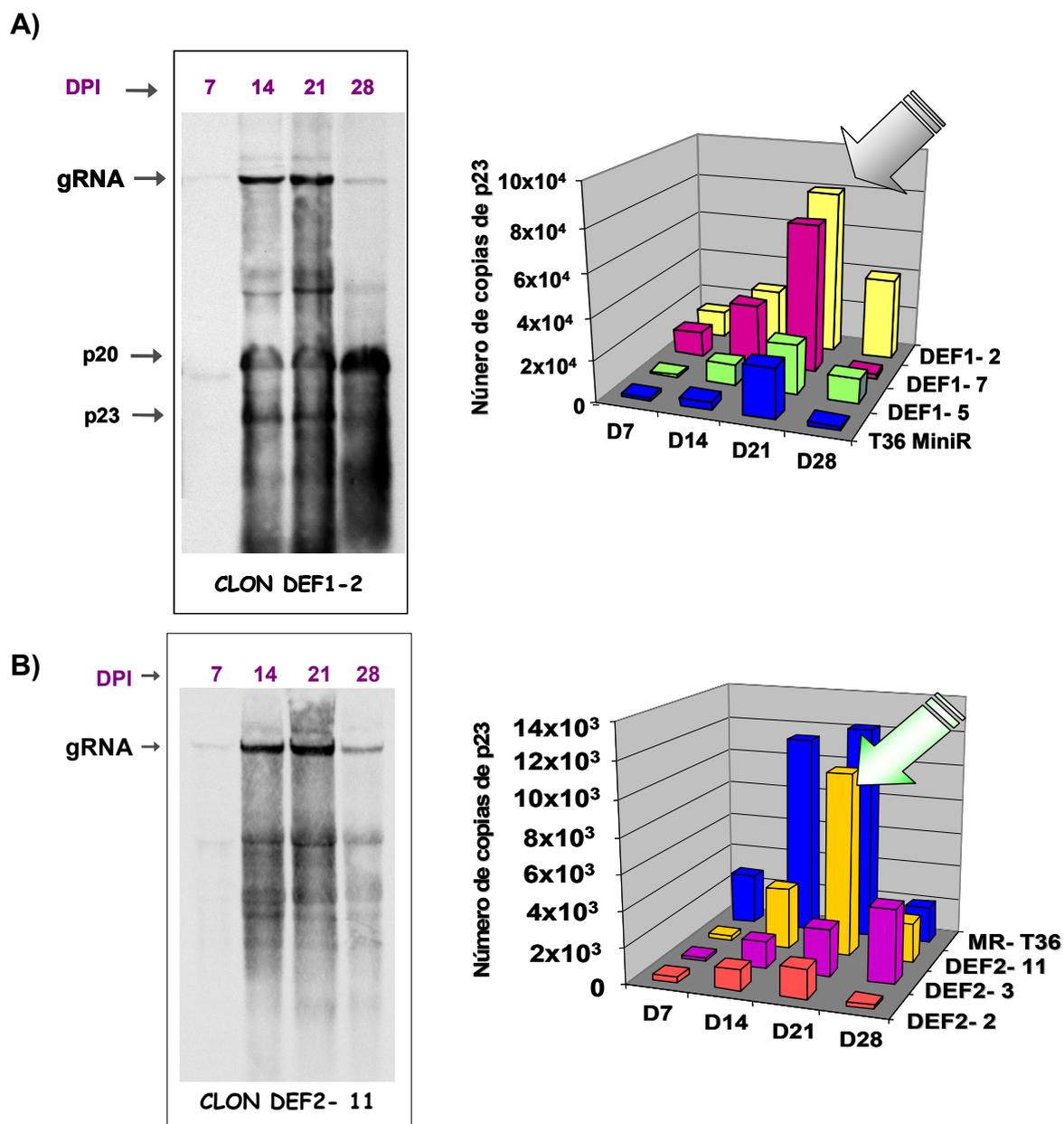


Figura 15. Detección y cuantificación mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real de copias de *p23* en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con tres clones BAC-T318AdRNA1 (A) o dRNA2 (B) a los 7, 14, 21 y 28 DPI (derecha) y análisis

Northern-blot (izquierda) del clon BAC-T318AdRNA 1 (A) o dRNA 2 (B) que presenta los mayores niveles de acumulación. El minireplicón de T36 se incluyó como control.

### **4.3.4. Construcción y ensayos de infectividad de clones de cDNA de T318A de longitud completa**

Una vez comprobada la capacidad de replicación de todos los clones de cDNA obtenidos de los dRNAs 1 y 2 de T18A en el vector binario (BAC-T318AdRNA1 y BAC-T318AdRNA2), el siguiente paso era utilizar éstos como base para preparar clones de cDNA del genoma completo de T318A, insertándoles la región genómica central que les faltaba. Si los nuevos clones de longitud completa del genoma de T318A eran infecciosos en plantas de *N. benthamiana*, se producirían viriones que podrían ser mecánicamente inoculados en cítricos y podrían ser a su vez la base de un sistema genético más eficiente que el basado en protoplastos.

#### **4.3.4.1 Obtención de clones de cDNA de longitud completa de T318A en vectores de expresión *in planta* y agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana***

Para obtener clones de longitud completa de T318A, se mezclaron 10 clones 35S-T318AdRNA1 que se digirieron con las enzimas de restricción *Apal* y *BamHI* y a los que se les insertó la región central del genoma que les faltaba. Esta región central se amplificó mediante RT-PCR en dos fragmentos solapantes (D y E) que se clonaron de forma sucesiva en un vector tipo pUC19 linearizado con *Sma* I. Una mezcla de 10 clones (pUC19+D+E) se digirió con las enzimas de restricción *Apal* y *BamHI* y el inserto liberado se subclonó en los minireplicones del dRNA 1 (35S-T318AdRNA1) previamente digeridos con las mismas enzimas, obteniendo finalmente 14 clones 35S-T318AFL (Figura 16). Una mezcla de estos clones de cDNA completos se digirió con la enzima de restricción *NotI* para liberar los *cassettes* de expresión completos y poder subclonarlos en el vector binario pCH20 previamente digerido con *NotI*, obteniendo finalmente un total de 20 clones

BAC-T318AFL. Doce de estos clones se utilizaron para transfectar células de la cepa COR 308 de *A. tumefaciens*, y comprobar su infectividad mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*. Los cultivos bacterianos inducidos se co-infiltraron con otros transfectados con el gen del supresor p19 en la cara abaxial de todas las hojas de plantas de 2-3 semanas de edad, siguiendo el protocolo previamente establecido. Se infiltraron 3 plantas por clon y por ensayo en dos ensayos independientes incluyendo como control el clon completo del aislado T36 puesto en vector BAC (BAC-CTV-T36FL).

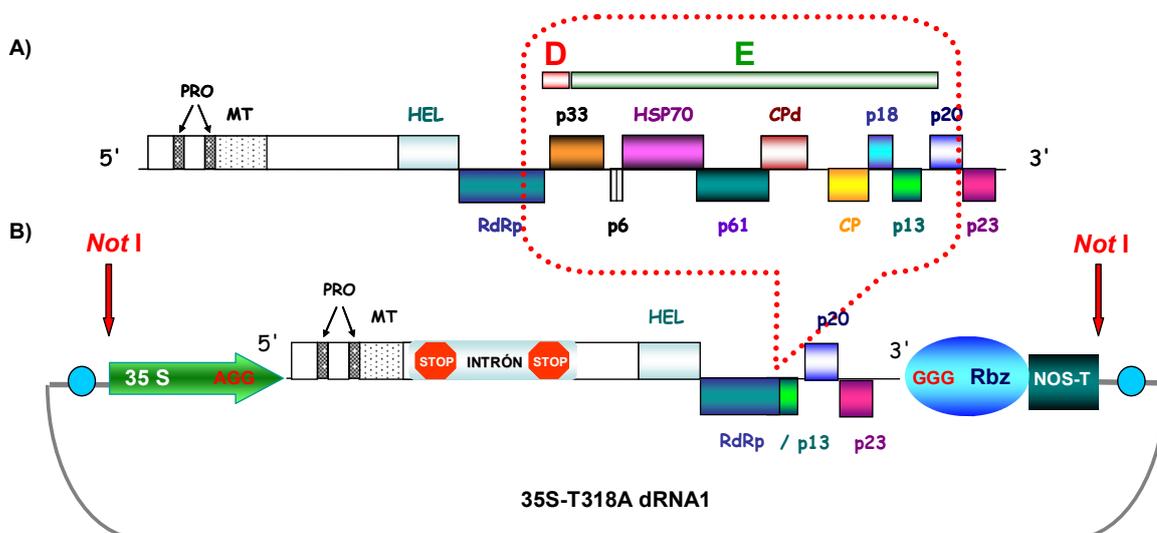


Figura 16. Esquema gráfico del vector plasmídico 35S-8 (B) con el gRNA completo del dRNA 1 al que se le insertó la región central del genoma que le faltaba (A) para obtener clones de longitud completa de T318A. La región central se amplificó por RT-PCR en dos fragmentos solapantes (D y E). Resto de detalles como en las Figura 10.

#### 4.3.4.2 Análisis de la infectividad de los vectores BAC-CTVFL

En cada ensayo se recolectaron porciones de hoja infiltrada de todas las plantas a los 7, 14, 21 y 28 DPI y se mezclaron las de cada grupo de clones para extraer el RNA<sub>t</sub> o para preparar un extracto bruto. La replicación de las distintas construcciones se analizó mediante ELISA utilizando los extractos brutos y anticuerpos monoclonales frente a la proteína p25 de la cápsida, o mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con el protocolo general desarrollado en el segundo capítulo, o hibridación tipo Northern-blot usando

los extractos de RNAt. Para calcular el número de copias de gRNA se utilizó la curva estándar de transcritos de RNA de T305 preparada en el segundo capítulo de esta memoria. Todos los clones de longitud completa ensayados para el aislado T318A y el control de T36 mostraron una replicación eficiente detectable mediante el sistema general de RT-PCR cuantitativa a partir de 7 DPI, pero su cinética de acumulación fue diferente a la observada para el clon de cDNA de longitud completa de T36 (BAC-CTV-T36FL) (Tabla 4). Mientras que en las hojas infiltradas con el clon de T36 el número de copias de gRNA aumentó entre 7 y 28 DPI, en la mayoría de las infiltradas con los clones de longitud completa de T318A el número de copias de gRNA aumentó entre 7 y 14 DPI para luego descender entre 14 y 28 DPI, llegando en algunos casos a ser indetectable en los días posteriores a 28 DPI. Esta cinética se corroboró mediante hibridación tipo Northern-blot con algunos de los clones, observándose un descenso no sólo en la acumulación de gRNA sino también en la de los sgRNA de p23, p20 y p25 a partir de 14 DPI, que en algunos casos no pudieron ser detectados a partir de 21 DPI (Figura 17). Aunque la hibridación tipo Northern-blot permitió detectar la presencia del sgRNA de p25 en las hojas infiltradas con los clones de T318A, con una acumulación máxima a los 14 DPI, la detección de la proteína de la cápsida p25 mediante ELISA resultó generalmente negativa o se obtuvieron lecturas muy bajas y poco reproducibles en contraste con las plantas control infiltradas con el clon de T36. En estas últimas (T36) tanto la detección del sgRNA de p25 mediante Northern-blot como de la proteína p25 por ELISA fueron siempre positivos a partir de 14 DPI (Figura 17 y datos no mostrados).

Por otro lado, la mayoría de las plantas agroinfiltradas con el clon de T36 mostraron con el tiempo los síntomas de infección sistémica descritos en la Introducción de este capítulo y se pudo detectar CTV mediante ELISA en las hojas superiores. Por el contrario, las plantas infiltradas con los clones de T318A no mostraron síntomas y la detección de CTV por ELISA en las hojas superiores fue negativa, excepto en el caso de algunos clones (BAC-T318AFL-11, BAC-T318AFL-9, BAC-T318AFL-12) en los que de forma ocasional se obtuvieron lecturas ELISA positivas a los 45 DPI, asociadas con la detección de pequeñas cantidades de gRNA mediante RT-PCR

cuantitativa, si bien esta detección no fue consistente y reproducible en fechas posteriores.

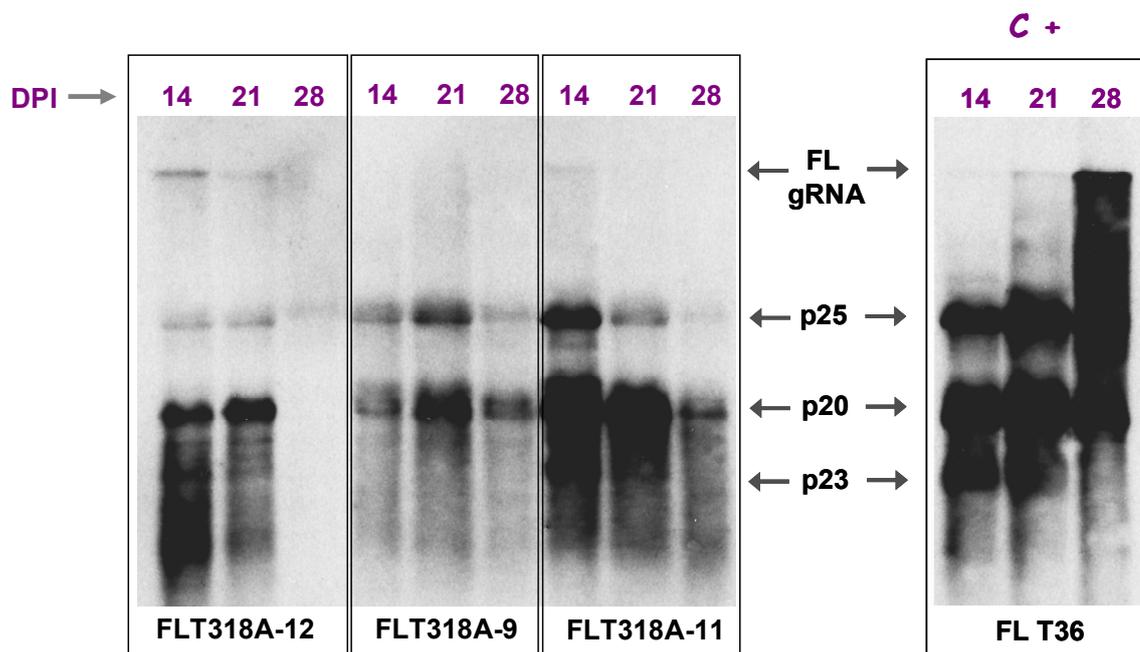


Figura 17. Hibridación molecular tipo Northern-blot de RNA de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas por separado con los tres clones BAC-FLT318A que presentaron mayor nivel de acumulación. Se incluyó como control el clon de longitud completa de T36 (BAC-CTV-T36FL). La membrana se hibridó con una sonda de RNA-DIG de polaridad negativa del extremo 3' del aislado T318A. Se indican las posiciones del gRNA y de los sgRNAs 3' co-terminales p25, p20 y p23.

Para ver si esta falta de infectividad en los clones de longitud completa de T318A era debida a reorganizaciones genómicas, pérdida de fragmentos o a la introducción de mutaciones letales en los procesos de amplificación o clonación, se seleccionó uno de los clones (BAC-T318AFL-11) con mayor eficacia replicativa, confirmada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y por hibridación tipo Northern-blot, para examinar la secuencia de su mitad 3' terminal (desde la ORF 2 hasta la ORF 11). No se observó mutación o deleción alguna en la región secuenciada, en comparación con la secuencia completa del gRNA de T318A depositada en la base de datos (DQ151548), que pudiera ser responsable de una ruptura de la pauta de lectura en alguno de los genes.

A)

	Día	Media Ct ± S.D. <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Número de copias de gRNA
FLT318A-12	D14	27.32 ± 0.28	0.74	3.92 x 10 <sup>2</sup>
	D21	27.96 ± 0.34	0.17	3.50 x 10 <sup>2</sup>
	D28	29.87 ± 0.36	0.10	6.60 x 10 <sup>1</sup>
FLT318A-9	D14	30.73 ± 0.34	1.22	6.60 x 10 <sup>1</sup>
	D21	28.80 ± 0.28	0.68	1.82 x 10 <sup>2</sup>
	D28	29.65 ± 0.45	0.22	1.35 x 10 <sup>2</sup>
FLT318A-11	D14	27.66 ± 0.20	0.04	3.70 x 10 <sup>2</sup>
	D21	28.07 ± 0.17	0.04	1.50 x 10 <sup>2</sup>
	D28	30.25 ± 0.23	0.07	8.30 x 10 <sup>1</sup>
FL T36	D14	29.99 ± 0.52	0.29	2.00 x 10 <sup>1</sup>
	D21	28.65 ± 0.27	0.80	3.60 x 10 <sup>2</sup>
	D28	26.75 ± 0.22	0.37	5.54 x 10 <sup>2</sup>

B)

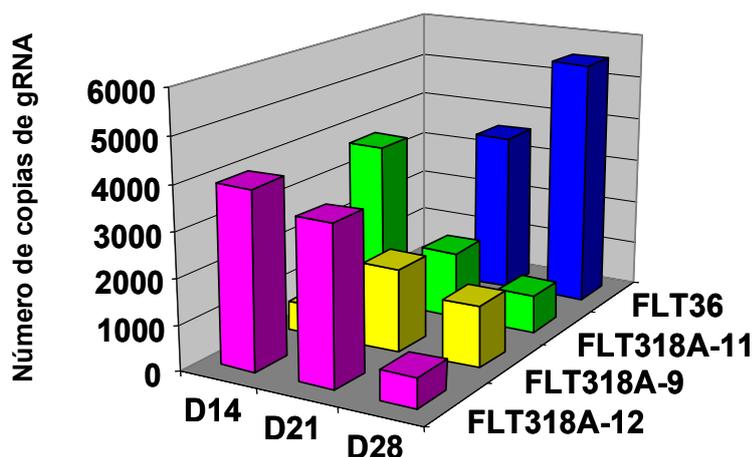


Figura 18. A) Detección y cuantificación de copias de gRNA por nanogramos de RNA<sub>t</sub> mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (utilizando la pareja de cebadores PM197D-PM198R y SYBR Green I) en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas por separado con los 3 clones BAC-FLT318A más eficientes, y con el clon de longitud completa de T36 (BAC-CTV-T36FL), a los 14, 21 y 28 DPI. <sup>a</sup> Media del ciclo umbral (Ct) y desviación estándar (S.D.) obtenida de tres ensayos independientes con dos réplicas por ensayo. <sup>b</sup> Coeficiente de variación (CV%) entre ensayos. B) Representación gráfica de las cuantificaciones de gRNA de los clones mostrados en A.

#### 4.3.4.3 Ensayos de co-infiltración con clones BAC de los aislados T318A y T36

La acumulación de los minireplicones de T318A en las hojas agroinfiltradas indicaba que la maquinaria replicativa de estas construcciones era adecuada. Por otra parte, la pauta de acumulación del gRNA de T318A en las hojas agroinfiltradas con clones de longitud completa (aumento hasta 14 DPI y disminución posterior) sugerían que el virus no se movía a células vecinas para iniciar nuevas infecciones y continuar acumulándose. Finalmente, la ausencia de mutaciones o supresiones que pudiesen justificar la diferente cinética de acumulación de T318A en comparación con T36, podía ser indicio de una interacción inapropiada entre T318A y *N. benthamiana* que impediría o dificultaría el movimiento célula a célula del virus. Para examinar esta hipótesis y la posibilidad de que las proteínas expresadas por T36 pudiesen facilitar el movimiento célula a célula, o incluso la infección sistémica de T318A, se co-infiltró el clon BAC-T318AFL-11 de T318A, cuya secuencia de la región 3' terminal había sido comprobada, junto con el clon BAC-T36FL del aislado T36. La presencia de T318A y T36 en las hojas infiltradas y en las superiores se analizó utilizando el protocolo de RT-PCR cuantitativa para la detección y cuantificación de genotipos específicos de CTV desarrollado en el capítulo 3 de esta memoria, utilizando las sondas TaqMan LNA V-SP (específica para T318A) y T-T36 (específica para T36). Este análisis permitió detectar T318A y T36 en las hojas co-infiltradas, sin embargo, la co-inoculación no consiguió incrementar la acumulación de T318A siguiendo la cinética de T36, ni el movimiento sistémico de T318A a las hojas superiores, en las que sí se detectó T36. Todas las plantas resultaron infectadas sistémicamente por T36 y mostraron la sintomatología típica previamente descrita.

### 4.4. DISCUSIÓN.

La búsqueda de motivos de secuencia responsables de los diferentes determinantes de patogenicidad de CTV hace necesario disponer de un sistema genético eficiente basado en clones de cDNA de aislados que produzcan los distintos síndromes. La obtención de un sistema genético manipulable para CTV ha sido más difícil que para otros virus de plantas debido a factores como: i) el gran tamaño de su genoma (~19.3 kb) y la toxicidad de algunas regiones del mismo que dificultan el mantenimiento y manipulación de los clones de cDNA en células procarióticas, y ii) la restringida gama de huéspedes del virus y su distribución limitada al floema, que no permiten disponer de un sistema experimental sencillo para los bioensayos. Al inicio de esta memoria se disponía de un clon infeccioso del aislado T36 de Florida, que induce los síndromes de decaimiento y SY pero no el de SP (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001). Sin embargo, para identificar los genes de CTV implicados en la inducción de acanaladuras en la madera o SP de naranjo dulce y pomelo era conveniente disponer de un clon infeccioso de un aislado que indujese estos síntomas como el aislado de origen español T318A. Una peculiaridad de este aislado es la presencia de tres dRNAs de gran tamaño que podrían servir como minireplicones naturales para el desarrollo de un sistema genético de T318A más sencillo y fácil de manipular. La secuenciación de las regiones próximas al punto de recombinación de estos tres dRNAs mostró, en todos los casos, su colinearidad con la secuencia genómica de T318A y una identidad de secuencia del 100%, sin que se hallasen inserciones o sustituciones de nucleótidos que pudieran generar codones de parada como se ha descrito para otros dRNAs (Ayllón *et al.*, 1999a). Esta circunstancia y la presencia de grupos de 2 a 4 nucleótidos repetidos en las dos regiones del genoma en las que se produjo la recombinación sugieren que ésta pudo ocurrir por un mecanismo de cambio de molde de la polimerasa, similar al descrito para otros dRNAs de menor tamaño (Ayllón *et al.*, 1999a). La presencia de tallos y

bucles en la estructura secundaria de mínima energía predicha para las zonas flanqueantes del punto de recombinación, que atenúan la procesividad de la RNA polimerasa y facilitan su separación del molde, apoyarían esta hipótesis. La organización genómica de estos dRNAs, que incluyen las ORFs 1a y 1b en su mitad 5' y la secuencia de p23 y p20 (dRNA 1), de p23 (dRNA 2) o de parte de éste (dRNA 3) en su mitad 3', es similar a la descrita por Che *et al* (2003) para el grupo 1 de dRNAs de VT y les da capacidad de replicación autónoma. Es de señalar, sin embargo, que mientras los dRNA 2 y 3 tienen la ORF 1b completa de T318A, a la ORF 1b del dRNA 1 le faltan los tres últimos aminoácidos, que son completados con otros tres diferentes procedentes de la ORF 9 y con un codón de parada también distinto al de la ORF 1b nativa (Figura 3B).

El desarrollo de un sistema genético basado en el aislado T318A y en la inoculación de células de *N. benthamiana* estaba condicionado a su capacidad para replicarse en esta especie que no es un huésped natural del virus. Por ello se comprobó en primer lugar que los viriones procedentes de plantas infectadas con T318A se replicaban en protoplastos de *N. benthamiana* de forma similar a los del aislado T36, mientras que los del aislado suave T385 no se replicaban en absoluto, a pesar de que la identidad nucleotídica de su ORF 1b (que codifica la RNA polimerasa) con la de T318A es superior al 91%, y la de T318A con T36 en la misma región no supera el 77%. El aislado T305, que también induce SP mostró una acumulación inferior a la de T318A y T36, probablemente debido a la presencia en su población de variantes de secuencia tipo T385 tal como se ha mostrado en el capítulo 3. A pesar de los resultados obtenidos con los viriones de T318A, ninguno de los 22 clones de cDNA basados en los tres dRNAs de gran tamaño produjo transcritos que resultasen infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. La falta de infectividad de un número tan elevado de minireplicones de T318A y el crecimiento extremadamente lento de las bacterias transfectadas con estos clones, sugiere un problema de toxicidad que podría haber generado mutaciones o reorganizaciones en estas construcciones haciéndolas inviables. De hecho, se conoce la existencia de una región tóxica para las bacterias en la ORF 1a del aislado T36 de CTV

que parece provocar la inserción de una U con cambio en la pauta de lectura y una reducción de la infectividad (Satyanarayana *et al.*, 2003). Pese a ello, los transcritos derivados de este clon se replicaban en protoplastos, lo que induce a pensar que en el caso de T318A el problema de toxicidad debe de ser más grave y generar reorganizaciones genómicas más importantes que hagan inviables los clones. Por ello, se abordó una estrategia alternativa para obtener clones de cDNA de este aislado bajo la acción del promotor 35S del CaMV en un vector binario de bajo número de copias (tipo BAC) que permitiera expresar el RNA infeccioso directamente en planta. Para generar los cassettes de expresión de CTV se clonaron las secuencias virales bajo un promotor 35S de CaMV con un punto de inicio de la transcripción modificado para obtener transcritos virales con extremos 5' precisos, seguidas de secuencias para la terminación y el procesamiento correcto del extremo 3' de los transcritos. Además, como ya había sido descrito para otras secuencias virales, se impidió la expresión de la región tóxica de CTV interrumpiendo la pauta de lectura de la ORF 1a mediante la inserción de un intrón de patata (Johansen, 1996; Yang *et al.*, 1998; López-Moya y García, 2000; González *et al.*, 2002; Marillonnet *et al.*, 2005). La inserción del intrón consiguió el efecto esperado de estabilización de las construcciones y las bacterias transfectadas con clones del aislado T318A basados en el dRNA 1 mostraron un crecimiento similar al observado para los minireplicones BAC-T36 (Ambrós *et al.*, datos no publicados).

Para hacer un seguimiento temporal de la acumulación de los minireplicones en hojas agroinfiltradas y poder comparar su eficacia replicativa se optimizó un nuevo protocolo de qRT-PCR con SYBR Green I, ya que los dos sistemas previamente desarrollados para CTV (capítulos 2 y 3) utilizan un cebador que anilla en la ORF 2 y los dRNAs de T318A carecen de esta ORF y no podrían ser amplificados. El problema se obvió diseñando nuevos cebadores específicos sobre secuencias conservadas en la ORF 11 (gen *p23*), una región génica presente en los los dRNAs 1 y 2. El nuevo ensayo de RT-PCR a tiempo real permitió la detección consistente y reproducible de al menos  $10^2$  copias de *p23* en extractos de planta.

La agroinfiltración de los nuevos clones basados en los dRNAs 1 y 2 de T318A, subclonados en un vector binario bajo el promotor 35S y con un intrón interrumpiendo la ORF 1a mostró una replicación eficiente en hojas de *N. benthamiana*, según se puso de manifiesto en los análisis mediante RT-PCR cuantitativa o hibridación tipo Northern-blot. Estos últimos permitieron detectar los sgRNAs de p20 y p23 en las hojas infiltradas con clones del dRNA 1, lo que confirmó la plena funcionalidad de la RNA polimerasa modificada que contiene este dRNA. En cambio no se detectó el sgRNA de p23 en las hojas agroinfiltradas con clones del dRNA 2, ya que aunque este minireplicón contiene la secuencia completa de la ORF 11 no lleva la secuencia promotora necesaria para expresarse. La cinética de acumulación de los minireplicones derivados de T318A fue similar a la observada para el minireplicón de T36: el número de copias de p23 aumentó entre 7 y 21 DPI para luego descender entre 21 y 28 DPI. Aunque la eficacia replicativa de los distintos clones mostró algunas diferencias, los niveles de acumulación máxima fueron similares y en ocasiones superiores a los del minireplicón de T36.

A partir de los minireplicones con mayor eficacia replicativa se prepararon clones de cDNA del genoma completo de T318A insertando para ello la región genómica central que les faltaba. Los 12 clones BAC-FLT318A de longitud completa del aislado T318A que se ensayaron y el control de T36 mostraron una replicación eficiente en las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, detectable mediante el sistema general de RT-PCR cuantitativa desarrollado en el capítulo 2 a partir de 7 DPI. Sin embargo, la cinética de acumulación del gRNA fue distinta para los clones de ambos aislados: mientras que en hojas agroinfiltradas con el clon de T36 el número de copias de gRNA aumentó entre 7 y 28 DPI, en las infiltradas con los clones de longitud completa de T318A se observó un aumento similar entre 7 y 14 DPI para luego descender entre 14 y 28 DPI, llegando en algunos casos a ser indetectable a partir de 28 DPI. Esta cinética se corroboró con algunos de los clones mediante hibridación tipo Northern-blot, observándose a partir de 14 DPI un descenso no sólo en el gRNA sino también en la expresión de los sgRNAs de p23, p20 y p25, que en algunos casos no pudieron ser detectados

a partir de 21 DPI. Aunque la hibridación tipo Northern-blot mostró la presencia del sgRNA de p25 en hojas agroinfiltradas con clones de T318A, con una acumulación máxima a los 14 DPI, los análisis ELISA fueron negativos excepto en casos puntuales en los que se obtuvieron reacciones dudosas o ligeramente positivas. Por el contrario, las hojas infiltradas con el clon de T36 fueron siempre claramente positivas a partir de los 14 DPI.

La distinta pauta de acumulación temporal de T318A en las hojas agroinfiltradas en comparación con la de T36 y la ausencia de una infección sistémica con el primer aislado, sugerían que aunque T318A puede replicarse en células de *N. benthamiana*, podría tener una movilidad de célula a célula muy limitada o inexistente que impediría su acumulación continuada en la planta. Para averiguar si alguna mutación o reorganización genética podía ser responsable de esta acumulación limitada se seleccionó uno de los clones que había mostrado mayor eficacia replicativa (BAC-T318AFL-11) y se re-secuenció la mitad 3' terminal de su gRNA (ORFs 2 a 11). No se observó ninguna mutación o reorganización genómica en comparación con la secuencia completa del gRNA de T318A depositada en la base de datos que pudiera ser responsable de la inactivación de alguno de los genes por la aparición de un codón de parada, un cambio en la pauta de lectura o una mutación en las secuencias promotoras/terminadoras de los sgRNAs. Estos resultados hacen pensar que, en contraste con T36, las proteínas expresadas por T318A podrían no acoplarse de forma apropiada con factores del huésped implicados en el movimiento del virus a corta y a larga distancia, limitando así su acumulación.

Finalmente, se examinó la posibilidad de que T318A pudiese moverse en *N. benthamiana* utilizando en *trans* las proteínas expresadas por T36, co-infiltrando los clones BAC-T318AFL-11 y BAC-T36FL, que portan cDNAs de T318A y T36, respectivamente. La presencia del gRNA de ambos genotipos en las hojas co-infiltradas y en las superiores se analizó utilizando el protocolo de RT-PCR a tiempo real desarrollado en el tercer capítulo de esta memoria con las sondas TaqMan LNA V-SP y T-T36, específicas de los genotipos T318A y T36, respectivamente. Mientras el genotipo T36 se acumuló en las hojas co-infiltradas y en las superiores siguiendo la misma

pauta que en las agroinfiltraciones simples, la co-infiltración con T36 no consiguió un incremento del número de copias de gRNA de T318A en las hojas infiltradas ni de movimiento a las hojas superiores.

La falta de movimiento de T318A en *N. benthamiana* supone una complicación pero no un impedimento definitivo para utilizar el nuevo sistema genético desarrollado en el estudio de los determinantes del síndrome de SP ya que en cualquier caso este sistema sería más cómodo y eficiente que el basado en la inoculación de transcritos de RNA en protoplastos y podría ser un sistema apropiado para estudiar los genes implicados en el movimiento célula a célula y a larga distancia en *N. benthamiana* preparando construcciones híbridas T318A/T36. Si alguno de estos híbridos infectase sistémicamente *N. benthamiana* y mantuviese en cítricos el fenotipo de T318A, podría utilizarse como base de un nuevo sistema genético para estudiar los determinantes del síndrome de SP, pero manteniendo la ventaja de la infección sistémica de *N. benthamiana*.



## **DISCUSIÓN GENERAL**



El control de los aislados más virulentos de CTV, en particular los que causan SP en pomelo o naranjo dulce, requiere desarrollar métodos rápidos y sensibles para la identificación de éstos. Para la puesta a punto de estos métodos sería necesario conocer los determinantes de patogenicidad de CTV y en particular los del síndrome de SP. Al inicio de esta memoria se disponía de un clon infeccioso del aislado T36 de Florida, que induce los síndromes de decaimiento y SY pero no el de SP (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2001), por lo que resultaba conveniente disponer de un clon infeccioso de cDNA de un aislado de CTV inductor de SP y desarrollar un sistema genético eficiente para producir y ensayar *in vivo* clones híbridos obtenidos sustituyendo distintos fragmentos del genoma de este aislado por otros homólogos de un aislado asintomático. Por razones de cuarentena se decidió seleccionar y secuenciar un aislado inductor de SP en naranjo dulce y pomelo de origen español. Para evitar los inconvenientes de una población viral genéticamente heterogénea, frecuente en aislados virulentos (Rubio *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2002; Ayllón *et al.*, 2006), se examinó la estructura poblacional de varios aislados inductores de SP de origen español y se seleccionó el aislado T318A, obtenido después de transmitir el aislado T318 por pulgones (Sambade *et al.*, 2007), ya que presentaba una población muy homogénea. La estrategia de secuenciación elegida, dirigida a simplificar la preparación de un futuro clon de cDNA de longitud completa, consistió en la síntesis de cuatro fragmentos solapantes de cDNA que cubrían todo el gRNA del aislado T318A mediante RT-PCR larga evitando sesgar la población de partida. La secuenciación del aislado T318A mostró que éste presenta una organización genómica idéntica a la del resto de aislados de CTV secuenciados y que los productos proteicos potencialmente codificados en sus 12 ORFs son también similares. Este aislado mostró los valores de identidad nucleotídica más elevados con los aislados más agresivos y los más bajos con T36. La elevada identidad de secuencia con los demás aislados virulentos se observó no sólo en las zonas codificantes sino incluso en las UTRs. Fue interesante constatar que plantas infectadas con T318A contenían únicamente secuencias de tipo II, previamente asociadas con los aislados más virulentos (Ayllón *et al.*, 2001; López *et al.*, 1998), siendo ésta

la primera vez que únicamente se detectan secuencias de tipo II en un aislado de CTV. La inoculación de T318A en distintas combinaciones de naranjo dulce, mandarino, pomelo o zamboa sobre citrange Carrizo permitió confirmar su capacidad para inducir el síndrome de SP en naranjos dulces Berna Washington navel, Valencia y Salustiana y en el pomelo Star Ruby. Una peculiaridad adicional de este aislado es la presencia de tres dRNAs de gran tamaño que podrían servir como minireplicones naturales para el desarrollo de un sistema genético más sencillo y fácil de manipular.

Para evaluar estos futuros clones de cDNA del aislado T318A era preciso disponer de una herramienta que permitiese cuantificar la acumulación de gRNA en células o tejidos infectados. Para ello se desarrolló un sistema de RT-PCR cuantitativa a tiempo real con SYBR Green I que evitase la interferencia de los numerosos sgRNAs y dRNAs dirigiendo los cebadores directo y reverso a las ORFs 1b y 2, respectivamente. La pareja de cebadores PM197D-PM198R permitió amplificar de forma eficiente y sensible 56 aislados de CTV de orígenes y características patogénicas diferentes. Las curvas de fusión de los productos amplificados también revelaron que la  $T_m$  característica de los aislados no agresivos de CTV era más baja que la de los aislados más virulentos y permitió una identificación preliminar correcta de la mayoría de los aislados. El protocolo general de RT-PCR a tiempo real permitió la detección consistente y reproducible de 100 copias de gRNA en extractos de planta. Mediante curvas estándar externas se pudo estimar de forma reproducible el número de copias de gRNA en varios tejidos de diferentes especies de cítricos infectadas con aislados de CTV de distintas características patogénicas, lo que confirmó su utilidad para evaluar la eficiencia replicativa de distintas construcciones quiméricas en un sistema genético de CTV.

Asimismo, para evaluar futuros clones de cDNA del aislado T318A en presencia de T36, y como herramienta para la detección en campo de aislados potencialmente peligrosos por ser portadores de variantes de secuencia patogénicas, se desarrolló un nuevo sistema de detección y cuantificación de genotipos específicos mediante RT-PCR a tiempo real. Para ello, se diseñaron tres sondas TaqMan LNA específicas para las

variantes de secuencia características de tres genotipos de CTV previamente detectados: aislados asintomáticos (NV), virulentos inductores de SP (v-SP) y tipo T36 (T-T36) (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). Estas sondas permitieron la detección de su diana específica en mezclas de variantes de secuencia que contienen menos del 2.5% de la secuencia homóloga, y el límite de detección para las tres fue de  $10^2$  de copias de gRNA. La validación de este protocolo con un panel de 56 aislados de CTV con orígenes geográficos y características patogénicas diferentes confirmaron la sensibilidad y especificidad de las sondas LNA para la detección general de CTV y la caracterización de aislados, incluso usando tejido de cítricos desecado años antes. La reacción con la sonda V-SP permitió identificar correctamente el 95% de los aislados inductores de SP, mientras que la reacción con las sondas V-SP o T-T36 identificó todos los aislados potencialmente virulentos en España (inductores de SY y/o SP) y todos los que se ensayaron procedentes de una colección internacional. Los aislados no virulentos reaccionaron únicamente con la sonda NV, lo que indica una población genéticamente homogénea, mientras que la mayoría de los aislados virulentos reaccionaron con dos sondas, indicando que sus poblaciones son más complejas, como se había sugerido analizando con técnicas diferentes otras regiones del gRNA (Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2002, 2003). Aunque este protocolo incluye tres reacciones separadas de RT-PCR a tiempo real (una para cada sonda LNA), resulta mucho más rápido, sensible y específico que otros protocolos previos y permite estimar la proporción de los diferentes genotipos presentes en la población viral. Su utilidad para evaluar la estabilidad de la protección cruzada o para analizar la dinámica poblacional en infecciones mixtas se examinó estudiando la evolución temporal de la población viral en plantas de naranjo dulce co-inoculadas sucesivamente con un aislado asintomático (T32) y otro inductor de SP (T318A). Este ensayo permitió poner de manifiesto que cada una de las variantes de secuencia era capaz de invadir los tejidos previamente infectados por la otra, independientemente del orden de inoculación utilizado, y que la variante asintomático se acumuló en los tejidos infectados a un nivel superior al de la variante virulenta.

La aplicación de la RT-PCR a tiempo real con sondas TaqMan LNA específicas de genotipos a la identificación rápida de aislados potencialmente peligrosos, se basa en la conservación de las secuencias con las que hibridan las sondas en los tres genotipos de CTV. Sin embargo, esto no significa que la región seleccionada sea el determinante de patogenicidad, ya que podría tratarse de una mera asociación por co-evolución de dos regiones genómicas. Para utilizar esta herramienta de forma más precisa es necesario identificar en el genoma de CTV los determinantes reales de patogenicidad mediante ensayos de genética inversa. Para ello, se decidió desarrollar un sistema genético eficiente basado en el aislado T318A previamente secuenciado y caracterizado.

Como se ha mencionado anteriormente una peculiaridad de este aislado es la presencia de tres dRNAs de gran tamaño que podrían servir como minireplicones naturales para el desarrollo de un sistema genético de T318A. La caracterización molecular de estos tres dRNAs de gran tamaño mostró que incluyen las ORFs 1a y 1b en su mitad 5', y las secuencias de *p23* y *p20* (dRNA 1), de *p23* (dRNA 2) o de parte de éste (dRNA 3) en su mitad 3'. Esta organización genómica es similar a la descrita por Che *et al* (2003) para el grupo 1 de dRNAs de VT y les da capacidad de replicación autónoma. El único sistema genético disponible para CTV al inicio de esta memoria fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Dawson (University of Florida, C.R.E.C., Lake Alfred, EEUU) y se basa en el uso de clones de cDNA bajo el control de promotores fágicos que permiten sintetizar transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. Por ello, lo primero que se hizo fue comprobar que los viriones procedentes de plantas infectadas con el aislado T318A eran capaces de replicarse en protoplastos de *N. benthamiana*, ya que no todos los genotipos lo hacen. A pesar de los resultados obtenidos con los viriones de T318A, ninguno de los 22 clones de cDNA basados en los tres dRNAs de gran tamaño bajo la acción del promotor T7 produjeron transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*. La falta de infectividad de un número tan elevado de minireplicones de T318A y el crecimiento extremadamente lento de las bacterias transfectadas con estos clones, sugiere un problema de

toxicidad que podría haber generado mutaciones o reorganizaciones en estas construcciones haciéndolas inviables. Por ello, se abordó una estrategia alternativa para obtener clones de cDNA de este aislado bajo la acción del promotor 35S del CaMV en un vector binario de bajo número de copias (tipo BAC) que permitiera expresar el RNA infeccioso directamente en planta. Además, como ya había sido descrito para otras secuencias virales, se impidió la expresión de la región tóxica de CTV interrumpiendo la pauta de lectura de la ORF 1a mediante la inserción de un intrón de patata. Para hacer un seguimiento temporal de la acumulación de estos nuevos minireplicones en hojas agroinfiltradas y poder comparar su eficiencia replicativa se optimizó un nuevo protocolo de qRT-PCR con SYBR® Green I, ya que los dos sistemas previamente desarrollados para CTV (capítulos 2 y 3) utilizan un cebador que anilla en la ORF 2 y los dRNAs de T318A carecen de esta ORF y no podrían ser amplificados. El problema se obvió diseñando nuevos cebadores específicos sobre secuencias conservadas en la ORF 11 (gen *p23*), una región génica presente en los dRNAs 1 y 2. El nuevo ensayo de RT-PCR a tiempo real permitió la detección consistente y reproducible de al menos  $10^2$  copias de *p23* en extractos de planta.

La agroinfiltración de los nuevos clones basados en los dRNAs 1 y 2 de T318A, subclonados en un vector binario bajo el promotor 35S y con un intrón interrumpiendo la ORF 1a, mostró una replicación eficiente en hojas de *N. benthamiana*, según se puso de manifiesto en los análisis mediante RT-PCR cuantitativa o hibridación tipo Northern blot. Las pautas y niveles de acumulación de los minireplicones de T318A fueron similares a los del minireplicón control de T36, lo que apoya la idea de que su incapacidad para replicarse en protoplastos pudo ser debida a alteraciones de secuencia en las bacterias debido a la toxicidad. A partir de los minireplicones generados con mayor eficiencia replicativa se prepararon clones de cDNA del genoma completo de T318A insertando para ello la región genómica central que les faltaba y se ensayaron mediante el sistema de agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* desarrollado en el laboratorio.

La agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* con 12 clones BAC-FLT318A diferentes con el genoma completo del aislado T318A dio lugar a

una replicación eficiente en las hojas agroinfiltradas, detectable mediante el sistema general de RT-PCR cuantitativa desarrollado en el capítulo 2 a partir de 7 DPI. Sin embargo, la cinética de acumulación del gRNA de T318A fue distinta a la del aislado control T36: mientras que en hojas agroinfiltradas con el clon de T36 el número de copias de gRNA aumentó entre 7 y 28 DPI, en las infiltradas con los clones de longitud completa de T318A se observó un aumento similar entre 7 y 14 DPI para luego descender entre 14 y 28 DPI, llegando en algunos casos a ser indetectable a partir de 28 DPI. La distinta pauta de acumulación temporal de T318A en las hojas agroinfiltradas en comparación con la de T36 y la ausencia de una infección sistémica con el primer aislado, sugerían que si bien T318A se replica en células de *N. benthamiana*, podría tener una movilidad de célula a célula muy limitada o inexistente que impediría su acumulación continuada en la planta. Por ello, se co-inocularon ambos clones para ver si era posible una infección sistémica en la que T318A pudiese moverse utilizando en *trans* productos de T36. La presencia del gRNA de ambos genotipos en las hojas co-infiltradas y en las superiores se analizó utilizando el protocolo de RT-PCR a tiempo real con las sondas TaqMan LNA V-SP y T-T36, específicas de los genotipos T318A y T36, respectivamente. Mientras el genotipo T36 se acumuló en las hojas co-infiltradas y en las superiores siguiendo la misma pauta que en las agroinfiltraciones simples, la co-infiltración con T36 no consiguió un incremento del número de copias de gRNA de T318A en las hojas infiltradas ni su movimiento a las hojas superiores. De momento, el clon de cDNA de T318A y el nuevo sistema de agroinfiltración desarrollados podrían ser una herramienta apropiada para estudiar los genes implicados en el movimiento célula a célula y a larga distancia en *N. benthamiana* preparando construcciones híbridas T318A/T36. Si alguno de estos híbridos infectase sistémicamente *N. benthamiana* y mantuviese en cítricos el fenotipo de T318A, podría utilizarse como base de un nuevo sistema genético para estudiar los determinantes del síndrome de SP manteniendo la ventaja de la infección sistémica de *N. benthamiana*.

## **CONCLUSIONES GENERALES**



## CONCLUSIONES GENERALES

1. La secuencia del RNA genómico del aislado español de CTV T318A, inductor de los síndromes de amarilleo (SY) y acanaladuras en la madera (SP) en pomelo y naranja dulce, muestra elevada identidad nucleotídica con la de los aislados más virulentos de otros orígenes. La población de este aislado es muy homogénea y sólo contiene variantes de secuencia tipo II en la región 5' UTR.
2. Se ha desarrollado un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real que permite estimar de forma fiable el número de copias de RNA genómico de CTV en extractos de RNA de distintas especies y tejidos infectados. La temperatura media de fusión ( $T_m$ ) de los productos amplificados permite identificar preliminarmente los aislados como virulentos o no virulentos.
3. Se ha desarrollado un nuevo protocolo de RT-PCR a tiempo real, utilizando tres sondas específicas TaqMan LNA, que permite la detección y cuantificación de variantes de secuencia características de aislados no virulentos (NV), virulentos inductores de SP (SP) y virulentos tipo T36 (T36), incluso en mezclas con menos de 2.5% de RNA homólogo.
4. La validación del método con un panel de 56 aislados caracterizados biológicamente de 20 países mostró: i) que los aislados no virulentos reaccionan únicamente con la sonda NV, ii) que la sonda SP identifica el 96% de los aislados inductores de SP, y iii) que la reacción con las sondas SP o T36 identifica el 100% de los aislados potencialmente virulentos (inductores de SY y/o SP).
5. La aplicación de este protocolo al estudio de la población viral de plantas co-inoculadas sucesivamente con un aislado no virulento y otro inductor de SP permitió: i) poner de manifiesto que cada aislado

invade los tejidos previamente infectados por el otro, y ii) detectar pronto la ausencia de protección cruzada.

6. El aislado T318A contiene varios RNAs defectivos (dRNAs) de gran tamaño cuya región 5' terminal incluye los genes de la replicasa viral y potencialmente tienen capacidad de replicación autónoma. Los clones de cDNA obtenidos de estos dRNAs no dieron lugar a transcritos de RNA infecciosos en protoplastos de *N. benthamiana*, como ocurre con el aislado de referencia T36, pese a que los viriones de T318A replican en estos protoplastos al mismo nivel que los de T36.
7. Clones de cDNA similares, pero con la pauta de lectura de la ORF 1a interrumpida por la inserción de un intrón de planta y expresados bajo la acción del promotor 35S del CaMV en un vector binario de bajo número de copias, se replicaron eficientemente en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.
8. Todos los clones de longitud completa de T318A obtenidos a partir de los minireplicones con mayor eficacia replicativa, se replicaron y el RNA viral se acumuló durante dos semanas en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* aunque luego desapareció progresivamente.
9. La co-infiltración de *N. benthamiana* con los clones de longitud completa de T318A y del aislado de referencia T36, que se acumula progresivamente y da lugar a una infección sistémica, no dio lugar a mayor acumulación de T318A ni al movimiento sistémico de este aislado.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH (2007) Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan ((R)) real-time RT-PCR. *J Virol Methods* **142**: 1-9.

Agranovsky AA (1996) Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers. *Adv Virus Res* **17**: 119-158.

Albertini D, Vogel R, Bové C, Bové JM (1988) Transmission and preliminary characterization of citrus tristeza virus strain K. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds).. Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 17-21.

Albiach-Martí MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, López C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO (2000a) Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol* **74**: 6856-6865.

Albiach-Martí MR, Guerri J, Hermoso de Mendoza A, Laigret F, Ballester-Olmos JF, Moreno P (2000b) Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* **90**: 134-138.

Albiach-Martí MR, Guerri J, Cambra M, Garnsey SM, Moreno P (2000c) Differentiation of citrus tristeza virus isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *J Virol Methods* **88**: 25-34.

Albiach-Martí MR, Grosser JW, Gowda S, Mawassi M, Satyanarayana T, Garnsey SM, Dawson WO (2004) *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplast of resistant citrus relatives. *Mol Breeding* **14**: 117-128.

Ambrós S, Ruiz-Ruiz S, Guerri, J, Moreno P (2006) Obtención de clones de cDNA del genoma del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) infecciosos mediante agroinoculación. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Murcia, España.

Ambrós S, Ruiz-Ruiz S, Peña L, Guerri J, Moreno P (2008) Infección sistémica del virus de la tristeza de los cítricos en una especie no-huésped mediante

agroinoculación. XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Lugo, España.

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**: 1927-1933.

Arregui JM, Ballester JF, Pina JA, 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.

Aubert B, Bové C (1984) Mild and severe strains of citrus tristeza virus in Reunion Island. En: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Doods JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 57-61.

Ayllón MA, López C, Navas-Castillo J, Mawassi M, Dawson WO (1999a) New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation. *J Gen Virol* **80**: 871-821.

Ayllón MA, Rubio L, Moya A, Guerri J, Moreno P (1999b) The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology* **255**: 32-39.

Ayllón MA, López C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R, Moreno P (2001) Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* **146**: 27-40.

Ayllón MA, Gowda S, Satyanayanana T, Karasev AV, Adkins S, Mawassi M, Guerri J, Moreno P, Dawson WO (2003) Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **77**: 9232-9243.

Ayllón MA, Gowda S, Satyanarayana T, Dawson WO (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 MA, Rubio L, Sentandreu V, Moya A, Guerri, J, Moreno P (2006) Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes* **32**: 119-128.

Ball LA (1992) Cellular expression of a functional nodavirus RNA replicon from vaccinia virus vectors. *J Virol* **66**: 2335-2345.

Ballester-Olmos JF, Pina JA, Navarro L (1988) Detection of a tristeza-seedling yellows strain in Spain. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 28-32.

Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell EA, Moreno P, de Mendoza AH, Cambra M, Navarro L (1993) Biological Diversity of Citrus Tristeza Virus (Ctv) Isolates in Spain. *Plant Pathology* **42**: 219-229.

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 particles associated with tristeza disease. *Virology* **50**: 821-828.

Bar-Joseph M, 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, Loebenstein G, Oren Y (1974) Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. En: *Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). Berkeley, CA, USA: Univ Calif, Div Agr Sci, pp. 83-85.

Bar-Joseph M (1978) Cross protection incompleteness: a possible cause for natural spread of citrus tristeza after a prolonged lag period in Israel. *Phytopathology* **68**:1110-1111.

Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull DE, Clark MF, Loebenstein G (1979) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **69**: 190-194.

Bar-Joseph M, Lee RF (1989a) Citrus tristeza virus. *AAB Descriptions of plant viruses* No. **353**: 7 pp.

Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF (1989b) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annu Rev Phytopathol* **27**: 291-316.

Barbarossa L, Savino V (2006) Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dot-blot hybridization. *J Phytopathology* **154**: 329-335.

Batuman O, Mawassi M, Bar-Joseph M (2006) Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus* sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* **33**: 319-327.

Beachy RN, Loesch-fries SL, Turner NE (1990) Coat protein mediated resistance against virus infection. *Annu Rev Phytopathol* **28**: 451-74.

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

Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, De Luis A, Vidal E, Perez-Panades 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**:177-188.

Boonham N, Smith P, Walsh K, Tame J, Morris J, Spence N, Benison J, Barker I, (2002) The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips vectors using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods* **101**: 37-48.

Boonham N, González Pérez L, Mendez MS, Lilia Peralta E, Blockley A, Walsh K, Barker I, Mumford RA (2004) Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid*. *J Virol Methods* **116**: 139-146.

Borbón JC, Garnsey SM, Gottwald TR (1995) Incremento del grado de infección del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en presencia de su agente vector (toxoptera citricida Kirkaldy) en la República Dominicana. *Proceedings 3rd International Workshop on CTV and BrCA in the Caribbean Basin: Management Strategies*. pp. 50-55.

Bové JM, Vogel R (1981) Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of color slides. Paris, Francia: SETCO-IRFA.

Bové C, Vogel R, Albertini D, Bové JM (1988) Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 14-16.

Boyer JC, Haenni AL (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**: 415-426.

Boyko VP, Karasev AV, Agranovsky AA, Koonin EV, Dolja VV (1992) Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9156-9160.

Braasch DA, Corey DR (2001) Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* **8**: 1-7.

Braun CJ, Hemenway CL (1992) Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *Plant Cell* **4**: 735-744.

Brlansky RH, Damsteegt VD, Howd DS, Roy A (2003) Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Dis*. **87**: 397-401.

Broadbent P, Bevington KB, Coote BG (1991) Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 64-70.

Burguà J, Dalmay T, Rubino L, Russo M (1992) The replication of cymbidium ringspot tomosvirus defective interfering-satellite RNA hybrid molecules. *Virology* **190**: 579-586.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193.

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**: 23-39.

Cambra M, Garnsey SM, Permar TA, Henderson CT, Gumpf DJ, Vela C (1990) Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* **80**: 1034.

Cambra M, Camarasa E, Gorrís MT, Garnsey SM, Carbonell E (1991) Comparison of different immunosorbent assays for *Citrus tristeza virus* (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds)., Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 38-45.

Cambra M, Moreno P (2000) Tristeza En: *Enfermedades de los cítricos* (Durán-Vila N, Moreno P, Eds). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, pp. 77-81.

Cambra M, Gorrís MT, Olmos A, Martínez MC, Román, MP, Bertolini E, López A, Carbonell EA (2002) European diagnostic protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. En: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila N, Milne RG, da Graça JV, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 69-77.

Che X, Piestum D, Mawassi M, Yang G, Satyanarayana T, Gowda S, Dawson WO, Bar-Joseph M (2001) 5'-coterminal subgenomic RNAs in *Citrus tristeza virus*-infected cells. *Virology* **283**: 374-381.

Che X, Mawassi M, Bar-Joseph M (2002) A novel class of large and infectious defective RNAs of *Citrus tristeza virus*. *Virology* **298**: 133-145.

Che X, Dawson WO, Bar-Joseph M (2003) Defective RNAs of *Citrus tristeza virus* analogous to Crinivirus genomic RNAs. *Virology* **310**: 298-309.

Costa AS, Muller GW, Costa CL (1968) Rearing the tristeza vector *Toxoptera citricidus* on squash. En: *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Childs JFL, Ed). Gainesville, Florida, USA: University of Florida Press, pp. 32-35.

Costa AS, Muller GW (1980) Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis* **64**: 538-541.

Covey SN, Alkaff NS, Langara A, Turner DS (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**: 781-782.

Da Graça JV, Marais LJ, Von Broembsen LA (1984) Severe tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. En: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-65.

Dessens JT, Lomonossoff GP (1993) Cauliflower mosaic virus 35S promoter-controlled DNA copies of cowpea mosaic virus RNAs are infectious on plants. *J Gen Virol* **74**: 889-892.

Devereux JP, Haeblerli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395.

Dodds JA, Jarupat T, Lee JG, Roistacher CN (1987) Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **77**: 442-447.

Dodds JA, Lee JG (1991) An evaluation of types of citrus tristeza virus in selected sweet orange groves in Southern California. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Navarro L, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 103-112.

Dolja VV, Karasev AV, Koonin EV (1994) Molecular Biology and Evolution of Closteroviruses: Sophisticated Build-up of Large RNA Genomes. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 261-285.

Dolja VV, Kreuze JF, Valkonen JPT (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* **117**: 38-51.

Domingo E, Holland JJ (1994) Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. En: *Evolutionary Biology of Viruses* (Morse SS, Ed). New York, USA: Raven Press, pp. 171-180.

Domingo E, Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**: 151-178.

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.

Dreier J, Störmer M, Mäde D, Burkhardt S, Kleesiek K (2006) Enhanced reverse transcription-PCR assay for detection of norovirus genogroup I. *J Clinical Microbiol* **44**: 2714-2720.

Duran-Vila N, Moreno P (2000) Enfermedades de los cítricos., Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa, 165 pp.

D' Urso F, Ayllón MA, Rubio L, Sambade A, Hermoso-de-Mendoza A, Guerri J, Moreno P (2000) Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* **49**: 288-294.

D' Urso F, Sambade A, Moya A, Guerri J, Moreno P (2003) Variation of haplotype distributions of two genomic regions of *Citrus tristeza virus* populations from eastern Spain. *Mol Ecol* **12**: 517-526.

Dzianott AM, Bujarski JJ (1989) Derivation of an infectious viral RNA by autolytic cleavage of in vitro transcribed viral cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4823-4827.

Eckes P, Rosahl S, Schell J, Willmitzer L (1986) Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol Gen Genet* **205**: 14-22.

Fabre F, Kervarrec C, Mieuzet L, Riault AV, 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) Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of citrus tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Mol Plant Microb Interac* **18**: 435-445.

Fang DQ, Roose ML (1999) A novel gene conferring *Citrus tristeza virus* resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *Hort Science* **34**: 334-335.

FAO <http://apps.fao.org>.

Fawcett HS, Wallace JM (1946) Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif Citogr* **32**: 88-89.

Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee R F, Niblett CL (1996) The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* **86**: 1331-1335.

## BIBLIOGRAFÍA

---

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 Thecnol Aliment* **15**: 93-97.

Folimonov AS, Folimonova SY, Bar-Joseph M, Dawson WO (2007) A stable RNA virus-based vector for citrus trees. *Virology* **368**: 205-216.

Fraser L (1952) Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of New South Wales* **63**: 125-131.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**: 112-125.

Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Brüning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y (2002) A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **16**: 99-110.

Fulton RW (1986) Practices and precautions in the use of cross protection for plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **24**: 67-81.

Gallie DR, Kobayashi M (1994) The role of the 3'-untranslated regions of nonpolyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency. *Gene* **142**: 159-165.

García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 157-186.

Garnsey SM, Gonsalves D, Purcifull DE (1977) Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **67**: 956-968.

Garnsey SM, Barrett HC, Hutchinson DJ (1987) Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* **19**: 187-191.

Garnsey SM, Müller GW (1988) Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 46-54.

Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Yokomi RK, Lee RF (1991) Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 113-120.

Garnsey SM, Permar TA, Cambra M, Henderson CT (1993) Direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). En: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 39-50.

Garnsey SM, Civerolo EL, Lee RF, Yokomi RK, Behe CC (1995) Using the Beltsville international CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of citrus tristeza virus. En: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Workshop on Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies* (Lee RF, Rocha-Peña M, Niblett CL, Ochoa F, Eds). Lake Alfred, FL, USA: FAO, University of Florida, USDA-OICD, pp. 253-259.

Garnsey SM, Gottwald TR, Yokomi RK (1998) Control strategies for citrus tristeza virus. In: *Plant virus disease control* (Hadidi A, Khetarpal R, Koganezawa H, Eds). St. Paul, MN, USA: APS Press, pp. 639-658.

Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Paul C, Hilf ME, Lee RF, Brlansky RH, Yokomi RK, Hartung JS (2006) Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. En: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Peña MA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 75-93.

Ghorbel R, López C, Fagoaga 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.

Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee R (1993) Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **44**: 305-317.

Gonsalves D, Purcifull DE, Garnsey SM (1978) Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **68**: 553-559.

González JM, Pénez Z, Almazán F, Calvo E, Enjuanes L (2002) Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J Virol* **76**: 4655-4661.

Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson WO (2000) The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* **274**: 246-254.

Gowda S, Satyanarayana T, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Rabindran S, Garnsey SM, Dawson WO (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 MA, Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Dawson WO (2003a) Transcription strategy in a Closterovirus: a novel 5'- proximal controller element of *Citrus Tristeza Virus* produces 5' and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3' open reading frame controller elements. *J Virol* **77**: 340-52.

Gowda S, Satyanayanana T, Ayllón MA, Moreno P, Flores R, Dawson WO (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 CJ, Garnsey SM, Dawson WO (2005) Infection of Citrus Plants with Virions Generated in *Nicotiana benthamiana* Plants Agroinfiltrated with a Binary Vector Based *Citrus tristeza virus*. En: *Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Peña MA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 23-33.

Grant TJ, Costa AS (1951) A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* **41**: 114-122.

Grant TJ, Higgins RP (1957) Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* **47**: 272-276.

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

Graves MV, Roosinck MJ (1995) Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the Fny strain of cucumber mosaic cucumovirus. *J Virol* **69**: 4746-4751.

Grisoni M, 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. En: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-68.

Guerri J, Moreno P, Muñoz N, Martínez ME (1991) Variability among spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded-RNA análisis. *Plant Pathol* **40**: 38-44.

Hamilton CM (1997) A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* **200**: 107-116.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.

Hashimoto JG, Beadles-Bohling AS, Wiren KM (2004) Comparison of RiboGreen and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Biotechniques* **36**: 54-59.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA (1984) Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, *Aphididae*) in Spain. En: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 23-27.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA (1988a) Comparative aphid transmission of a common citrus tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. En: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 68-70.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA, Serra JA, 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. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-64.

Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL, Garnsey SM (1995) Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**: 576-582.

Hilf ME, Karasev AV, Albiach-Martí MR, Dawson WO, Garnsey SM (1999) Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology* **89**: 336-342.

Hilf ME, Mavrodieva VA, Garnsey SM (2005) Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **95**: 909-917.

Hillman BI, Carrington JC, Morris TJ (1987) A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**: 427-433.

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

Johansen IE (1996) Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12400-12405.

Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowsky DJ, Dawson WO (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**: 511-520.

Karasev AV, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO (1997) Transcriptional Strategy of Closteroviruses: Mapping the 5' termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs. *J Virol* **71**: 6233-6236.

Kitajima EW, Silva DM, Oliveira AR, Muller GW, Costa AS (1963) Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature* **201**: 1011-1012.

Koizumi M (1991) Citrus tristeza virus field isolates from declined or dwarfed citrus trees in Japan. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp 25-30.

Kong P, Rubio L, Polek M, Falk BW (2000) Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes* **21**: 139-145.

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.

Kumar R, Singh SK, Koshkin AA, Rajwanshi VK, Meldgaard M, Wengel J (1998) The first analogues of LNA (Locked Nucleic Acids): Phosphorothioate-LNA and 2' -thio-LNA. *Bioorg Med Chem Let* **8**: 2219-2222.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief in Bioinform* **5**: 150-163.

Kyriakou A, Ioannou N, Gavriel J, Bar-Joseph M, Papayiannis C, Kapar-Isaia T, Savva G (1996) Management of citrus tristeza virus in Cyprus. En: *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graça JV, Moreno P, Yokomi RK, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 172-178.

Larionov A, Krause A, Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**: 62.

Lastra R, Meneses R, Still PE, Niblett C (1991) The citrus tristeza situation in Central America. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 146-149.

Latorra D, Arar K, Hurley JM (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes* **17**: 253-259.

Lewandowski DJ, Dawson WO (1998) Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology* **251**: 427-437.

Li XH, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE (1989) Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9173-9177.

Lindbo JA, Dougherty WG (1992) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725-733.

López C, Ayllón MA, Navas-Castillo J, Guerri J, Moreno P, Flores R (1998) Sequence polymorphism in the 5' and 3' terminal regions of citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* **88**: 685-691.

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**: 462-470.

López-Moya JJ, García JA (2000) Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res* **68**: 99-107.

Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15742-15747.

Lu G, Moriyama EN (2004) Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform* **5**: 378-388.

Mackay IM, Arden K E, Nitsche A (2002) Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* **30**: 1292-1305.

Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* **23**: 718-723.

Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja VV, Duffus JE, Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev AV, Minafra A, Murrant A, Namba S, Niblett CL, Vetter HJ, Yoshikawa N (2000) Family Closteroviridae. En: *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Eds). San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 943-952.

Mawassi M, Gafny R, Gagliardi D, Bar-Joseph M (1995a) Populations of citrus tristeza virus contain smaller-than-full-length particles which encapsidate sub-genomic RNA molecules. *J Gen Virol* **76**: 651-659.

Mawassi M, Karasev AV, Mietkiewska E, Gafny R, Lee RF, Dawson WO, Bar-Joseph M (1995b) Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. *Virology* **208**: 383-387.

Mawassi M, Mietkiewska E, Gofman R, Yang G, Bar-Joseph JM (1996) Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* **77**: 2359-2364.

Mawassi M, Satyanayanana T, Albiach-Martí MR, Gowda S, Ayllón MA, Robertson C, Dawson WO (2000a) The fitness of *Citrus tristeza virus* defective RNA is affected by the length of their 5' and 3' termini and by coding capacity. *Virology* **275**: 42-56.

Mawassi M, Satyanayanana T, Gowda S, Albiach-Martí MR, Robertson C, Dawson WO (2000b) Replication of heterologous combinations of helper and defective RNA of *Citrus tristeza virus*. *Virology* **267**: 360-369.

McClellan APD, Van der Plank JE (1955) The role of seedling yellows and stem pitting in tristeza of citrus. *Phytopathology* **45**: 22-24.

McClellan APD (1957) Tristeza virus of citrus: evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis Repr* **41**: 821.

McClellan, APD (1963) The tristeza complex: Its variability in field-grown citrus in South Africa. *S Afr J Agric Sci* **6**: 303-332.

McClellan APD (1974) Abnormal bud union between some sweet oranges and rough lemon rootstock: Evidence of cause by a transmissible pathogen. En: *Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). University of California press, Div Agric Sci pp. 203-210

McClellan APD (1975) Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* **7**: 109-113.

Mestre PF, Asíns MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L (1997a). Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor Appl Genetics* **94**:691-695.

Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Navarro L (1997b) Efficient search for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily *Aurantioideae*. *Theor Appl Genetics* **95**: 1282-1288.

Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Navarro L (1997c) New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L) Raf. to citrus tristeza virus. *Theor Appl Genetics* **95**: 691-695.

Moreno P, Navarro L, Fuertes C, Pina JA, Ballester JF, Hermoso de Mendoza A, Juarez J, Cambra M (1983) La tristeza de los agrios. Problemática en España. En: *Hoja Técnica* (INIA Ed)., Madrid, pp 28.

Moreno P, Guerri J, Muñoz N (1990) Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology* **80**: 477-482.

Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Martínez ME (1991) Segregation of citrus tristeza virus strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. En: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 20-24.

Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Albiach R, Martínez ME (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 JF, Fuertes-Polo C, Albiach-Martí R, Martínez ME (1993b) Variations in pathogenicity and double-stranded RNA (dsRNA) patterns of citrus tristeza virus isolates induced by host passage. En: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 8-15.

Moreno P, Guerri J (1997) Variability of citrus tristeza closterovirus (CTV): methods for differentiating isolates. En: *Filamentous viruses of woody plants* (Monette P, Ed). Trivandrum, India: Research Signpost, pp. 97-107.

Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L (2008) Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol* **9**: 251-268.

Müller GW, Costa AS (1968) Further evidence on protective interference in citrus tristeza. En: *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Childs JFL, Ed). Gainesville, FL, USA: University of Florida Press, pp. 71-82.

Müller GW, Costa AS, Kitajima EW, and Camargo IJB (1974) Additional evidence that tristeza multiplies in *Passiflora* ssp. En: *Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). University of California press, Div Agric Sci pp 75-78.

Müller GW, Costa AS (1987) Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* **19**: 197-198.

Mumford R, Walsh K, Barker I, Boonham N (2000) Detection of *potato mop top virus* and *tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **90**: 448-453.

Nagy PD, Simon AE (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**: 1-9.

Narváez G, Skander BS, Ayllón MA, 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. En: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 383-391.

Navarro L, Pina JA, Juárez J, Ballester-Olmos JF, Duran-Vila N, Guerri J, Moreno P, Cambra M, Zaragoza S and Medina A (2002) The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2001. En: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Durán-Vila N, Milne RG, da Graça JV, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 306-316.

Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Gowda S, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO (1997) Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology* **228**: 92-97.

Niblett CL, Genc H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Bonacalza B, Manjunath KL, Febres VJ, Pappu HR, Lee RF (2000) Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Res* **71**: 97-106.

Nicolas L, Milon G, Prina E (2002) Rapid differentiation of Old World Leishmania species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods* **51**: 295-299.

Nikolaeva OV, Karasev AV, Garnsey SM, Lee RF (1998) Serological differentiation of Citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis* **82**: 1276-1280.

Norman PA, Sutton RA, Burditt AK (1968) Factors affecting transmission of tristeza by melon aphids. *J Econ Entomol* **61**: 238-242.

Nolasco G, de Blas 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**: 201-218.

Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT, Terrada E (1999) New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Res* **27**: 1564-1565.

Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP (2004) SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of *West Nile virus* circumvents false-negative results due to strain variability. *J Clin Microbiol* **42**: 1511-1518.

Pappu HR, Manjunath KL, Lee RF, Niblett CL (1993) Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3641-3644.

Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff MRG, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Gumpf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson WO, Lee RF, Niblett CL (1994) Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* **199**: 35-46.

Pattnaik AK, Ball LA, LeGrone AW, Wertz GW (1992) Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* **69**: 1011-1020.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.

Peña L, Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L (1995a) Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **14**: 616-619.

Peña L, Cervera M, Juárez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L (1995b) High efficiency Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci* **104**: 183-191.

Peña L, Seguí A (2001) Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotech* **19**: 500-506.

Peremyslov VV, Pan YW, Dolja VV (2004) Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **78**: 3704-3709.

Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ, Lee RF (1990) A monoclonal antibody which discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **80**: 224-228.

Petersen M, Wengel J (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* **21**: 74-81.

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**: 14-20.

Polo S, Ketner G, Levis R, Falgout B (1997) Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol* **71**: 5366-5374.

Powell CA, Pelosi RR, Cohen M (1992) Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Dis* **72**:141-144.

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

Racchah B, Singer S (1987) Incidence and vector potencial of aphids which transmit citrus tristeza virus in Israel. *Phytophylactica* **19**: 1173-1178.

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.

Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-1560.

Ratcliff F, MacFarlane S, Baulcombe DC (1999) Gene silencing without DNA. RNA mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**: 1207-1216.

Read SJ, Mitchell JJ, Fink CG (2001) LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *J Clin Microbiol* **39**: 3056-3059.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ (1989) Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* **1**: 285-296.

Ririe KM, Rasmussen RP, Witter CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**: 154-160.

Roberts CA, Dietzgen RG, Heelan LA, Maclean DJ (2000) Real-time RT-PCR fluorescent detection of *Tomato spotted wilt virus*. *J Virol Methods* **88**: 1-8.

Rochon DM (1991) Rapid de novo generation of defective interfering RNA by cucumber non-structural protein. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 11153-11157.

Roistacher CN, Bar-Joseph M, Gumpf DJ (1984) Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by small populations of *Aphis Gossypii*. *Plant Dis* **68**: 494-496.

Roistacher CN, Bar-Joseph M (1987) Transmission of citrus Tristeza Virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and *Passiflora* species. *Phytophylactica* **19**:179-182.

Roistacher CN, Dodds JA, Bash JA (1988) Cross protection against citrus tristeza seedling yellows and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 91-100.

Roistacher CN, Moreno P (1991) The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 7-19.

Roistacher CN, Dodds JA (1993) Failure of 100 mild Citrus tristeza virus isolates from California to cross protect against a challenge by severe sweet orange stem pitting isolates. En: *Proceedings of the 12th Conference of the International*

*Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graça J, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 100-107.

Romero J, Huang Q, Pogany J, Bujarski JJ (1993) Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections. *Virology* **194**: 576-584.

Rosner A, Bar-Joseph M (1984) Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* **139**: 189-193.

Rosner A, Lee RF, Bar-Joseph M (1986) Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* **76**: 820-824.

Roy A, Ramachandran P, Brlansky RH (2003) Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch Virol* **148**: 707-722.

Rubio L, Ayllón MA, Guerri J, Pappu H, Niblett C, Moreno P (1996) Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann Appl Biol* **129**: 479-489.

Rubio L, Guerri J, Moreno P (2000) Characterization of Citrus Tristeza Virus Isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of DNA Complementary to Their RNA Population. En: *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 12-17.

Rubio L, Ayllón MA, Kong P, Fernández A, Polek ML, Guerri J, Moreno P, Falk BW (2001) Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* **75**: 8054-8062.

Ruggli N, Tratschin JD, Mittelholzer C, Hofmann MA (1996) Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* **70**: 3478-3487.

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**: 387-398.

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.

Rutledge RG, Coté C (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* **31**: e93.

Sambade A, Martín S, Olmos A, García ML, Cambra M, Grau O, Guerri J, Moreno P (2000) A fast one-step reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification procedure providing highly specific complementary DNA from plant virus RNA. *J Virol Methods* **87**: 25-28.

Sambade A, Rubio L, Garnsey SM, Costa N, Müller GW, Peyrou M, Guerri J, Moreno P (2002) Comparison of the RNA population of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*. Application to monitoring cross protection. *Plant Pathol* **51**: 257-265.

Sambade A, López C, Rubio L, Flores R, Guerri J, Moreno P (2003) Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* **148**: 2325-2340.

Sambade A, Ambrós S, Lopez C, Ruiz-Ruiz S, de Mendoza AH, Flores R, Guerri J, Moreno P (2007) Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch Virol* **152**: 1115-1126.

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

Sasaki A (1981) The effect of stem pitting on yield of Washintong navel orange. En: *Proceedings of the International Society of Citriculture* **1**: 439-441.

Satyanarayana T, Gowda S, Boyko VP, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Navas-Castillo J, Karasev AV, Dolja V, Hilf ME, Lewandowski DJ, Moreno P, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Dawson WO (1999) An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7433-7438.

Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Martí MR, Ayllón MA, Robertson C, Garnsey SM, Dawson WO (2000) Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* **278**: 253-265.

Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Mawassi M, Albiach-Martí MR, Ayllón MA, Gowda S, Hilf ME, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO (2001) Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* **280**: 87-96.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Dawson WO (2002a) Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* **300**: 140-152.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Rabindram R, Dawson WO (2002b) The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol* **76**: 473-483.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllón MA, Dawson WO (2003) Frameshift mutations in infectious cDNA clones of *Citrus tristeza virus*: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology* **313**: 481-491.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllón MA, Dawson WO (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 799-804.

Scholthof K-BG, Scholthof HB, Jackson AO (1995) The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of tomato bushy stunt virus proteins and implications for disease attenuation. *Virology* **211**: 324-328.

Sentandreu V, Castro JA, Ayllón MA, Rubio L, Guerri J, González-Candelas F, Moreno P, Moya A (2006) Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* (CTV) after host passage. *Arch Virol* **151**: 875-894.

Sieburth PJ, Nolan KG, Hilf ME, Lee RF, Moreno P, Garnsey SM (2005) Discrimination of Stem-Pitting from Other Isolates of *Citrus tristeza virus*. En: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Peña MA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 1-10.

Suastika G, Natsuaki T, Terui H, Kano T, Ieki H, Okuda S (2001) Nucleotide sequence of citrus tristeza virus seedling yellows isolate. *J Gen Plant Pathol* **67**: 73-77.

Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW (1992) Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol* **66**: 5425-5431.

Tan BH, Lim EA, Liaw JC, Seah SG, Yap EP (2004) Diagnostic value of real-time capillary thermal cycler in virus detection. *Expert Rev Mol Diagn* **4**: 219-230.

Targon MLPN, Machado MA, Müller GW, Coletta Filho HD, Manjunath KL, Lee RF (2000) Sequence of coat protein gene of the severe citrus tristeza virus complex Capao Bonito. En: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 121-126.

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

Thornton IR, Stubbs LL (1976) Control of tristeza decline of grapefruit on sour orange rootstock by preinduced immunity. En: *Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Calavan EC, Ed). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 55-57.

Van Vuuren SP, Collins RP, da Graça JV (1993) Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Dis* **77**: 24-28.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* **220**: 245-250.

Varga A, James D (2005) Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *J Virol Methods* **123**: 213-220.

Vela C, Cambra M, Cortés E, Moreno P, Miguet JG, Pérez de San Román C, Sanz A (1986) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *J Gen Virol* **67**: 91-96.

Vives MC, Rubio L, López C, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Dawson WO, 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**: 811-816.

Vives MC, Rubio L, Sambade A, Mirkov TE, Moreno P, Guerri J (2005) Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* **331**: 232-237.

Vives MC, Martín S, Ambrós S, Renovell A, Navarro L, Pina JA, Moreno P, Guerri J (2008) Development of a full-genome cDNA clone of Citrus leaf blotch virus and infection of citrus plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 787-797.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**: 949-956.

Wallace JM, Drake RJ (1976) Progress report of studies in California on preimmunization against tristeza in budded citrus trees. En: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Calavan EC, Ed). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 127-136.

Wallace JM (1978) Virus and viruslike diseases. In: Reuther W, Calavan EC, Carman GE, eds. *The Citrus Industry*. Berkeley, CA, USA: Univ Calif, Div Agr Sci pp. 67-184.

Weathers LG, Harjung MK (1964) Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*. *Plant Dis. Repr* **48**: 102-103.

Whelan JA, Rusell NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* **278**: 261-269.

White KA, Bancroft JB, Mackie GA (1991) Defective RNAs of clover yellow mosaic virus encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology* **183**: 479-486.

Yang G, Mawassi M, Gofman R, Gafny R, Bar-Joseph M (1997) Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *Citrus tristeza virus* molecules. *J Virol* **71**: 9800-9802.

Yang SJ, Revers F, Souche S, Lot H, Le Gall O, Candresse T, Dunez J (1998) Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Arch Virol* **143**: 2443-2451.

Yang ZN, Mathews DM, Dodds JA, Mirkov TE (1999) Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* **19**: 131-142.

Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML, Mirkov TE (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**: 382-393.

Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML, Mirkov, TE (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**: 482-492.

Yokomi RK, Garnsey SM (1987) Transmission of citrus tristeza virus by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* **19**: 169-172.

Yokomi RK, Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ (1989) Transmission of exotic citrus tristeza virus isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Dis* **73**: 552-556.

Yokomi RK, Lastra R, Stoetzel MB, Damsteegt VD, Lee RF, Garnsey SM, Gottwald TR, Rocha-Peña MA, Niblett CL (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**: 1078-1085.

Yoshida T (1996) Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantoidea* and their susceptibility to citrus tristeza virus. *Plant Dis* **80**: 414-417.

Yount B, Curtis KM, Baric RS (2000) Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* **74**: 10600-10611.

Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS (2002) Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* **76**: 11065-11078.

