



Universidad
Zaragoza



cita
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN

Trabajo Fin de Grado

IDENTIFICACIÓN DEL SEGMENTO GENÓMICO
RESPONSABLE DE LA MODULACIÓN DE
SÍNTOMAS DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA
ALFALFA (AMV) EN ALGUNAS LEGUMINOSAS
(*VIGNA UNGUICULATA*)

Autor

LUIS MANUEL VILLAR MARTÍN

Director

Dr. Fernando Escriu Paradell

Ponente

Dra. Maria Luisa Peleato Sánchez

Grado en Biotecnología
Universidad de Zaragoza
Septiembre 2014

Departamento de Sanidad Vegetal. Laboratorio de Virología vegetal.

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

1. ÍNDICE	
2. Resumen/Abstract	5
3. Abreviaturas	6
4. Introducción	7-10
4.1 <u>Estructura del genoma y expresión viral</u>	7-8
4.2 <u>Enfermedades en cultivos hortícolas y sintomatología</u>	8
4.3 <u>Caracterización de cepas del virus y huéspedes de diagnóstico</u> ...9-10	
4.4 <u>Mantenimiento y multiplicación del virus</u>	10
5. Objetivos y planteamiento del trabajo	11
6. Materiales y métodos	12-20
6.1 <u>Material vegetal y aislados virales</u>	12
6.1.1 Inoculación.....	12
6.2 <u>Extracción de RNA de doble cadena y RNA total</u>	12-13
6.2.1 RNA de doble cadena.....	12-13
6.2.2 RNA total.....	13
6.3 <u>Amplificación de un fragmento de 2115 nt coterminar con el extremo 3' del RNA 3 genómico de AMV</u>	13-15
6.3.1 Retrotranscripción.....	13-14
6.3.2 PCR.....	14-15
6.4 <u>Amplificación y secuenciación de los extremos 3' y 5' del RNA 3 mediante la técnica RACE</u>	15-17
6.4.1 RACE 3'.....	15
6.4.2 RACE 5'.....	16
6.4.3 Secuenciación.....	17
6.5 <u>Diseño y formación de un adaptador en 5'</u>	17-18
6.6 <u>Obtención del fragmento viral completo e inserción en el vector pUC19</u>	19
6.7 <u>Clonaje del fragmento viral completo en bacterias</u>	20

7. Resultados	21-25
7.1 <u>Caracterización biológica de aislados de AMV</u>	21-22
7.2 <u>Construcción de un clon de cDNA de longitud total del RNA 3 de AMV</u>	23-24
7.3 <u>Transformación bacteriana</u>	25
8. Discusión	26-27
9. Conclusiones/Conclusions	28
10. Bibliografía	29-30
ANEXO I	31-33

2. RESUMEN

El virus del mosaico de la alfalfa (AMV), de amplia distribución mundial, afecta a un gran número de huéspedes vegetales como la alfalfa, su principal huésped natural, y a otras especies hortícolas, entre ellas varias leguminosas como *Vigna unguiculata*, judía y haba. El genoma de AMV está constituido por tres segmentos de RNA monohebra y sentido mensajero que se encapsidan de forma independiente. En trabajos previos se han observado aislados virales con distinto comportamiento en cuanto a la inducción de mosaico en *Vigna unguiculata*. En este trabajo se ha iniciado un método para identificar el segmento genómico responsable de este comportamiento diferencial, mediante la generación de pseudorrecombinantes artificiales que intercambian segmentos genómicos procedentes de aislados con comportamiento distinto. Se ha generado un fragmento de cDNA del RNA3, que una vez clonado, permitiría la obtención *in vitro* de un RNA transcrito infectivo. El empleo de un método análogo para los RNAs 1 y 2 posibilitaría la obtención de dichos pseudorrecombinantes artificiales.

2. ABSTRACT

Alfalfa mosaic virus (AMV) is distributed worldwide and infects a wide host range of plants, including alfalfa, it's main natural host, and other vegetable species, such as the legumes, *Vigna unguiculata*, bean and faba bean. AMV genome is composed of three single-stranded messenger-sense RNA segments, which are independently encapsidated in different particles. In previous works, AMV isolates have been found inducing different symptoms (i.e. presence or absence of systemic mosaic) in *Vigna unguiculata*. In this work, we have started the optimization of a method to identify the genomic segment that causes this differential behaviour, through the generation of experimental pseudorrecombinants that exchange the three genomic segments from different types of isolates. A cDNA fragment of AMV-RNA3 has been generated, which after cloning, could serve as a template for the synthesis of an infective transcribed RNA. The same method could be used for the synthesis of RNAs 1 and 2, and the final generation of experimental RNAs 1, 2 and 3 pseudorrecombinants.

3. ABREVIATURAS

AMV: *Alfalfa mosaic virus*

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CP: proteína de la cápsida

dNTPs: trifosfato de N (N= A adenosina, T timina, C citosina, G guanina)

DEPC: Dietilpirocarbonato

DIECA: Dietilditiocarbamato de sodio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

IPTG: isopropilo-D-1thiogalactopiranosido

MMLV-RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

MP: proteína de movimiento

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RACE: *rapid amplification of cDNA ends*

RNA: ácido ribonucleico

Rpm: revoluciones por minuto

RT: retrotranscripción

SDS: dodecil sulfato sódico

SSC: citrato sodio-salino

STE: sodio cloro tris EDTA

TAQ: *Termophilus aquaticus*

TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

U: unidades

v/v: volumen/volumen

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

4. INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) es un virus de vegetales perteneciente al género *Alfavirus* de la familia *Bromoviridae* con una distribución mundial.

4.1 ESTRUCTURA DEL GENOMA Y EXPRESIÓN VIRAL

Tiene el genoma dividido en tres moléculas de ácido ribonucleico (RNA 1, RNA 2 y RNA 3) (Fig. 1) de sentido mensajero, en orden según masa molecular, las cuales se empaquetan por separado en partículas con forma de bacilo (Bancroft & Kaesberg (1958,1960). También tiene un mensajero subgenómico (RNA 4), empaquetado en una partícula de forma esférica (Gibbs et al. 1963).

El RNA 1, de 3644 nt, codifica la proteína P1 (replicasa) de 126kDa que contiene dominios N-terminal y C-terminal similares a metiltransferasas y helicasas. El RNA 2, de 2593 nt codifica la proteína P2 (replicasa) de 90 KDa con el dominio polimerasa. El RNA 3, de 2142nt, es dicistrónico y codifica la proteína de movimiento (MP) de 32 KDa, esencial para el movimiento de célula a célula durante la infección de la planta, y la proteína de la cápsida (CP) de 24 KDa, proteína estructural que conforma la cubierta proteica, implicada en el movimiento célula a célula (Sánchez-Navarro y Bol. 2001). Además, esta última contiene también un dominio de unión al RNA en el extremo N-terminal necesario para diferentes procesos como la activación genómica, replicación y traducción (Bol, 2005). Las proteínas P1, P2 y MP se expresan directamente del RNA genómico, mientras que la proteína CP se expresa a partir del mensajero subgenómico RNA 4, análogo a los 881 nucleótidos del extremo 3' del RNA 3. (Gould y Symons, 1978). Las tres moléculas de RNA genómicas poseen en el extremo 5' la estructura CAP (7MGppp) pero no tienen secuencia poly A (Pinck, 1975), y los 112 nucleótidos del extremo 3' presentan >80% de similitud de secuencia y pueden adoptar estructuras similares (Olsthooorn et al, (1999): una estructura secundaria de unión a la CP (CPB) y otra estructura similar al de un ARN de transferencia (TLS) (Fig. 1). Ambas se requieren en la traducción y replicación del virus (Bol, 2003).

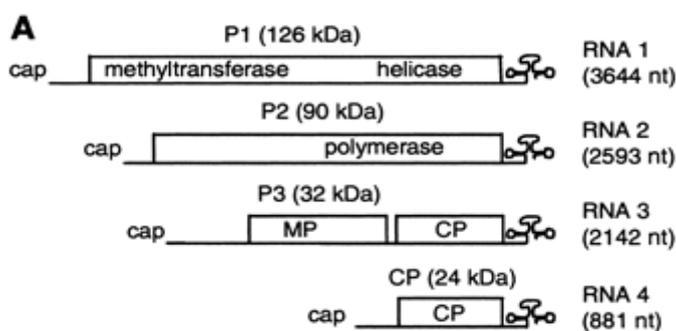


Figura 1. Estructura genómica de AMV. Se representan los dominios de unión metiltransferasa y helicasa (RNA1), polimerasa (RNA2) y MP (RNA3) y CP (RNA 3 y RNA4). 3' puede adoptar diferente estructura secundaria.

Tomado de **Vlot C. et al, 2001.** Role of the 3'-untranslated regions of *Alfalfa Mosaic Virus* RNAs in the formation of a transiently expressed replicase in plants and in the assembly of virions. *Journal of virology.*

Para iniciar el proceso de infección son necesarios los RNA 1, 2 y 3 y además el ARN4 o la CP, ya que cualquiera de los dos últimos puede servir para iniciar el proceso de la activación genómica (Bol, 2008).

4.2 ENFERMEDADES EN CULTIVOS HORTÍCOLAS Y SINTOMATOLOGÍA

La infección se produce de forma natural y a menudo sin síntomas en muchas plantas herbáceas y leñosas (150 especies en 22 familias, Schmelzer, Schmidt y Beczner, 1973) y se transmite experimentalmente a más de 430 especies de 51 familias de dicotiledóneas (Hull, 1969; Crill, Hagedorn y Hanson, 1970; Schmelzer, Schmidt y Beczner, 1973). Entre estas especies destaca la alfalfa (alfalfa; *Medicago sativa*), su huésped principal, donde AMV provoca diversos mosaicos, moteados y malformaciones (Fig. 2), pero a menudo es asintomática, especialmente en épocas calurosas y es más frecuente en cultivos de varios años. Afecta a otros huéspedes como la patata (*Solanum tuberosum*) en la cual causa necrosis, causa mosaico en el trébol rojo y blanco, mosaico amarillo en judía (*Phaseolus vulgaris*), carilla (*Vigna unguiculata*), judía mungo (*V. radiata*) y el pimiento (*Capsicum annuum*), causa necrosis y retraso del crecimiento en guisante (*Pisum sativum*), necrosis severa en tomate (*Solanum lycopersicum*) y marchitamiento en garbanzo (*Cicer arietinum*). Tiene una transmisión entre huéspedes muy eficaz pues en condiciones naturales se realiza mediante algunas especies de pulgones (más de 25 especies de forma no persistente (Edwardson y Christie, 1991) y a través de la semilla de plantas infectadas individualmente. En condiciones experimentales también se transmite de forma eficiente de forma mecánica (Jaspar y bos, 1980). Los síntomas dependen en gran medida de la cepa del virus, de la etapa de crecimiento del huésped y de las condiciones ambientales. La recuperación se produce de forma eficaz muy a menudo.



Figura 2. Síntomas de AMV en alfalfa

Photo courtesy of G.C. Bergstrom,
Dept. of Plant Pathology, Cornell
University, Ithaca, NY

4.3 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS Y HUÉSPEDES DE DIAGNÓSTICO

Se han descrito numerosas cepas o variantes de AMV de plantas según diferencias en propiedades tales como las formas de agregación de partículas en el citoplasma del tabaco, transmisión por polen y semillas, propiedades físico-químicas, secuencia de nucleótidos y propiedades biológicas como la reacción diferencial en huéspedes indicadores. La mayor parte de la biología molecular se ha llevado a cabo con la cepa AMV 425 procedente de aislados de trébol (Hagedorn y Hanson, 1963).

Las especies de leguminosas *Phaseolus vulgaris* (judía) y *Vigna unguiculata* (carilla) son buenos huéspedes de ensayo para la caracterización de AMV ya que su reacción diferencial a la infección por distintas cepas permite la distinción de las mismas (Hagimorad & Francki, 1988). En judía, algunas cepas dan lesiones necróticas de coalescencia y otras lesiones locales cloróticas o ningún síntoma local, pero en este último caso aparece moteado leve sistémico, necrosis de los vasos y distorsión de la hoja.

En *vigna unguiculata* (carilla) las cepas más comunes producen lesiones locales necróticas sin aparición de síntomas sistémicos (Fig. 3) y otras provocan lesiones locales cloróticas, poco definidas, o no provocan lesiones pero producen diversos síntomas sistémicos (Fig.4).



Fig. 3 Lesiones necróticas locales en *V. unguiculata*. Foto tomada en el CITA, febrero 2014



Fig. 4 Mosaico sistémico en *V. unguiculata*. Foto tomada en el CITA, febrero 2014

Otras especies de diagnóstico menos utilizadas son *Vicia faba* (haba) donde la mayoría de las cepas dan lesiones locales necróticas, a veces seguido por un moteado leve, necrosis y muerte de la planta, *Pisum sativum* (guisante), en el que se producen lesiones y/o marchitamiento de las hojas inoculadas con necrosis del tallo y muerte de las plantas, *Chenopodium amanticolor* y *chenopodium chinoa* en las cuales se producen lesiones locales cloróticas o necróticas y en las cuales el moteado clorótico y necrótico sistémico distingue

el virus del mosaico de la alfalfa del virus del mosaico del pepino. (Jaspars & Bos, 1980).

4.4 MANTENIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS

Las plantas *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana clevelandii* se utilizan para mantener los cultivos virales (Fig 5). Las plantas de *Nicotiana tabacum*, son especialmente sensibles al virus (por ejemplo, 'Samsun NN') (Jaspars y Bos, 1980), de manera que también es una buena fuente para la purificación de AMV (Hagimorad & Francki, 1988).



Fig 5. *Nicotiana clevelandii*, especie de propagación y multiplicación. CITA, febrero 2014

5. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo final del trabajo consistiría en la identificación del segmento genómico (RNA 1, RNA2 o RNA3) responsable de la modulación de síntomas del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) en *Vigna unguiculata*. Para alcanzar el objetivo, sería necesario sintetizar clones artificiales mediante la retrotranscripción del RNA viral, inserción del cDNA en plásmidos bacterianos y obtención in vitro de RNAs transcritos infectivos de cepas con comportamiento diferencial en éste huésped. La posterior caracterización biológica en dicho huésped mediante inoculación mecánica experimental de individuos pseudorrecombinantes generados por distintas combinaciones de transcritos infectivos de los RNA 1, 2 y 3 procedentes de ambos tipos de cepa, permitiría la identificación del segmento genómico responsable de la modulación de síntomas.

En este trabajo se han recolectado y caracterizado aislados de AMV según la sintomatología inducida en alfalfa y en *Vigna unguiculata* y se ha pretendido realizar el clon infectivo del RNA 3 de cepas de AMV que inducen reacción diferencial en *V. unguiculata*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL VEGETAL Y AISLADOS VIRALES

Se recolectaron diez aislados de AMV procedentes de plantas de alfalfa recolectadas en campo (Ontinar del Salz, Zaragoza), cinco de ellas con síntomas de mosaico y otras cinco sin síntomas. Hojas infectadas de estas plantas se inocularon en plantas de *V. unguiculata* y haba (*Vicia faba*). Las lesiones aparecidas (colonias de una variante viral) fueron cortadas e inoculadas individualmente en *N. clevelandii*, para realizar un clonaje biológico.

6.1.2 Inoculación

Tanto el material de campo como el material de lesiones necróticas se molió y mezcló en morteros con un tampón cuyos componentes eran 30mM fosfato ácido disódico, Na_2HPO_4 , que facilita el mantenimiento de la infectividad del virus, 0.2 % DIECA, que impide la desnaturalización del virus por agentes oxidantes al crear un medio reductor, y carbón activo, que adsorbe sustancias inhibitoras de la infección. El inóculo resultante se aplicó sobre hojas jóvenes recién expandidas a las cuales se espolvoreó con carborundo, un abrasivo que facilita la infección, pues produce lesiones en la cutícula de las hojas de las plantas a inocular.

6.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE DOBLE CADENA Y RNA TOTAL

6.2.1 RNA de doble cadena

Se tomaron 750mg de material vegetal (hojas de *N. clevelandii*) y se molieron en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo se mezcló con 1ml de tampón STE 2X, 70 μl de SDS 20%, 20 μl de bentonita y 1,425 ml de fenol TE. Se agitó 30' a 70-85rpm en un agitador horizontal, se centrifugó a 3000g 15'. La fase acuosa se transfirió a un eppendorf y se centrifugó de nuevo 20' a 10000g y 20 °C. El volumen del sobrenadante se midió y se añadió etanol absoluto para dejar la disolución a una concentración de 15% de etanol. La mezcla se añadió a un eppendorf el cual contenía 40mg de celulosa CF11. Se agitó en un agitador horizontal 30' 70-85 rpm y se centrifugó 1' a 5000g 20°C. Se descartó el sobrenadante y se añadió al tubo 1ml de tampón STE1X/etanol 15%. Se agitó horizontalmente 5', se centrifugó 1' a 5000g 20°C y se repitieron estos dos pasos dos veces. La elución, se hizo con tampón STE1X en un volumen de 200 μl (agitación horizontal y centrifugación en las mismas condiciones que antes) y se repitió una segunda vez. Al eluido, se le añadió acetato de sodio 3M pH=5,2 1/9 v/v y 0,8 volúmenes de isopropanol. Se dejó precipitar o/n a -20°C. El día siguiente, se centrifugó 20' a 20000g 4°C, se descartó el sobrenadante, se añadió 1ml de etanol al 70% frío (-20°C), se centrifugó en las

mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar al aire libre en el tubo. Se resuspendió en 170 µl de agua DEPC.

El producto extraído se sometió a un tratamiento enzimático con DNAsas, RNAsas y proteinasa K, en este orden. A los 170 µl de RNA se le añadió 20 µl de 1 M acetato de magnesio (tampón enzimático), 10 U de DNAsa RQ1 (Promega), y se incubó 1h a 37°C en un termobloque. Pasado el tiempo, se paró la reacción con una solución STOP comercial. Posteriormente se trató la muestra con RNasa A (Promega) en condiciones salinas (2X SSC): se añadieron 60 µl de 10X SSC y 1 µl de enzima y se llevó a un volumen final de 300 µl con agua DEPC. Se incubó la muestra 30' a 37°C. Por último, se trató la muestra con proteinasa K (sigma): se añadieron 2,5 µl de SDS 2%, 8 µl de proteinasa K 5mg/ml, se añadió agua DEPC hasta 400 µl y se incubó 1h a 37°C.

Para eliminar las enzimas utilizadas, se hizo una extracción fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1, se centrifugó 5' a 10000rpm y 20°C, se recuperó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de cloroformo: isoamílico 24:1, se centrifugó 5' a 10000 rpm y 20°C, se recuperó el sobrenadante y se hizo una precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de 3M acetato de sodio pH 5'2. Se dejó precipitar 30' a 80°C, se centrifugó 30' a 20000rpm 20°C se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 70% etanol absoluto, centrifugando a 30' 20000rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua DEPC.

6.2.2 RNA total

Se partió de 200 mg de material vegetal que se molieron en mortero con N₂ líquido, y el polvo se pasó a un nuevo eppendorf. Se añadieron 400 µl tampón de extracción (1 M Tris-HCl pH=8, 0.5 M EDTA, 10% SDS), se mezcló bien en un vórtex, se añadieron 400 µl de fenol y 200 µl de cloroformo, se mezclaron bien y se centrifugó 10' a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante (aprox. 400 µl) en un nuevo tubo y se añadió 133 µl de LiCl 8M para la precipitación del RNA. Se dejó precipitando o/n. Al día siguiente, se centrifugó 10' a 10.000 rpm 4° C, se tiró el sobrenadante, se añadieron 500 µl de etanol 70%, se centrifugó 10' a 10.000 rpm 4° C, se tiró el sobrenadante y dejó secar el pellet. Por último, se resuspendió en 100 µl de H₂O mQ.

6.3 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 2115 nt COTERMINAL CON EL EXTREMO 3' DEL RNA3 GENÓMICO DE AMV

6.3.1 Retrotranscripción

Se llevó a cabo una retrotranscripción del RNA viral a cDNA partiendo del RNA total extraído previamente. El cebador utilizado fue el AMV-R3e3PstI-(R)

(Tabla1), a una concentración final de 10 pM. 1 µl del cebador se incubó con 9 µl de RNA total extraído 5' a 75 °C en el termobloque y posteriormente los 10 µl se pasaron inmediatamente a hielo 5'. Tras ello, se añadieron 10 µl de la siguiente mezcla de reacción: 1X tampón MMLV RT (Promega, 50mM Tris-HCl, pH 8'3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT), 1mM dNTPs mix, 25U inhibidor ribonucleasa (Invitrogen), 200U MMLV retrotranscriptasa (Promega) y agua miliQ hasta un volumen final de 20 µl, los cuales se incubaron 1h a 42 °C en el termobloque.

6.3.2 PCR

El cDNA obtenido se amplificó mediante PCR. El cebador reverso utilizado fue, AMV-R3e3PstI-(R), y el cebador directo fue AMV-me5F2-EcoRI(F) (Tabla1). El volumen final de PCR fue de 50 µl con los siguientes componentes: 1X tampón TAQ polimerasa (Invitrogen, 400 mM Tris-HCl, pH 8'4, 500mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador, 2,5U TAQ polimerasa (Invitrogen), 5 µl de cDNA y se completó el volumen con agua miliQ. La mezcla de reacción se sometió a los siguientes ciclos: desnaturalización a 94°C durante 5', 5 ciclos consistentes en desnaturalización a 94°C durante 45'', anillamiento a 42°C durante 30'' y elongación 72°C 3', 30 ciclos consistentes en desnaturalización a 94°C durante 45'', anillamiento a 52°C durante 30'' y elongación a 72°C durante 3', y por último elongación final a 72°C 10' y conservación a 4°C.

El cDNA amplificado se analizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para recuperar el producto de PCR. Una vez corridas las bandas, se tiñó con bromuro de etidio, se visualizó en un transiluminador de luz UV y se recortaron las bandas de 2115 nt del gel con ayuda de un bisturí. Posteriormente se purificaron con el kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery*, basado en una columna de unión a DNA, centrifugaciones y lavados con distintos buffers. El DNA fue eluído en 10µl de agua miliQ.

Tabla 1. Cebadores utilizados a lo largo del proyecto.

Nombre	Posición	Bases inicio-fin	Secuencia (5'->3')
AMV-R3e3.PstI (R)	RNA 3	2142-2128	GTC CTGCAG CATCCCTTAGGGGC PstI complementario ext 3'AMV
AMV-me5f2-EcoRI(F)	RNA3	28-48	GGAATTC AACTCAATTAACGCCTT EcoRI complementario AMV en 5'
AMV CP1 (F)	RNA 3	1462-1486	GCGTTGAAAGTCCCGG
AMV CP3 (F)	RNA 3	1921-1938	CGATTCAACGAAGTTTGG

MP (R)	RNA 3	959-977	GCATTTAAGAGATCGCGG
5' RACE <i>Abridged Anchor Primer</i>	-	-	GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIGGGIIG GGIIG
AMV MP2 (R)	RNA 3	777-794	TGGTCGGTGTCAACATCC
AMV MP1 (R)	RNA 3	544-566	GTGCAGAGCTTTAGCTGA
CCPolyT17	-	-	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTV

6.4 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' DEL RNA3 MEDIANTE LA TÉCNICA RACE:

6.4.1. RACE 3':

En primer lugar se sometió al RNA total a una poliadenilación. Los componentes de la disolución de poliadenilación, recomendadas por la casa comercial, fueron: 1X tampón EPAP (*Ambion life technologies*), 2,5 mM MnCl₂, 1mM ATP (Invitrogen), 4U enzima polyA polimerasa EPAP (*Ambion life technologies*), 10 µl de RNA total y se completó con agua miliQ hasta un volumen total de 50 µl. La mezcla de reacción se incubó en el termobloque 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, para recuperar el RNA poliadenilado, se hizo una extracción fenólica (fenol:cloroformo 1:1). Tras añadir el fenol:cloroformo, se centrifugó a 10000rpm 10' a 20°C, se recuperó el sobrenadante y se añadió glucógeno (Invitrogen) a una concentración final de 0,2 µg/ µl, que se usa como carrier para facilitar la precipitación del RNA. Posteriormente se hizo una precipitación con etanol absoluto (2,5 volúmenes del total) y acetato de sodio a una concentración final de 0,3M. Se dejó o/n a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 10000rpm 10' a -4°C, se lavó el pellet con etanol al 70% por duplicado y se resuspendió el pellet en 9 µl de agua miliQ. Una vez recuperado el polyA-RNA, se llevó a cabo una retrotranscripción del mismo, en las mismas condiciones y los mismos pasos que en el punto 6.3.1, excepto el cebador, en este caso fue CCPolyT17V (Tabla1). El cDNA resultante se amplificó por PCR con los mismos componentes que en el punto 6.3.2 a excepción de los cebadores, en este caso CCPolyT17V y CP1 (F) (Tabla1). Los ciclos de reacción fueron: desnaturalización a 94°C durante 5', 33 ciclos consistentes en una desnaturalización 94°C durante 45'', anillamiento a 45°C durante 30'' y elongación a 72°C durante 1', elongación final a 72°C durante 10' y conservación a 4°C. Tras la PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% de 5 µl del producto de PCR resultante para visualizar el producto obtenido.

6.4.2. RACE 5'

Esta técnica se llevó a cabo mediante el kit *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen). En primer lugar, se retrotranscribieron 900 bases complementarias al inicio del RNA 3, usando el cebador MP (R) (Tabla1), a una concentración final de 100 nM. 1 µl del primer fue puesto en contacto con 10 µl de RNA total extraído y con agua DEPC durante 10' a 70 °C en el termobloque y posteriormente los tubos fueron introducidos en hielo 5'. Tras ello, se añadieron a cada tubo 8,5 µl de la siguiente mezcla de reacción: 1X tampón PCR (200mM Tris-HCl, pH 8'4, 500 mM KCl), 2,5mM MgCl₂, 10mM DTT y 0,4mM de cada dNTP. Los 24 µl resultantes se tuvieron 1' a 42°C en el termobloque y posteriormente se añadió 200U de la enzima SuperScript™ II RT. La mezcla se incubó 50' a 42 °C, 15' a 70°C para acabar la reacción, se centrifugó 10-20 segundos y se incubó a 37°C. Por último, se añadió 1 µl de RNase mix para deshacerse de las cadenas de RNA y se incubó durante 30' a 37°C. El cDNA resultante fue purificado mediante la columna de purificación del kit S.N.A.P. basada en la unión del cDNA a una matriz, fue lavado con diferentes tampones y con etanol, y resuspendido en 10 µl.

Una vez obtenido el cDNA purificado, se llevó a cabo una adición de citosinas en el extremo 3' del cDNA mediante la acción del enzima TdT. Los 10 µl de cDNA fueron puestos en contacto con 6,5 µl de agua DEPC, 5 µl de 5X tampón *tailing* (50mM Tris-HCl pH 8,4, 125mM KCl, 7,5mM MgCl₂) y 10 µl de dCTP 2mM durante 2-3' a 94°C en el termobloque y posteriormente 1' en hielo. Seguidamente, se añadió 1 µl de TdT y se incubó durante 10' a 37°C. Finalmente, se inactivó el enzima por choque térmico: 10' a 65°C.

El polyC-cDNA resultante se amplificó por PCR. El volumen final fue de 49,5 µl con los siguientes componentes: 1X tampón de PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8'4, 500mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM MgCl₂, 0,4 µM del cebador MP2(R) (Tabla1), 0,4 µM del cebador *5' RACE Abridged Anchor Primer* (Tabla1), 2,5U TAQ DNA polimerasa, 5 µl de poly-cDNA y se completó el volumen con agua miliQ. La mezcla de reacción se sometió a los siguientes ciclos: desnaturalización a 94°C durante 2', 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 94°C durante 30'', anillamiento a 45°C durante 30'' y elongación a 72°C durante 1', y por último elongación final a 72°C durante 7' y conservación a 4°C. Tras la PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% de 5 µl del producto de PCR resultante para visualizar el producto obtenido.

6.4.3 SECUENCIACIÓN

Las muestras positivas del RACE 3' y del 5' se mandaron a secuenciar por duplicado. En el caso del producto del extremo 3', se envió la muestra a una concentración de 20ng/μl junto con dos cebadores directos CP1(F) (Tabla1) y otro todavía más cerca del extremo, CP3(F) (Tabla1) a una concentración de 5 μM, mientras que en el caso del producto del RACE 5', se envió la muestra a una concentración de 20ng/μl junto con dos cebadores AMV MP2 (R) y AMV MP1 (R). La secuenciación con dos cebadores diferentes se hace con el objetivo de obtener una lectura doble de la secuencia. Una vez se recibieron las secuencias de las muestras, se visualizaron y unificaron con el programa informático *ChromasLite201* y se alinearon entre ellas y entre las secuencias del GenBank escogidas (AnexoI), usando el programa *ClustalX*, implementado en el paquete informático *MEGA4*.

6.5 DISEÑO Y FORMACIÓN DE UN ADAPTADOR EN 5'

Para completar los 27nt faltantes correspondientes al extremo 5' del RNA3 de AMV, se sintetizó un adaptador de DNA de doble cadena (dsDNA), AMVInk (Fig 6), que incluía estos 27 nt e inmediatamente aguas arriba el promotor T7 de transcripción. Además contenía también una diana del enzima de restricción XbaI para un ligamiento posterior. El adaptador fue ensamblado a partir de dos oligonucleótidos de cadena sencilla: AMVInk5p, junto con su complementario AMVInk5n (Fig.6), los cuales fueron fosforilados en el extremo 5'. Para ello se utilizó la enzima T4 polinucleótido kinasa (T4PNK) (*New England Biolabs*) usando las siguientes condiciones recomendadas por la casa comercial: 1,7 μg de oligonucleótido (AMVInk5n o AMVInk5p), 1X tampón de fosforilación (*New England Biolabs*, 70mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, pH 7,6), 10U de T4PNK (*New England Biolabs*) y agua miliQ hasta un volumen de 10 μl. La mezcla de reacción se incubó a 37°C 30' en el termobloque. Una vez fosforilados los extremos 5', se llevó a cabo una rampa de temperatura para que los oligonucleótidos solapasen y se formase el adaptador AMVInk5 por complementariedad de bases. Los 10 μl de cada oligonucleótido fosforilado se juntaron en un tubo eppendorf y se incubaron durante 2' a 100°C en el termobloque, dejándolos enfriar a temperatura ambiente posteriormente. El adaptador en forma de dsDNA deja en su extremo 3' una secuencia preparada para ligar con la secuencia de corte que deja el enzima EcoRI (Fig 6)

EXTREMO 5'

ALF 121 GTTTTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACA...

ALF123 GTTTTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACA...

ALF129 GTTTTAATACCATTTTCAAATATTCCAATTCAACTCAATTAACGCTTTTACA...

AMV-me5f2-EcoRI (F)

CGGAATTC AACTCAATTAACGCTT

Secuencia de corte de EcoRI

AMVlnk5p

CCTCTAGATAATACGACTCACTATAG GTTTTAATACCATTTTCAAATATTCC

Corte XbaI

Promotor T7 Polimerasa

AMVLNK5

AMVlnk5n

GGAGATCTATTATGCTGAGTGATATCCAAAATTATGGTAAAAGTTTATAAGGTTAA

Complementario a secuencia corte con EcoRI

EXTREMO 3'

ALF 121 TGTGCTAACGCACATATATAAATGCTCATGCAAACCTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ALF123 TGTGCTGATGCACATATATAAATGCTCATGCAAACCTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ALF129 TGTGCTCGCGCACATATATAAATGCTCATGCAAACCTGCATGAATGCCCTAAGGGATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Cola polyA

AMV-R3e3.PstI (R)

CGGGGATTCCCTACGACGTCCTG

Secuencia corte PstI

Fig. 6 Secuencias de los extremos de las muestras, junto con primers y el adaptador utilizado

6.6 OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO VIRAL COMPLETO E INSERCIÓN EN EL VECTOR PUC19

El producto de PCR de 2115nt coterminales con el extremo 3' del RNA viral, obtenido en 6.3, contiene una diana EcoRI en su extremo 5' incluida en el cebador en la reacción de RT-PCR (ver apdo. 6.3). El fragmento fue cortado con la enzima EcoRI-HF (*New England Biolabs*) en una reacción de digestión con los siguientes componentes: 250ng del producto de purificación de DNA del mencionado fragmento, 1X del tampón CutSmart (Acetato potásico 50mM, 20mM Tris-acetato, 10mM magnesio acetato, 1mM DTT pH 7,9), 20 U de EcoRI-HF y agua miliQ hasta un volumen final de 50 μ l. La mezcla se tuvo a 25°C durante 1h en el termobloque. A continuación, el producto de digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% y recuperado de gel con el kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*. Posteriormente fue ligado al adaptador AMVInk5 obtenido en 6.5 en una reacción de ligación con los siguientes componentes: 1X de tampón de ligación (*New England Biolabs*, 50mM TRIS-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM DTT pH 7,5), 170ng del adaptador AMVInk5, 250ng de cDNA del fragmento de 2115nt, 0,25U T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*) y agua miliQ hasta un volumen de 20 μ l. La mezcla se tuvo a 25°C durante 1 hora en el termobloque. El producto de ligación y el plásmido utilizado, pUC 19 fueron digeridos por separado con las enzimas XbaI (*New England Biolabs*) y PstI-HF (*New England Biolabs*) en una reacción de digestión similar a la anterior (excepto las enzimas). El producto de la ligación anterior se purificó mediante el kit DNA clean & concentrator™-kit de Zymo Research y el vector pUC19 se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y recuperó de la correspondiente banda del gel. Ambos fueron ligados entre sí en una reacción similar a la anteriormente realizada (ver Fig 7).

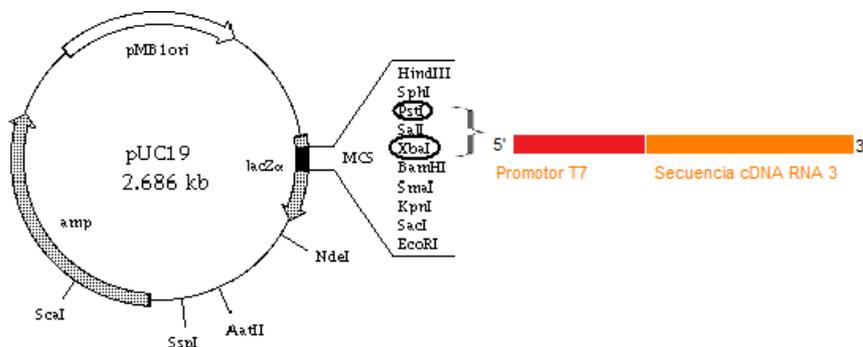


Figura 7. Vector pUC 19 con la construcción introducida.

6.7 CLONAJE DEL FRAGMENTO VIRAL COMPLETO EN BACTERIAS

La construcción obtenida en 6.6, que incluye el fragmento viral completo del RNA3 de AMV aguas abajo del promotor de transcripción T7, se clonó en bacterias competentes de la cepa JM109 de *Escherichia coli* de la empresa Promega. Para ello 2 µl de la construcción fueron añadidos a 50 µl de bacterias y 1 µl de vector pUC19 sin inserto fue añadido a 100 µl de las mismas bacterias como control. Las mezclas se incubaron en hielo 20' y fueron sometidas a choque térmico en un baño termostatzado a 42°C durante 45-50'' sin agitación. Tras esto, fueron introducidas nuevamente en hielo 2' y se añadió medio SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0,01M NaCl, 1M KCl, 2M MgCl₂, 1M glucosa) hasta 1ml. Se dejó en incubación 1h y 30' a 37°C en un agitador horizontal a 150 rpm. La siembra se llevó a cabo en dos placas Petri con el medio de cultivo LB sólido (10 g/l triptona, 5g/l extracto de levadura, 0,008M NaCl, agar, 100mg/ml de ampicilina (Sigma), 0,8M IPTG (Promega) y 50mg/ml XGal (Promega)). En una de ellas se añadió 200 µl de bacterias y en la segunda, tras centrifugar y eliminar 600 µl, se sembraron los 200 µl de células restantes. Las placas fueron depositadas en una estufa y dejadas a 37°C toda la noche.

7. RESULTADOS:

7.1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS DE AMV

Los 10 aislados recolectados en campo a partir de plantas sintomáticas y asintomáticas de alfalfa, se caracterizaron por su reacción en *V. unguiculata*. La observación de síntomas permitió distinguir entre aislados que inducen mosaico sistémico y aislados que inducen lesiones locales necróticas sin aparición de síntomas sistémicos (Tabla 2 y Fig.8). Aquellos aislados que no indujeron lesiones en *V. unguiculata* se inocularon en haba para su clonaje biológico. Unas cinco lesiones por aislado, tanto necróticas (Fig.8) como cloróticas (Fig.9), cada una provocada por una colonia de una variante viral, fueron cortadas e inoculadas en cinco plantas de *N. clevelandii* (Fig.10), planta multiplicadora para propagar los clones obtenidos.

Tabla 2. Material vegetal utilizado y síntomas observados.

ALFALFA		Lesiones locales necróticas en <i>Vigna unguiculata</i>	Aparición de mosaico sistémico en <i>Vigna unguiculata</i>	Multiplicadas en cinco plantas por cada aislado de <i>Nicotiana clevelandii</i>
Alfalfa con síntomas	111	No	Si	
	113	No	Si	
	121	Si	No	
	124	No	Si	
	125	Si	No	
Alfalfa sin síntomas	116	No	Si	
	118	No	Si	
	123	Si	No	
	128	No	Si	
	129	No	Si	



Figura 8. Lesiones necróticas locales que presentó una de las plantas al ser inoculada pasada una semana

CITA, febrero 2014.



Figura 9. Lesiones cloróticas locales en *Vigna unguiculata*. CITA, febrero 2014

2014



Figura 10. Mosaico sistémico a partir de plantas sin síntoma necrótico local.

CITA, julio 2013.



Figura 11. *Nicotiana clevelandii*, planta multiplicadora.

CITA, febrero 2014

Se analizó si existe asociación entre la aparición de síntomas de mosaico en las plantas de alfalfa de procedencia de cada aislado con la inducción de síntomas de mosaico en *V. unguiculata*, para lo cual los resultados de la Tabla 2 se agruparon como se indica en la Tabla 3 (tabla de contingencia).

El análisis de la tabla de contingencia mediante un test chi-cuadrado de comparación entre frecuencias observadas y esperadas (Tabla 3) indicó que la aparición de síntomas de mosaico en alfalfa de procedencia del aislado es independiente de que dicho aislado induzca mosaico en *V. Unguiculata*, sin existir relación estadística alguna ($X^2=0,476$; $P=0,4902$, test exacto de Fisher $G=0,483$; $P=0,487$).

Tabla 3. Frecuencia de aparición de mosaico en alfalfa y *V. unguiculata* (las frecuencias entre paréntesis son las esperadas bajo la hipótesis de que no existe asociación de síntomas en ambos huéspedes)

	Nº de carillas con síntoma	Nº de carillas sin síntomas	Total de plantas
Mosaico en alfalfa	2 (1,5)	3 (3,5)	5
Sin mosaico en alfalfa	1 (1,5)	4 (3,5)	5
Total	3	7	10

7.2 CONSTRUCCIÓN DE UN CLON DE cDNA DE LONGITUD TOTAL DEL RNA3 DE AMV

Se hizo en primer lugar un alineamiento de secuencias de aislados de AMV disponibles en GenBank (Anexo1), con el objetivo de diseñar los cebadores necesarios para amplificar y clonar fragmentos de cDNA de longitud total del RNA3 de los aislados recolectados en campo, mediante la identificación de zonas conservadas en dicho RNA entre distintas secuencias.

El alineamiento de estas secuencias mostraba una alta similitud en las últimas bases del extremo 3', lo que permitía diseñar un cebador. Sin embargo, en el extremo 5', la diferencia entre las secuencias era más notable. Por ello se decidió amplificar a partir del RNA total un fragmento de 2115 nt con los cebadores AMV-R3e3.PstI (R), cuyas bases correspondían al extremo 3', y AMV me5F" EcoRI (F), cuyas bases eran complementarias a las bases posteriores a la región variable del extremo 5', que sí estaban conservadas (Tabla 1 y Fig.6).

Se amplificó dicho fragmento de dos aislados, (121 y 123) que inducían lesión necrótica en *V. Unguiculata* (sin síntomas de mosaico) y otros dos (124 y 129) que inducían mosaico sistémico en dicho huésped. El resultado de la amplificación se muestra en la figura 12.

Para comprobar que la secuencia del extremo 3' del alineamiento coincidía con la secuencia real del genoma de nuestros aislados, se amplificó y secuenció el extremo 3' de las muestras positivas mediante RACE 3' (Fig. 6 y 13). Por otro lado, para poder diseñar un adaptador que complementara los 27nt no amplificados correspondientes a la región variable del extremo 5', se amplificó y secuenció el extremo 5' de las muestras positivas mediante RACE 5' (Fig. 6 y 14). Ambas amplificaciones de los extremos se hicieron partiendo de RNA total, ya que vimos que el dsRNA, extraído en concreto para esta técnica, no se había extraído correctamente.

El alineamiento de las secuencias obtenidas, mostró identidad de secuencia en los 3 aislados amplificados, 121, 124 y 129 de manera que se procedió a diseñar un adaptador común para los tres aislados, AMVlnk5 (Fig 6), el cual fue ligado al fragmento de 2115 nt amplificado anteriormente, de forma que se obtuvo un fragmento de longitud completa del RNA3 de nuestros aislados. El adaptador AMVlnk5 diseñado incluía además la secuencia del promotor T7 inmediatamente aguas arriba de la secuencia viral correspondiente al extremo 5' del RNA 3(Fig. 6). De este modo se podría sintetizar mediante transcripción *in vitro* en presencia de CAP (7MGppp) un RNA que resultada infectivo.

Los fragmentos de longitud completa obtenidos para cada aislado se insertaron en el vector pUC19 (dianas XbaI y PstI, Fig.7) y se clonaron en bacterias.

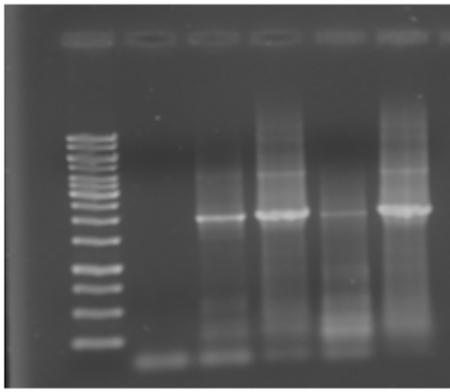


Figura 12a: 1. Marcador 1kb (biotools), 2. Control-, 3-6. Muestras 121, 123, 124 y 129

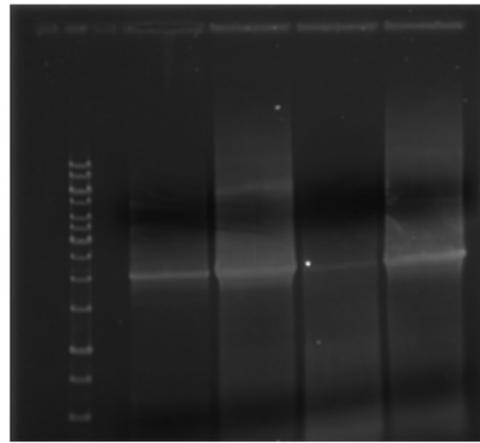


Figura 12b: 1. Marcador 1kb (biotools), 2. Control-, 3-6. Muestras 121, 123, 124 y 129. Recuperación de gel

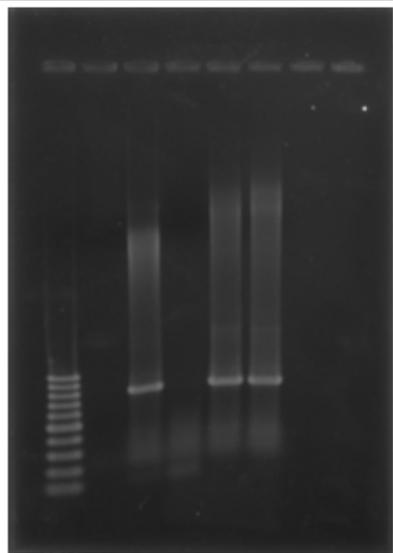


Figura 13. Gel comprobación RACE 3'. 1. Markador 100pb (biotools) 2. Control - 3. 121 4.123 5.124 6.129

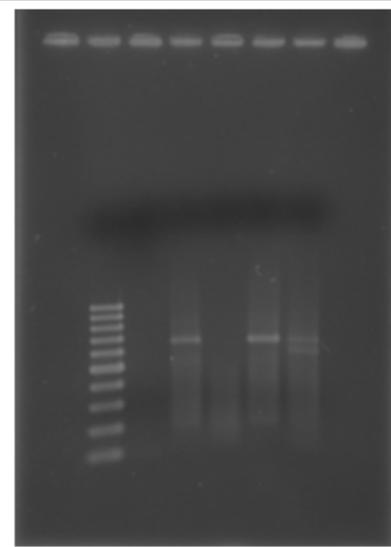


Figura 14. Gel comprobación RACE 5'. 1. Markador 100pb (biotools) 2. Control - 3. 121 4.123 5.124 6.129

7.3 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

En las figuras 15 a 17 se muestran los resultados observados tras la transformación en bacterias de las construcciones obtenidas y su posterior siembra en placas:

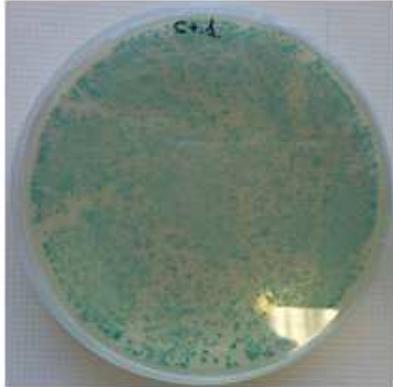


Figura 15. Control positivo (vector pUC19 sin digerir).

CITA, junio 2014



Figura 16. Duplicado control positivo (vector pUC19 sin digerir).

CITA, junio 2014

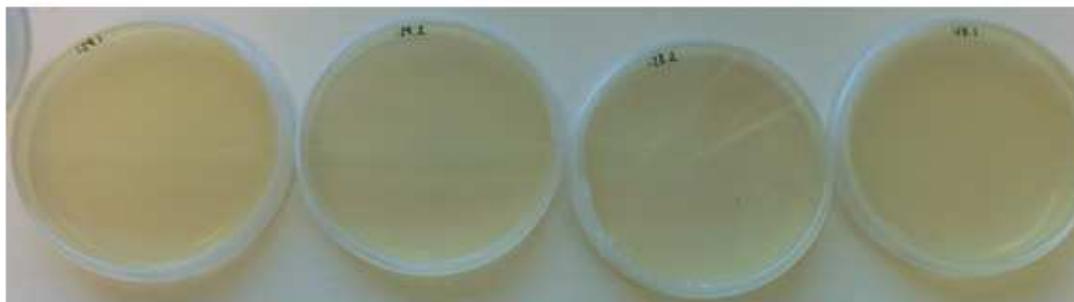


Figura 17. Placas con medio de cultivo LB sólido. Muestras 129 por duplicado y 123 por duplicado.

CITA, junio 2014.

Como puede observarse, las bacterias no fueron transformadas con el vector supuestamente introducido. La transformación si funcionó de forma correcta puesto que en los controles positivos aparecieron colonias de bacterias transformadas.

8. DISCUSIÓN

Trabajos anteriores de caracterización biológica de aislados de AMV realizados en el laboratorio, hacían pensar en la hipótesis de que la manifestación de síntomas de mosaico en alfalfa producida por algunos aislados pudiera estar relacionada con la inducción de mosaico sistémico al inocular tales aislados en el huésped indicador *V. unguiculata*. Los resultados observados en este trabajo, aunque muy preliminares por el bajo número de aislados ensayados, hacen pensar que no existe tal relación, y que la manifestación o no de síntomas sistémicos es independiente en ambas leguminosas.

Con el fin último de identificar el segmento genómico de AMV responsable del comportamiento diferencial de síntomas en leguminosas tales como *V. unguiculata* y *P. vulgaris*, en este trabajo se ha pretendido obtener clones de cDNA de longitud completa correspondientes al RNA3 de aislados de AMV que manifestaran un comportamiento diferencial en inoculación sobre *V. unguiculata*. La premisa para la obtención de los clones es que a partir de ellos se pudiera obtener mediante transcripción *in vitro* en presencia de "CAP", RNAs análogos al RNA3 que resultaran infectivos al inocularlos en un huésped junto con el resto de RNAs que componen el genoma completo de AMV (RNA1 y RNA2) más la CP o el RNA4 subgenómico. Para ello, es necesario incluir una secuencia promotora de transcripción de forma que el inicio de la transcripción coincida lo máximo posible con el inicio de la secuencia del RNA3 del virus, y que no se comprometa la infectividad del transcrito obtenido. En el caso del promotor escogido, el del fago T7, el inicio de la transcripción se produce inmediatamente a partir de la secuencia TATA del promotor, tras la que existen tres G que influyen en la eficiencia de transcripción. En trabajos previos con el virus del mosaico del pepino (CMV) (T.M. Rizzo y P. Paulakaitis, 1990) o el virus del enanismo del cacahuete (C. Hu et al, 1998) se ha visto la relación entre la eficiencia de transcripción y el número de bases de G tras la secuencia TATA, concluyendo que una única G provoca baja o nula transcripción de RNA y dos o más G aumentan progresivamente la eficiencia de transcripción. En dichos trabajos también se comprobó que la inclusión de una única G adicional delante del inicio de la secuencia viral no comprometía gravemente la infectividad del RNA transcrito. Basándose en estas observaciones, al adaptador diseñado se le incluyó una G extra tras la secuencia TATA del promotor e inmediatamente antes del inicio del extremo 5' viral, de manera que el transcrito también la incluiría. Dicha G extra tampoco debería influir en la traducción del RNA transcrito, ya que el marco de lectura se inicia aguas abajo del extremo 5', por lo que no resulta alterado. En otros trabajos, se ha utilizado el promotor del virus sp6 para la

transcripción del RNA 4, en este caso sin necesidad de incluir bases extra (K. Langeris, L.Neeleman & J.Bol, 1986).

En cuanto al fracaso en la recuperación de colonias transformantes con la construcción obtenida, es posible que el gran tamaño del inserto viral, de 2142pb, en comparación con el tamaño del vector pUC19, de 2586pb, haya dificultado la transformación por los métodos habituales.

El procedimiento de construcción de los clones de los RNAs 1 y 2 de AMV con el fin de obtener los correspondientes transcritos infectivos sería el mismo que el seguido en este trabajo para el RNA3. Los RNAs transcritos de los tres segmentos, junto con las moléculas de la CP y del RNA4 subgenómico, son necesarios para obtener infectividad. La inoculación en estas condiciones en *V. unguiculata* de todas las combinaciones posibles entre los transcritos de los tres segmentos genómicos (pseudorrecombinantes) proporcionaría información sobre el segmento genómico responsable de la modulación de síntomas en este huésped indicador.

9. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo, se concluyen los siguientes puntos:

-No parece existir relación entre los síntomas producidos por AMV en alfalfa y en otras leguminosas, como *V. unguiculata* y *P. vulgaris*.

-Se deberán ensayar otros métodos de transformación bacteriana, escoger un vector más estable, o emplear otras cepas de *E. coli* de células competentes para el clonaje del fragmento de cDNA completo correspondiente al RNA3 de AMV.

9. CONCLUSIONS

According to the results of this study, the following points were raised:

-There isn't any relationship between the symptoms produced by AMV in alfalfa and other legumes, such as *V. unguiculata* and *P. vulgaris*.

-It must be tried other methods of bacterial transformation, by choosing a more stable vector, or by using other strains of *E. coli* competent cells for cloning full-length cDNA fragment corresponding to AMV RNA3.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Bancroft J.B. y Kaesberg P. 1958.** Size and shape of *Alfalfa mosaic virus*. Nature 181, 720-721
2. **Bancroft J.B., Moorhead E.I., Tuite J. y Liu H.P. 1960.** The antigenic characteristics and the relationship among strains of *Alfalfa mosaic virus*. Phytopatology 50(1), 34-39
3. **Bol J.F. 2003.** *Alfalfa mosaic virus*: coat protein dependent initiation and infection. Molecular plant phytopatology 4(1), 1-8
4. **Bol J.F. 2005.** Replication of *alfamo* and *ilarviruses*: Role of the coat protein. Annual Review of Phytopatology 43, 39-62.
5. **Bol J.F. 2008.** Alfalfa mosaic virus. En: Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Van Regenmortel, M. y Mahy, B. (eds), 85-91 pp. Elsevier academic press
6. **Edwardson J.R. y Christie R.G. 1991.** Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Florida Agricultural Experiment Station. Monograph 18-1.
7. **Gibbs A.J., Nixxon H.I. y Woods R.D. 1963.** Properties of purified preparation of *Lucerne mosaic virus*. Virology 19(4), 441-449
8. **Gould A.R. y Symons R.H. 1978.** *Alfalfa mosaic virus* RNA determination of sequence homology between 4 RNA species and a comparison with 4 RNA species of *Cucumber mosaic virus*. European Journal of Biochemistry 91(1), 269-278.
9. **Hagedorn D.J: y Hanson E.W. 1963.** A strain of *Alfalfa mosaic virus* severe on *Trifolium pretense* and *Melilotus alba*. Phytopatology 53(2), 188-192.
10. **Hajimorad M.R. y Francki. 1988.** *Alfalfa mosaic virus* isolates from Lucerne in South Australia: biological variability and antigenic similarity. Annals of Applied Biology, 113(1), 45-54
11. **Hull R. 1969.** *Alfalfa mosaic virus*. Advances in virus research 15, 365-433.
12. **Hu. C, Sanger M. y GHabrial S.A. 1998.** Production of infectious RNA transcripts from full-length cDNA clones representing two subgroups of *Peanut stunt virus* strains: mapping satellite RNA support to RNA 1. Journal of General Virology. 79, 2013-2021
13. **Jaspars E.M.J. y Bos I. 1980.** *Alfalfa mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No 229. 7pp.

14. **Langereis K., Neeleman L. y Bol J.F. 1986.** Biologically active transcripts of cloned DNA of the coat protein messenger of two plant viruses. *Plan molecular biology* 6, 281-288
15. **Olsthoorn, R.C.L., Mertens S., Brederode, F.T. y Bol J.F. 1999.** A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA Regulates viral replication. *EMBO J.* 18, 4856-4864
16. **Pinck L. 1975.** 5'-ends groups of Alfalfa mosaic virus RNAs are M7g5'ppp5'gp. *Febs letters.* 59(1), 24-28
17. **Rizzo T.M. y Palukaitis P. 1990.** Construction of full-length cDNA clones of *Cucumber mosaic virus* RNAs 1,2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts. *Molecular genetics and genomics* 222, 249-256
18. **Sánchez-Navarro J.A. y Bol J.F. 2001.** Role of the *Alfalfa mosaic virus* movement protein and coat protein in virus transport. *Mol Plant Microbe interact* 14(9), 1051-62
19. **Schmelzer, K., Schmidt, H. E., and Beczner, L. .1973.** Spontaneous host plants of *Lucerne mosaic virus*. *Biology Zentralbl.* 92: 211-227
20. **Vlot A.C., Neeleman L., Linthorst H.J.M y Bol J.F. 2001.** Role of the 3'-untranslated regions of *Alfalfa Mosaic Virus* RNAs in the formation of a transiently expressed replicase in plants and in the assembly of virions. *Journal of virology.* 75(4), 6440-6449

ANEXO I

Número de acceso de GenBank de las secuencias usadas en el alineamiento

Aislado	País de origen	Huésped	RNA3 ^a
425L	USA	<i>Trifolium repens</i>	K03542 c
YSMV	USA	<i>Medicago sativa</i>	M59241 c
425M	USA	<i>Trifolium repens</i>	K02703 c
NY-A	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY340070 CP
NY-B	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY340071 CP
P.paniculata	USA	<i>Phlox paniculata</i>	DQ124429CP
Joe Davis	USA	<i>Glycine max</i>	HQ185569CP
VIRB	Spain	<i>Viburnum lucidum</i>	EF427449 CP
Tec-1	Spain	<i>Tecoma capensis</i>	FR715042 c
TM2	Spain	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HE591386 CP
CV1	Spain	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HE591387 CP
Lye-80	France	<i>Solanum lycopersicum</i>	AJ130703 CP
Caa-1	France	<i>Capsicum annuum</i>	AJ130707 CP
Dac-16	France	<i>Daucus carota</i>	AJ130708 CP
Lyh-1	France	Wild tomato	AJ130709 CP
S	England	<i>Medicago sativa</i>	X00819 c
VRU	England	<i>Lupinus polyphyllus</i>	AF015716 c
15/64	England	<i>Lupinus polyphyllus</i>	AF015717 c
126-A	Italy	<i>Portulaca oleracea</i>	AJ130704 CP
F-430	Italy	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AJ130706 CP

Aislado	País de origen	Huésped	RNA3^a
195-AN	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	AJ130705 CP
Da	Italy	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y09110 CP
Lst	Italy	<i>Lavandula stoechas</i>	FN667967 c
Tef-1	Italy	<i>Teucrium fruticans</i>	FR854391 CP
95-08	Serbia	<i>Medicago sativa</i>	FJ527748 CP
196-08	Serbia	<i>Nicotiana tabacum</i>	FJ527749 CP
100-08	Serbia	<i>Syringa vulgaris</i>	EU925642 CP
Ca375	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314749CP
Ca175	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314750CP
Ca399	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314751CP
Ca400	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314752CP
Ca401	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314753CP
Ca508	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314754CP
Ca518	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314755CP
Ca616	Canada	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ314756CP
AMV-P	Brazil	<i>Carica papaya</i>	FJ858264 CP
AMV-A	Brazil	<i>Medicago sativa</i>	FJ858265 CP
V.tinus	Chile	<i>Viburnum tinus</i>	JN040542 CP
HQ288892.1	Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>	HQ288892CP
N20	Australia	<i>Medicago sativa</i>	HM807304CP

Aislado	País de origen	Huésped	RNA3^a
S30	Australia	<i>Medicago sativa</i>	HM807305CP
S40	Australia	<i>Medicago sativa</i>	HM807306CP
W1	Australia	<i>Medicago sativa</i>	HM807307CP
WC3	Australia	<i>Trifolium repens</i>	JN209847 CP
TN	Australia	<i>Medicago sativa</i>	HQ185568CP
NZ1 Lincoln	New Zealand	<i>Medicago sativa</i>	AF215663 CP
NZ34	New Zealand	<i>Medicago sativa</i>	AF215664 CP
NZ1	New Zealand	<i>Medicago sativa</i>	U12509 CP
NZ2	New Zealand	<i>Medicago sativa</i>	U12510 CP
175	New Zealand	<i>Actinidia guilinensis</i>	KC767660 c
176	New Zealand	<i>Actinidia glaucophylla</i>	KC767661 c
178	New Zealand	<i>Actinidia fortunatii</i>	KC767662 c
HZ	China	--	HQ316637c
AZ	Korea	--	AB126031 c
Kr	Korea	--	AB126032 c
KR1	Korea	<i>Solanum tuberosum</i>	AF294432 CP
KR2	Korea	<i>Solanum tuberosum</i>	AF294433 CP

Secuencia RNA3 completo (c) o parcial (CP) sequence