



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UN AISLADO
CHILENO DE *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS*. EXPRESIÓN DEL GEN
DE LA CÁPSIDE Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
POLICLONALES CON FINES DE INMUNODIAGNÓSTICO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

VANIA MILENKA ARREDONDO RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: PABLO VALENZUELA VALDÉS
PROFESOR PATROCINANTE: MARIO ROSEMBLATT SILBER

FUNDACIÓN CIENCIA PARA LA VIDA

Santiago, Chile 2005

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi querida madre, Julita para la familia y los amigos, ya que sin su apoyo y confianza el llegar hasta aquí no habría sido posible. Ella ya no está con nosotros pero su memoria y recuerdos lo estarán por siempre...

A mi madre, esté donde esté...

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las siguientes personas que permitieron llevar a cabo esta meta:

A mi director de tesis, Dr. Pablo Valenzuela, por recibirme en la Fundación y permitirme trabajar en su laboratorio, por su tiempo dedicado.

A Esteban Engel, con quien trabajamos juntos desde los inicios del proyecto y me ayudó con sus conocimientos en aprender las técnicas de laboratorio.

A la Dra. Vivian Wilhelm, por su ayuda en el laboratorio y fuera de él, por su preocupación incondicional y sus consejos dedicados.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer el trabajo diario en un ambiente grato y por su solidaridad en todo momento.

A Juani Bustamante, de Bios Chile IGSA, quien colaboró en el proyecto con la realización de los anticuerpos policlonales.

A la Fundación Ciencia para la Vida, Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB) y al Proyecto FONDEF G02S1001, ya que con su financiamiento se llevo a cabo este proyecto.

A mis padres y hermano, July, Julián y Pablo, quienes me apoyaron desde mis inicios de universidad para llegar hoy a la culminación de esta etapa.

A todos mis amigos de universidad, y que conservo hasta hoy, por hacer más entretenidos los años de universidad.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción e importancia del problema.....	1
1.2 Virus de vides.....	3
1.2.1 Virus de Hoja de Abanico de la Vid (<i>Grapevine Fanleaf Nepovirus</i> , GFLV).....	5
1.2.1.1 Genoma del virus GFLV	7
1.3 Variabilidad de los genomas virales	9
1.4 Aplicaciones biotecnológicas	10
1.5 Objetivos generales	11
1.5.1 Objetivos específicos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Material biológico	13
2.1.1 Muestras de vides infectadas con GFLV.....	13
2.1.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	13
2.2 Oligonucleótidos.....	14
2.2.1 Partidores para PCR	14
2.3 Vectores plasmidiales para clonamiento y expresión.....	16

2.4 Técnicas de biología molecular	17
2.4.1 Extracción de ARN total de vides infectadas con GFLV	17
2.4.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante transcripción reversa	18
2.4.3 Amplificación del ADNc de GFLV por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y clonamiento de los fragmentos obtenidos	19
2.4.4 3' RACE	20
2.4.5 Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa	20
2.4.6 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.....	21
2.4.7 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción	21
2.4.8 Desfosforilación y purificación de vectores plasmidiales	21
2.4.9 Ligación de un fragmento de ADN a un vector plasmidial	22
2.4.10 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	22
2.4.11 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	23
2.4.12 Purificación de ADN plasmidial	24
2.4.13 Secuenciación de ADN.....	24
2.4.14 Análisis de secuencias	24
2.5 Clonamiento de la región codificante de la proteína de cubierta del aislado GFLV Ch-80.....	25
2.6 Expresión de la proteína de cubierta CP Ch-80 en <i>E. coli</i>	26
2.7 Purificación de la proteína recombinante CP Ch-80.....	27
2.7.1 Columna de afinidad Ni-agarosa	27
2.7.2 Lavados con urea y solubilización con SDS	28
2.8 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes	29
2.9 Obtención de anticuerpos policlonales	30
2.9.1 Inmunización de conejos con la proteína recombinante y obtención de anticuerpos policlonales	30
2.9.2 Preparación de anticuerpos policlonales mediante el uso de péptidos sintéticos	30
2.9.3 Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA.....	31

2.9.4	Análisis de anticuerpos mediante <i>Western blot</i>	33
3.	RESULTADOS	34
3.1	Análisis de muestras de tejido de vides infectadas con GFLV	34
3.2	Extracción de ARN total de vides infectadas con GFLV.....	35
3.3	Preparación y clonamiento de ADNc viral	36
3.3.1	RT-PCR	36
3.4	Secuenciación del genoma viral	39
3.5	Análisis de secuencias.....	42
3.6	Clonamiento y expresión del gen CP Ch-80 en <i>E. coli</i>	47
3.6.1	Estimación de la concentración de proteínas.....	51
3.7	Purificación de la proteína recombinante CP Ch-80 β	52
3.8	Obtención de anticuerpos policlonales	54
3.8.1	Evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA	55
3.8.2	Análisis de anticuerpos policlonales mediante <i>Western blot</i>	58
4.	DISCUSIÓN.....	60
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Principales productos silvoagropecuarios de exportación	2
Tabla 2. Virus fitopatógenos de vides de importancia en Chile	4
Figura 1. Fotografía de una planta infectada con GFLV	7
Figura 2. Esquema del genoma de GFLV	9
Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar genes del ARN1 de GFLV Ch-80.....	15
Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar genes del ARN2 de GFLV Ch-80.....	15
Figura 3. Vectores utilizados en el clonamiento y expresión de genes de GFLV Ch-80.....	17
Tabla 5. Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados para el clonamiento de CP Ch-80 en vectores de expresión bacteriana	25
Tabla 6. Secuencia aminoacídica de los péptidos sintéticos diseñados para el desarrollo de anticuerpos policlonales anti GFLV Ch-80.....	31
Figura 4. Fotografía de una planta infectada con GFLV Ch-80	35
Figura 5. Análisis de ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa	36
Figura 6. Amplificación de fragmentos del ARN2 de GFLV Ch-80 mediante RT-PCR	38
Figura 7. Amplificación de fragmentos del ARN1 de GFLV Ch-80 mediante RT-PCR	39
Figura 8. Secuencia nucleotídica del gen estructural y secuencia aminoacídica de la proteína CP Ch-80.....	41
Figura 9. Alineamiento nucleotídico múltiple de una porción de la región codificadora de la proteína de movimiento de distintos aislados chilenos de GFLV.....	44

Figura 10. Alineamiento aminoacídico múltiple de una porción de la proteína de movimiento de distintos aislados chilenos de GFLV	45
Tabla 7. Comparaciones a nivel de una porción de la proteína de movimiento entre distintos aislados de GFLV	45
Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de CP Ch-80 y de la CP de aislados de otros países	46
Figura 12. Esquema de la amplificación de la región que codifica para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β mediante PCR y clonamiento en el vector pGEM-T	49
Figura 13. Esquema del clonamiento de la región que codifica para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β en los diferentes vectores de expresión y análisis de la digestión enzimática de los clones mediante electroforesis en geles de agarosa	50
Figura 14. Análisis de las proteínas recombinantes CP Ch-80 α y CP Ch-80 β mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.....	51
Figura 15. Estimación de la concentración de CP Ch-80 α y CP Ch-80 β recombinantes en un extracto crudo de bacterias recombinantes	52
Figura 16. Análisis de la purificación parcial de CP Ch-80 β mediante cromatografía en Ni-agarosa por electroforesis en gel de poliacrilamida	53
Figura 17. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de la purificación parcial de CP Ch-80 β obtenida de bacterias transformadas con pET-32a y pET-28a	54
Figura 18. Titulación mediante ELISA de sueros policlonales obtenidos con los antígenos CP Ch-80 α y CP Ch-80 β	56
Figura 19. Titulación mediante ELISA de sueros policlonales obtenidos con péptidos sintéticos como antígenos.....	57
Figura 20. Análisis de anticuerpos policlonales mediante <i>Western blot</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilil fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina de bovino
CP	Proteína de cubierta
dNTP	Deoxiribonucleótido trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FAL	Fosfatasa alcalina
g	Fuerza de gravedad
GFLV	Virus de hoja en abanico de la vid
GST	Glutación S-transferasa
IPTG	Isopropil tio- β -galactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M-MLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina
MP	Proteína de movimiento
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
nt	Nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato-salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tampón tris-acetato EDTA
TBS	Tampón salino tris-borato
TE	Tampón tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TRX	Tioredoxina de <i>E. coli</i>
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
UTR	Región no traducible del genoma
VPg	Proteína asociada al genoma viral
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Grapevine fanleaf es una de las más importantes y diseminadas enfermedades de la vid causadas por el GFLV (virus de hoja en abanico de la vid). El genoma de GFLV está compuesto de dos fragmentos de ARN de hebra simple de sentido positivo. El ARN1 codifica para todas las proteínas requeridas en la replicación y por su parte, el ARN2 lo hace para proteínas requeridas en el ensamblaje y movimiento del virus.

Chile, un importante productor de vino y uva de mesa, es afectado por este problema. Es por ello, que la detección de virus que infectan vides es necesaria en programas de mejoramiento sanitario en el cual el propósito es la propagación de material de plantas libres de virus. En base a lo anteriormente descrito, en esta tesis realizamos el análisis molecular de distintos aislados de GFLV, de las regiones Metropolitana, V y VI de Chile.

Se obtuvo ARN viral, el cual fue clonado en bacterias luego de su amplificación por RT-PCR. Con ello se logró obtener la secuencia completa del genoma de GFLV Ch-80 y de zonas de interés de los otros aislados. Comparaciones de las secuencias obtenidas muestran una identidad de 90% a nivel de nucleótidos y 93% a nivel de aminoácidos.

La proteína de cubierta viral (CP Ch-80) se clonó y expresó en dos fragmentos (CP Ch-80 α y CP Ch-80 β) en *E.coli*. Posteriormente estas proteínas se purificaron y utilizaron en el desarrollo de anticuerpos policlonales. Como una segunda estrategia, se diseñaron péptidos sintéticos en base a la secuencia de CP Ch-80 obtenida en nuestro laboratorio, los cuales se inyectaron en conejos para la elaboración de anticuerpos policlonales contra GFLV. Se evaluó la respuesta inmune a los anticuerpos obtenidos mediante ELISA y *Western blot*. Los resultados obtenidos demuestran que los anticuerpos reconocen la proteína recombinante. Además se realizaron análisis preliminares de inmunocaptura viral (IC-RT-PCR) con plantas infectadas con GFLV los cuales reafirman estos resultados.

ABSTRACT

Grape fanleaf is one of the most important and widespread grape disease caused by GFLV (Grapevine Fanleaf Virus). The GFLV genome is constituted by two positive single strands RNAs. The RNA 1 encodes for all the proteins involved in replication and RNA 2 encodes for proteins required for virus assembly and movement.

Chile, an important wine and table grape producer, is affected by this problem. Therefore, the detection of virus that infects grapevines is needed in programs of sanitary improvement in which the purpose is to propagate virus-free plant material. Based on this, we analyzed molecularly the different GFLV isolates from regions V, VI and Metropolitan of Chile.

We obtained viral RNA that was cloned in bacteria after amplification by RT-PCR. We obtained the full genome sequence of GFLV Ch-80 and partially sequenced regions of other Chilean isolates. Sequence comparison showed a nucleotide identity of 90% and amino acid identity of 93%.

The coat protein (CP Ch-80) was cloned and expressed in *E. coli* in two fragments (CP Ch-80 α and CP Ch-80 β). Then, these proteins were purified and used to develop polyclonal antibodies. As a second strategy, synthetic peptides designed based on the CP Ch-80 sequence obtained in our lab, were injected into rabbits to develop polyclonal antibodies against GFLV. The immune response of the antibodies was evaluated by ELISA and Western blot. The results obtained showed that the antibodies recognize the recombinant protein. In addition, preliminary analysis of infected plants with GFLV by means of immunocapture (IC-RT-PCR) confirmed these results.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción e importancia del problema

Actualmente, la actividad frutícola en Chile constituye un motor fundamental de crecimiento y desarrollo económico. En general, las inversiones en el ámbito frutícola, que han sido impulsadas por los sectores público y privado, se han orientado principalmente a la producción de fruta fresca para su exportación. En el caso de las vides, las inversiones se han extendido también a la actividad vinícola y pisquera. Los viñedos chilenos se concentran entre la V y VII regiones, con 52.366 hectáreas destinadas a uva de mesa, 9.791 hectáreas a vides pisqueras y 108.569 hectáreas a vides para la producción de vino. Las exportaciones chilenas de uva de mesa generaron un retorno de US\$ 713 millones durante el año 2003 (ODEPA, 2004). Las empresas vitivinícolas nacionales exportaron el 40% de la producción nacional de vinos, cuyo valor superó los US\$ 524 millones en el año 2003. Actualmente, los vinos chilenos constituyen el 3% del total de vinos comercializados a escala mundial. En términos globales, el negocio del cultivo de la vid significa una entrada anual de más de US\$ 1.300 millones para nuestro país (ODEPA, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales productos silvoagropecuarios de exportación

PRODUCTOS	Valor (Miles de dólares) Año 2003
Celulosa	889.607
Uvas	712.782
Vino con denominación de origen	524.106
Manzanas	311.194
Maderas de Pino Insigne aserradas	427.892
Maderas en plaquitas	128.433
Maíz para la siembra	67.731
Papel Prensa (para periódico)	92.994
Ciruelas	72.403
Listones y molduras de madera	180.653
Peras	65.593
Kiwi	87.732
Puertas y sus marcos umbrales	76.166
Nectarines	45.167
Los demás vinos	74.319
Fuente: ODEPA. Cifras provisorias	

La amplitud de la oferta nacional, en términos de la variedad de especies y la longitud de la temporada frutícola, le permite al país acceder, de manera ventajosa, a los mercados internacionales. En general, el sector vitícola y vinícola cuenta con el apoyo técnico adecuado que garantiza la producción y exportación de uva. Sin embargo, aún existe un potencial de mejoramiento en la productividad. El área que presenta mayores falencias está relacionada con la calidad en la producción de la fruta. Dentro de los factores que disminuyen la calidad de la uva, se encuentran las enfermedades ocasionadas por hongos (ej: *Botritis cinerea*), bacterias (ej: *Xylella fastidiosa*) y virus. Dentro de éstas, las infecciones virales han sido las menos estudiadas en Chile. Las pérdidas económicas (5-20% de reducción en la producción) producidas por virus en vides son debidas a distintos factores: reducción de crecimiento, alteración del color y sabor de las bayas, deformación, retraso en la

maduración, aumento de la sensibilidad a otros patógenos y plagas, incompatibilidad de la variedad con el portainjerto y muerte de la planta (Covarrubias, 1993).

Las infecciones virales, en general, son de mayor dificultad de control que las causadas por otros patógenos vegetales. El hecho de que los virus utilicen como sistema de disseminación a insectos, nemátodos, ácaros e inclusive al hombre, permite que éstos se propaguen rápidamente en una plantación, con los consecuentes daños en la planta y la reducción en su producción.

1.2 Virus de vides

En el cultivo de la vid, se han identificado 44 virus diferentes a nivel mundial, pertenecientes a 5 familias y 16 géneros (Martelli y Walter, 1998). Los virus pertenecientes al grupo de los *Nepovirus* son los más disseminados y en Europa son denominados como degenerativos (Herrera, 2001); dentro de este grupo está el *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV) y el *Arabis Mosaic Virus* (ArMV). En Norteamérica son denominados como causantes de declinamiento: *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV) y *Tobacco Ringspot Virus* (TRSV) entre otros. Otro grupo de importancia lo constituyen aquellos pertenecientes a los *Closteovirus*, cuyo principal representante es *Grapevine Leafroll Virus* (GLRV). También se ha detectado la presencia de *Grapevine Fleck Virus* (GFV), *Grapevine Virus A* y *Grapevine Virus B* (GVA y GVB). Algunos de estos virus han sido reportados anteriormente en Chile, con los consiguientes daños para la fruticultura nacional. Afortunadamente, varios de los virus detectados en el mundo, presentan bajos porcentajes de disseminación y sólo merecen atención por las repercusiones económicas que ellos pudieran tener en el

mediano y largo plazo. En cambio, los virus de mayor agresividad y velocidad de propagación como: GFLV, ArMV, ToRSV y GLRV sin lugar a dudas merecen gran atención. Estos virus se transmiten fácilmente a través de material vegetativo e inciden negativamente sobre la actividad y capacidad productiva de las plantas afectadas, por lo que el control resulta fundamental e incluye diversas medidas complementarias, como la sanidad del material reproductivo proveniente de viveros (Tabla 2).

Tabla 2. Virus fitopatógenos de vides de importancia en Chile

HOSPEDERO	VIRUS	CLASIFICACIÓN	NOMBRE
VIDES	GFLV	<i>Nepovirus</i>	<i>Grapevine Fanleaf Virus</i>
	GLRaV cepas 2, 3	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine Leafroll Virus</i>
	ToRSV cepa <i>grape yellow</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Tomato Ringspot Virus</i>
	TRSV	<i>Nepovirus</i>	<i>Tobacco Ringspot Virus</i>

Las primeras observaciones de síntomas de virus de vides en Chile fueron hechas y reportadas por Hewitt en 1965. En 1979, Cereceda y Auger, identificaron como GFLV a un virus causante de amarillez foliar en la variedad Cabernet Semillón. Posteriormente, Auger y col., en 1994, estudiaron los efectos en el desarrollo y productividad de las plantas afectadas con el virus. En la actualidad, se considera que las principales enfermedades causadas por virus a nivel mundial están presentes en Chile. Así, se han reportado GFLV (Auger y col., 1994), GLRV (Arancibia, 1988), TomRSV (Herrera y Madariaga, 1994a), ArMV y *Cherry leafroll virus* (CLRV) (Herrera, 1996; Sánchez y Hepp, 1994; Sánchez, 1995).

Las pérdidas económicas producidas por agentes virales en vides, principalmente responden a la falta de madurez del fruto, determinante esencial en la calidad de la uva exportada. En el proceso de vinificación, los fenómenos que más se afectan son el tamaño del grano, la acumulación de azúcares, la disminución de la acidez y la formación de aromas o compuestos volátiles y polifenoles. El GFLV, en el que se centran los estudios realizados en esta tesis, incide negativamente sobre la actividad vegetativa y productiva de las plantas afectadas, aún cuando no aparezcan síntomas visibles. En plantas asintomáticas, es decir, aquellas que probablemente posean una baja carga viral, se ha observado una disminución de 5% en la productividad anual (Golino, 1993). En cambio, en las plantas que presentan síntomas de la enfermedad, se ha observado una reducción en la producción promedio del 23% y una disminución del contenido de azúcar del 5% (Digiario y col., 1997). Las pérdidas económicas aumentan si se considera que una parte de la producción resulta imposible de vender por efecto de la incompleta coloración de las bayas maduras, y por la elevada mortalidad de las plantas (Digiario y col., 1997). Adicionalmente, se ha comprobado que injertos realizados sobre material vegetal infectado en forma latente, pueden desarrollar fenómenos de incompatibilidad, inclusive años después de realizado, con la consiguiente muerte de la planta (Golino, 1993).

1.2.1 Virus de Hoja de Abanico de la Vid (*Grapevine Fanleaf Nepovirus*, GFLV)

Su nombre proviene de una malformación de las hojas, en la cual, las venas centrales tienden a juntarse dando la típica apariencia de abanico. En la actualidad se encuentra distribuido a través de todo el mundo. Su impacto en la planta varía de

acuerdo al grado de tolerancia de la variedad al virus. Mientras ciertos cultivares tolerantes bajan levemente los rendimientos, aquellos susceptibles pueden alcanzar pérdidas de hasta 80% debido a la baja calidad del fruto y disminución de la vida útil de la planta (Martelli, 1993). El agente causal que produce la enfermedad de GFLV pertenece al grupo de los *Nepovirus*. Las partículas son esféricas de 30 nanómetros de diámetro. El genoma es bipartito, y está compuesto de dos segmentos de ARN de una hebra y de orientación positiva (ARN actúa directamente como mensajero). Aún cuando el virus tiene como hospedero natural exclusivamente a plantas de *Vitis sp.*, se propaga fácilmente por transmisión mecánica a hospederos herbáceos (*Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana benthamiana*, entre otros).

El virus se dispersa mediante injertación y comercialización de plantas enfermas o asintomáticas. También puede diseminarse por nemátodos del género *Xiphinema* (*X. index* y *X. italiae*). La persistencia del virus está asociada a plantas enfermas en el suelo, junto a los nemátodos vectores (Latorre, 1992). La enfermedad se caracteriza por manifestar tres tipos de síntomas de acuerdo a la reacción al agente causal. El primer síntoma denominado malformación infecciosa, muestra hojas asimétricas con agudas denticulaciones y severamente deformadas. Los sarmientos se presentan ramificados, cortos y se desarrollan en forma de zigzag. El segundo síntoma es denominado mosaico amarillo, porque las hojas toman una descoloración amarillo brillante. Los efectos en las hojas pueden variar desde pequeñas manchas cloróticas hasta argollas de color amarillo en la lámina de las hojas. El tercer síntoma, denominado clarificación de venas, se caracteriza por presentar, inicialmente,

pequeñas manchas amarillas a lo largo de la vena principal de hojas maduras. Posteriormente, se dispersan a toda el área intervenal (Figura 1). En los primeros años, los síntomas pasan inadvertidos, excepto por heterogeneidad en la brotación, especialmente en las regiones más frías. Posteriormente, las plantas infectadas muestran acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas, deformadas y disminuciones de crecimiento. Bajo las condiciones de comercialización de plantas de vides en Chile, en que predomina la venta de plantas corrientes, y las características de este grupo de virus (transmisión por nemátodos y material de propagación), en el futuro podrían constituirse en un serio problema para el cultivo de la vid en Chile.



Figura 1. Fotografía de una planta infectada con GFLV
Síntomas de clarificación de venas en hojas de vides causados por GFLV.
Foto: Guido Herrera. INIA, La Platina, Santiago de Chile.

1.2.1.1 Genoma del virus GFLV

El genoma de los dos aislados de estos virus secuenciados a la fecha (Serghini y col., 1990; Ritzenthaler y col., 1991 y Wetzel y col., 2001), está formado por dos ARNs de una hebra y de sentido positivo, los que contienen una proteína (VPg) en el

extremo 5'-terminal y una cola de poli A en el extremo 3'-terminal (Pinck y col., 1988; Martelli, 1991) (Figura 2). El ARN1 consiste de 7.342 nucleótidos (Rizenthaler y col., 1991; Wetzel y col., 2001) que codifican para una poliproteína de 253 kDa (P1), la que es auto procesada, dando origen a cinco proteínas requeridas para su replicación, llamadas: Cofactor de Proteasa, Helicasa, VPg, Proteasa y Polimerasa. El ARN2 de estos aislados, consiste de 3.774 nucleótidos los cuales codifican para una poliproteína de 122 kDa (P2), que es procesada en trans por la proteasa codificada por el ARN1, asegurando el proceso de replicación del ARN2. Las proteínas codificadas en el ARN2 son responsables de la encapsidación y movimiento del virus. Una tercera proteína estaría involucrada en la replicación del ARN2, junto con las proteínas codificadas por el ARN1, la cual es capturada por la maquinaria de replicación codificada en el ARN1 a través de interacciones específicas ARN-proteína y proteína-proteína. Este proceso se ha descrito asociado con estructuras membranosas desde su sitio de localización inicial en el citosol hasta su sitio de replicación perinuclear (Ritzenthaler y col., 2002).

Se ha descrito que existe una gran variabilidad en el genoma de GFLV (Serghini y col., 1990; Brand y col., 1995; Esmenjaud y col., 1994; Sánchez y col., 1991). Estas investigaciones han indicado que la variabilidad en la secuencia del genoma de GFLV es del orden del 10% en los nucleótidos y de un 4% en la proteína. Este nivel de variación sugiere que el genoma de GFLV podría corresponder a una colección de mutantes genéticamente diferentes (Roossinck, 1997; Schneider y Roossinck, 2000).

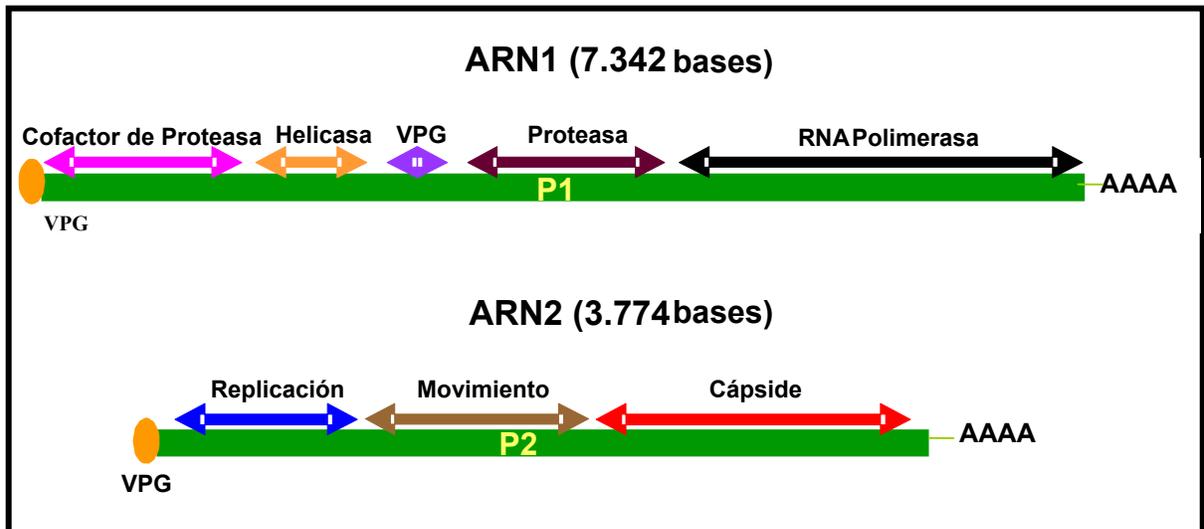


Figura 2. Esquema del genoma de GFLV

Se muestran las dos hebras de ARN de GFLV y las proteínas que codifica cada una. **Vpg**: proteína asociada al genoma viral.

1.3 Variabilidad de los genomas virales

Es sabido que aproximadamente el 80% de los virus que infectan plantas tienen un genoma de ARN (hebra simple o doble) de orientación positiva, que durante su replicación puede incorporar mutaciones en su genoma, generando variabilidad dentro de una cepa (García-Arena y col., 2001). Reportes en la literatura demuestran que simples sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, en la proteína de cubierta viral), pueden afectar severamente la sintomatología viral (Hammond y Crosslin, 1998; Shintaku y col., 1992; Szilazy y col., 1999), la especificidad del hospedero (Hamamoto y col., 1997), la habilidad de desplazamiento del virus (Andersen y Johansen, 1998; Sit y col., 2001) e inclusive la capacidad del virus para sobrepasar genes de resistencia de la planta (Padget y Beachy, 1993; Weber y col., 1993). El hecho de que mutaciones en un solo aminoácido puedan generar severas alteraciones de la capacidad infectiva viral, pudiendo inclusive, plantas resistentes

tornarse susceptibles a virus, justifica plenamente la necesidad de caracterizar a nivel molecular aislados virales locales, lo que permitirá diseñar estrategias más eficientes para el diagnóstico y control viral. Cabe considerar, que los estudios más relevantes realizados hasta la fecha, acerca de la caracterización de los genomas de estos patógenos y de su variabilidad, han sido realizados en Estados Unidos y Europa, con aislados obtenidos en el hemisferio norte. No hay información referente a la heterogeneidad genómica de las cepas virales aisladas en Chile.

1.4 Aplicaciones biotecnológicas

Uno de los principales problemas que enfrenta nuestro país, es el alto grado de infecciones producidas por virus, bacterias y hongos que afectan a nuestras plantaciones frutales. Lo anterior se ve agravado por la demostración de que gran parte de las plantas disponibles en viveros, también se encontrarían infectadas con virus (Herrera y Madariaga, 2001). En relación a lo anterior, un tópico de gran relevancia que se abordará en esta tesis, se relaciona con el desarrollo de sistemas de detección viral. Actualmente, nuestro país carece de entidades públicas o privadas que cuenten con la infraestructura, capacidad técnica y financiera para certificar o producir plantas libres de virus. A ello se agrega el alto costo y en algunos casos, la baja sensibilidad de los sistemas de detección viral disponibles en el mercado. Su alto costo se debe a que son productos biotecnológicos de importación, lo que se traduce en un desinterés de los productores de frutas en adoptar tecnologías de detección viral en forma rutinaria.

Se requiere entonces, desarrollar sistemas de diagnóstico que detecten con alta especificidad y sensibilidad las variedades chilenas del virus GFLV, para lo cual es necesario determinar la secuencia del genoma del virus. Esto facilitará el entendimiento de los procesos que ocurren durante la interacción planta-virus, generará información referente a la variabilidad de cepas virales presentes en el país y permitirá implementar nuevos sistemas de detección de alta especificidad basados en el ácido nucleico viral.

1.5 Objetivos generales

El objetivo del trabajo de esta tesis es caracterizar la secuencia genómica de aislados chilenos de GFLV, expresar la proteína de cubierta (CP) viral y posteriormente generar anticuerpos contra esta proteína que permitan en el futuro, el desarrollo de métodos de detección. Esto permitirá, primero, iniciar estudios acerca de la variabilidad de las cepas virales presentes en el país y segundo, contribuir a mejorar la detección de GFLV en Chile.

1.5.1 Objetivos específicos

- 1.-** Análisis de muestras de tejido de vides obtenidas de las regiones: Metropolitana, V y VI de Chile para confirmar la infección con virus.
- 2.-** Selección de un método de extracción de ARN total a partir de vides infectadas.
- 3.-** Amplificación específica de fragmentos virales por medio de la técnica RT-PCR de distintas zonas del genoma viral.

4.- Clonamiento y secuenciación del genoma del aislado 80 (GFLV-Ch80) y de regiones de interés de otros aislados.

5.- Obtención de proteínas virales recombinantes en *E. coli* con el fin de producir anticuerpos policlonales destinados al desarrollo de sistemas de inmunodiagnóstico.

6.- Diseño de péptidos sintéticos en base a la secuencia obtenida de aislados chilenos de GFLV, con el fin de producir anticuerpos policlonales como estrategia para la detección de variantes locales de este virus.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1 Muestras de vides infectadas con GFLV

Las muestras infectadas fueron gentilmente proporcionadas por el Ing. Agrónomo Nicola Fiore, Campus Antumapu, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile. Estas son: aislado 80, cepa Cabernet Sauvignon, procedente de Alto Jahuel, Región Metropolitana; aislado 133, cepa Thompson Seedless, procedente de la V Región y aislado 229, cepa Thompson Seedless, procedente de la VI Región.

Para la secuenciación del genoma completo del virus se utilizó el aislado 80 (GFLV Ch-80), por el hecho de presentar síntomas claros de infección por GFLV además de ser el de mayor disponibilidad, a diferencia de los otros aislados en los que los síntomas debido a la infección no eran evidentes. Sin embargo, todas las plantas utilizadas fueron evaluadas por ELISA para confirmar la presencia del virus. Los aislados 133 y 229 se utilizaron para secuenciar regiones de interés y para comparar la variabilidad existente entre ellos y los aislados europeos, cuyas secuencias están disponibles en bases de datos.

2.1.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se trabajó con las cepas de *E. coli* Nova Blue y BL21 (DE3) (Novagen) las cuales se crecieron en medio LB (Sambrook y col., 1989). Los cultivos se suplementaron con ampicilina (LB-Amp) y/o kanamicina (LB-Kan) a una concentración final de 100 mg/l y 50 mg/l, respectivamente.

Para la preparación de placas con medio sólido, al medio LB se le adicionó agar (Difco) a una concentración final de 1.5% (p/v). Las placas se suplementaron con concentraciones finales de X-Gal 80 mg/l, IPTG 500 mM y ampicilina 100 mg/l.

2.2 Oligonucleótidos

2.2.1 Partidores para PCR

Se diseñaron partidores específicos y degenerados basados en la secuencia de aislados de GFLV disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=search&term=gflv>), en publicaciones (Wetzel y col., 2001; Naraghi-Arani, P.y col., 2001; Viry y col., 1993), así como también en base a las secuencias obtenidas durante el desarrollo de esta tesis, de manera de cubrir la totalidad de la zona codificante del genoma de GFLV Ch-80 en relación a la secuencia de aislados europeos publicados previamente (Margis y col., 1993; Ritzenthaler y col., 1991; Serghini y col., 1990; Wetzel y col., 2001).

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR varían entre 18 y 23 bases y su temperatura media de hibridación fue calculada de acuerdo a la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$, según la cual la mayoría de los oligonucleótidos utilizados tiene una T_m de 56°C a 62°C. Estos fueron sintetizados por Invitrogen, en escala de 50 nmoles (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar genes del ARN1 de GFLV Ch-80.

Tm: temperatura de apareamiento; **Fw:** partidores en sentido directo y **Rv:** partidores en sentido inverso.

^a: la ubicación con el número 1 corresponde al primer nucleótido de la zona de lectura de marco abierto.

GFLV Ch-80 ARN1			
Partidores Fw	Secuencia del partidor (5'-3')	Tm	Ubicación (nt)^a
P1626	tga aat cct ttg cga aga gt	56°C	77-94
B12A2F3	taa agc tag cga gtt gcg g	58°C	877-896
002F	acc tct gct tgc tat ctt tg	58°C	1345-1365
B4A3F	gct atg gtt ata gga ggc gt	60°C	1811-1831
B4E26F1	act ggg gag ctt ttc ata cta	60°C	2306-2327
2661F	gtt cag agc ctc gct tgg	58°C	3893-3909
B6A4F	agg tga act ctc tga tgt cg	60°C	5409-5429
B10E25F1	taa gtc tct ttc cac tat tcc	58°C	5953-5974
Partidores Rv			
001R	ctt ggc agc ttc ctc ttc tt	60°C	1046-1066
B4A3R2	agt tca ata gct tca agg ga	56°C	1425-1445
A11E25R1	cct tca tcc atg gga gtg tt	60°C	3043-3063
B2A3R	acg ctc tct act ttg ctt tg	58°C	3521-3541
2661R	cca agc gag gct ctg aac	58°C	3893-3909
2627	agg atg gcg ggc tgc tt	62°C	4773-4789
114681R	cga cat cag aga gtt cac c	56°C	5412-5430
RNA1 3'R	cat tcc tct gat ttg gtc cc	60°C	6615-6635
3' R2	ctg tcg cca cta aaa gca tg	60°C	7240-7260

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar genes del ARN2 de GFLV Ch-80.

Tm: temperatura de apareamiento; **Fw:** partidores en sentido directo y **Rv:** partidores en sentido inverso. Las letras en mayúscula indican las degeneraciones de los partidores.

^a: la ubicación con el número 1 corresponde al primer nucleótido de la zona de lectura de marco abierto.

GFLV Ch-80 ARN2			
Partidores Fw	Secuencia del partidor (5'-3')	Tm	Ubicación (nt)^a
5 NW	atg aaa aat ttt ggt agg ttc tt	58°C	1-23
5 NC	cca aga gtt tA/GA/G gaa act ca	56°C	83-103
B8repF	gcc atc cgg atg ttt tcc tg	58°C	165-185
M2	A/G/CtA/G gat ttt agg ctc aat gg	55°C	1318-1337
V	tga tgc tta taa tcg gat aac ta	56°C	2256-2279
D2CpF	gag tgc tgg gct gac ctt g	62°C	2331-2350
Partidores Rv			
M0	cac tct ttg ccg aat tgc c	60°C	682-701
G0	cag aat tcc ctt acc ctc tc	60°C	879-899
C5movR	tcg gaa tac cat tga gcc taa	60°C	1325-1345
M4	gtA/C atc cac tA/C/G/T tca tac tg	56°C	2151-2171
D2CpR	taa gcc aat gtg gga ctg ac	60°C	2331-2350
A11CpintR	ttc cca atc aac aaa tca gta a	54°C	3324-3446
C	caa ggc aag tgt gtc caa a	58°C	3706-3725

2.3 Vectores plasmidiales para clonamiento y expresión

El vector pGEM-T (Promega), es especialmente diseñado para clonar productos de PCR debido a que posee una timidina en el extremo 5' de cada una de las hebras en el sitio de clonamiento lo que facilita la ligación a segmentos de ADN obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra. Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizaron los vectores: pET-32a (Novagen), que permite producir proteínas recombinantes, fusionadas en el extremo amino terminal a tioredoxina (TRX) de *E. coli* y a un segmento de poli histidina que facilita su posterior purificación; pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences), el cual permite producir proteínas fusionadas a glutatión transferasa (GST) en su extremo amino terminal y también a un segmento de poli histidina para su purificación por cromatografía de afinidad. Finalmente, se utilizó el vector pET-28a (Novagen) para proteínas fusionadas en su extremo amino terminal a una cola de 6 histidinas. Los esquemas de estos plasmidios se muestran en la Figura 3.

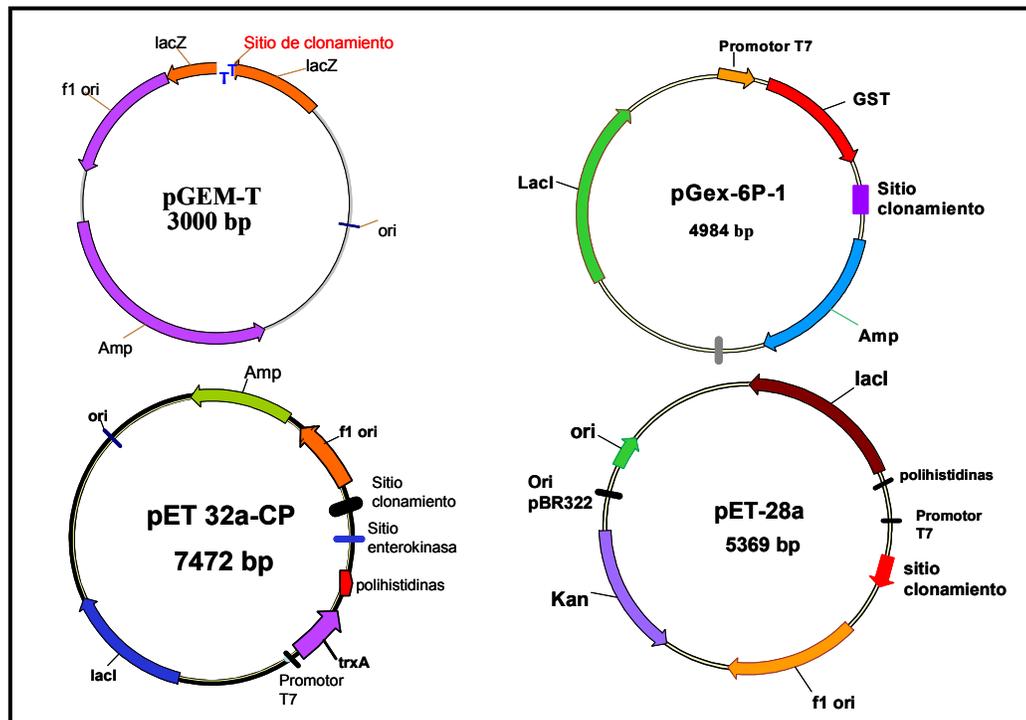


Figura 3. Vectores utilizados en el clonamiento y expresión de genes de GFLV Ch-80

Amp: gen de resistencia a ampicilina; **f1 ori:** origen de replicación para ADN de hebra simple proveniente del fago f1; **ori:** origen de replicación; **lac Z:** región codificante para β -galactosidasa; **lacI:** represor del operón lac; **trxA:** gen de tiorredoxina A de *E. coli*; **promotor T7 lac:** promotor para T7 polimerasa; **Kan:** resistencia a kanamicina; **GST:** gen de Glutación-S-Transferasa de *E.coli*.

2.4 Técnicas de biología molecular

2.4.1 Extracción de ARN total de vides infectadas con GFLV

Se siguió el protocolo de Chang y col., 1993, con las siguientes modificaciones: tejido fresco de floema de *Vitis vinífera* se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en mortero hasta obtener un polvo fino. Luego, se tomaron 100 mg de este polvo y se incubaron con 800 μ l de buffer de extracción (CTAB 2%; PVP K40 2%; Tris HCL 100 mM (pH 8,0); EDTA 25 mM; NaCl 2 M; espermidina 0,5 mg/ml; ácido ascórbico 8 mM y β -mercaptoetanol 2%) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml a 65°C por 3 min con agitación vigorosa cada 1 min. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo:

alcohol isoamílico (24:1), se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12.000 x g por 8 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se repitió el proceso, luego se agregó $\frac{1}{4}$ de volumen de LiCl 10 M y se incubó toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se centrifugó a 12.000 x g por 25 min a 4°C y la pella se resuspendió en SDS al 5%. Se repitió la extracción con cloroformo, se recuperó la fase acuosa y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto (en frío). Se incubó a -80°C por 45 min para precipitar el ARN. Para recuperar el ARN, se centrifugó a 12.000 x g por 25 min y 4°C. La pella se secó y se resuspendió en 50 μ l de agua tratada con DEPC. Las muestras se almacenaron a -80°C.

2.4.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante transcripción reversa

Para estandarizar el protocolo se evaluaron distintas condiciones debido a que la distribución del virus en la planta es variable y por lo tanto no se conoce la cantidad de ARN viral que se tiene en el ARN total extraído de floema de vides infectadas.

Se usaron hexámeros al azar y oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) con diferentes concentraciones de ARN total. La reacción de transcripción reversa se realizó con 50, 100, 150, 250 y 500 ng de ARN total. Luego de evaluar diferentes condiciones se observó que los mejores resultados se obtuvieron según el siguiente protocolo: se mezclaron 50 ng de hexámeros al azar, 500 ng de ARN total y se completó con agua (tratada con DEPC 0,1%) hasta un volumen de 10 μ l. Se llevó a 65°C por 10 min y se colocó en hielo por 5 min. Se agregaron 10 μ l de la siguiente mezcla de reacción: 200 unidades/ μ l de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), 40 unidades/ μ l de

inhibidor de ribonucleasas (RNasin, Promega), tampón RT 5X (Promega) y dNTPs 10 mM. Esta mezcla en un volumen final 20 µl se incubó a 37°C por 60 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso en una reacción de PCR. Todas las soluciones utilizadas en la reacción se prepararon en agua tratada con DEPC al 0,1% y autoclavada 2 veces consecutivas.

2.4.3 Amplificación del ADNc de GFLV por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y clonamiento de los fragmentos obtenidos

La reacción de PCR se realizó mezclando los siguientes componentes: 5 µL de tampón PCR 10X sin Mg⁺²; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 4 µL de mezcla de dNTPs 10 mM; 2,5 µL de una solución 10 µM de cada uno de los oligonucleótidos; 2 a 5 µl de ADNc templado; 0,5 µL de Taq ADN polimerasa 5 unidades/µL (Promega) y se completó a un volumen final de 50 µL con agua miliQ estéril. Los oligonucleótidos utilizados como partidores se diseñaron de acuerdo a las secuencias virales a amplificar. Luego, los tubos se incubaron en un termociclador (modelo PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; 30 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C; 1 min a 54-56°C para apareamiento y 1-2 min a 72°C para extensión. El tiempo de la etapa de extensión varió según el tamaño del fragmento a amplificar, seguido de una etapa de elongación durante 10 min a 72°C.

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit Qiaquick (Qiagen) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

2.4.4 3' RACE

Se realizó 3' RACE (*Rapid Amplification of Complementary Ends*) para la obtención de la hebra complementaria al extremo 3' del ARN, el cual se conoce por la literatura que es poliadenilado. La reacción se realizó utilizando oligo(dT)₁₂₋₁₈ ligado a un adaptador suministrado en el kit "RLM-RACE" (Ambion); el resto del protocolo se siguió igual al de la reacción de transcripción reversa. Para realizar el PCR, se utilizaron los partidores D2CpF (sentido directo) y 3' RACE Outer Primer (sentido inverso, suministrado en el kit), un programa de 30 ciclos, 90 seg de extensión y una T_m de 59°C. El resto de la reacción de PCR se siguió de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

2.4.5 Análisis de ADN y ARN mediante electroforesis en geles de agarosa

Para la electroforesis de ADN y ARN se utilizaron geles de agarosa (Gibco BRL) de una concentración proporcional al tamaño del ácido nucleico a separar (entre 0.8% y 1.5%) en tampón Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM (pH 8,3) (TAE 1X) y una concentración final de bromuro de etidio 0,2 µg/ml. Para esto, las muestras se prepararon con 1:10 de volumen de solución de carga (azul de bromofenol 0,25% P/V y glicerol 50% V/V en Tris 10 mM y EDTA 1 mM (pH 8,0) (TE)). Se utilizó como estándar de peso molecular una mezcla de fragmentos de ADN: λ DNA/Hind III y φX174RF DNA/Hae III (Invitrogen). En el caso de digestiones preparativas para purificar un fragmento a partir de su extracción del gel se utilizó una agarosa de mayor pureza (Seakem GTC agarose; Biowhittaker Molecular Applications).

2.4.6 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Para purificar ADN desde geles de agarosa, se utilizó el kit *Rapid Gel Extraction System* (Omega Biotek). Brevemente, se cortó el segmento de ADN de interés desde un gel confeccionado con agarosa de alta pureza y bajo punto de fusión. Este trozo de agarosa que contiene el fragmento de ADN se colocó en un tubo Eppendorf y se procedió de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante.

2.4.7 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción, se realizó empleando para cada enzima el tampón de reacción recomendado por el fabricante. Se agregó la enzima de restricción en una relación de 1 unidad/ μg ADN a digerir y el volumen final de reacción se completó con agua bidestilada. La mezcla se incubó a 37°C por 1-4 horas y se inactivó la enzima cuando correspondió incubando 10 min a 65°C .

2.4.8 Desfosforilación y purificación de vectores plasmidiales

Los vectores plasmidiales previamente digeridos con endonucleasas de restricción se desfosforilaron para evitar su recircularización. Para esto se utilizó la enzima fosfatasa alcalina de becerro (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. A 5-10 μg de ADN plasmidial previamente cortado, se agregaron 10 μl de la solución 10X suministrada con la fosfatasa, 2 unidades de dicha enzima y agua desionizada hasta completar 100 μl de volumen final. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C . Posteriormente la enzima se inactivó agregando EDTA a una concentración final de 10 mM y se incubó por 15 min a 75°C . Finalmente, se procedió a realizar una

extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 y una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 24:1. El ADN se precipitó a -20°C toda la noche con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

2.4.9 Ligación de un fragmento de ADN a un vector plasmidial

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR o extraídos desde geles de agarosa, se ligaron a los vectores en una relación molar de 1:10 de vector a fragmento. En un tubo se mezclaron 5 µl de tampón 2X (Promega), 10-55 ng de vector, la cantidad necesaria del fragmento de ADN para obtener la razón molar indicada y 1 µl de la enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega). Se completó hasta 10 µl finales con agua bidestilada. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C. El producto de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli*.

2.4.10 Preparación de células competentes de *E. coli*

Células de *E. coli* (Novablue y BL21 (DE3)) se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (5 g/l de triptona; 10 g/l de extracto de levadura (Difco Laboratories) y 10 g/l de NaCl, esterilizado en autoclave). Inicialmente se preparó un inóculo de bacterias en 5 ml de medio LB que se incubó toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm). Al día siguiente, estas bacterias se agregaron a 500 ml de medio LB y se incubó aproximadamente por 2 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8. El cultivo se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 min a 4°C y las células se resuspendieron en 250 ml de NaCl 10 mM frío. Se volvió a centrifugar y resuspender

las células en 250 ml de CaCl₂ 75 mM frío. Se dejó en hielo durante 30 min y se volvió a centrifugar resuspendiendo las células en 15 ml de CaCl₂ 75 mM frío. Para aumentar la eficiencia de transformación las células se dejaron 3 horas en hielo en presencia de 14% de glicerol estéril, se congelaron en mezcla de hielo seco-etanol y se almacenaron a -80°C (BioFreezer Forma Scientific) hasta su uso (Sambrook y col., 1989). Todo el proceso de preparación se realizó bajo campana de flujo laminar para mantener la esterilidad.

2.4.11 Transformación de células competentes de *E. coli*

Luego de descongelar las células competentes en hielo se tomaron 100 µl y se agregaron a un tubo Eppendorf junto con la mezcla de ligación o el plasmidio a introducir en la bacteria. La mezcla se incubó sobre hielo por 30 min, luego se sometió a un shock térmico a 42°C por 1 min y nuevamente se incubó en hielo por 2 min. A continuación se agregaron 900 µl de medio SOC y se incubó en un agitador a 37°C y 200 rpm durante 60-90 min. Posteriormente se centrifugó por 1 min a 2.500 x g, se descartó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 200 µl de medio SOC. Esta suspensión se sembró sobre placas de agar Luria que contienen ampicilina y/o kanamicina como antibiótico. En el caso del vector pGEM-T, se realizó una selección por α-complementación agregando X-GAL e IPTG. Estas placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

2.4.12 Purificación de ADN plasmidial

Para la extracción plasmidial desde células bacterianas, se comenzó con 2-5 ml de cultivo bacteriano crecido toda la noche (8-10 horas con agitación a 37°C). El cultivo se centrifugó a 5.000 x g por 1-2 min para obtener una pella concentrada de bacterias. A partir de esta pella se obtiene el ADN plasmidial siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante del kit (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen).

2.4.13 Secuenciación de ADN

Las muestras purificadas de ADN se secuenciaron según el método de Sanger modificado (Sanger y col., 1977). Se utilizó el kit comercial Bigdye 2.0 (Perkin Elmer) y el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se utilizaron partidores específicos para las secuencias de los vectores que flanquean el inserto como los partidores M13 (sentido) y M13 (antisentido) propios del vector pGEM-T. En algunas ocasiones se utilizaron también los partidores propios de cada gen.

2.4.14 Análisis de secuencias

Para su análisis, las secuencias fueron alineadas, ensambladas y revisadas con el software Vector NTI suite 7.0 (Invitrogen) de manera de cubrir la totalidad de la zona codificante del genoma viral en relación a las secuencias disponibles en internet. La comparación de las secuencias con la base de datos del NCBI se realizó mediante el algoritmo BLASTX (compara la secuencia nucleotídica traducida en sus seis marcos de lectura contra una base de datos de proteínas) para cada uno de los genes. Los

alineamientos múltiples a nivel de secuencias aminoacídicas se realizaron mediante el software Multalin obtenido del sitio Web del INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia; <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>).

2.5 Clonamiento de la región codificante de la proteína de cubierta del aislado GFLV Ch-80

La región de ADN codificante para la proteína de cubierta (CP Ch-80) se amplificó por PCR utilizando partidores diseñados para este objetivo y como templado el ADNc obtenido en la reacción de transcripción reversa. En la región 5' de cada partidor se incorporaron sitios de restricción con el fin de orientar el clonamiento en el vector de expresión. De la misma manera se diseñaron partidores para el clonamiento de la proteína dividida en dos fragmentos (CP Ch-80 α y Cp Ch-80 β ; Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados para el clonamiento de CP Ch-80 en vectores de expresión bacteriana

Se muestran las secuencias de los partidores para la proteína de cubierta recombinante (CP Ch-80) con los sitios de restricción para ser clonado en los diferentes vectores de expresión.

Partidor	Secuencia del partidor (5'-3')	Sitio de Restricción	Vector de Expresión
CP80R1	caa gcg gcc gcc tag act ggg aag ctg gtt c	<i>Not</i> I	pGEX-6P-1 pET-32a
CP80F1	tac cca tgg gcg gat tag ctg gta gag gag t	<i>Nco</i> I	pET-32a
CP80F2	ctg gga tcc gga tta gct ggt aga gga gt	<i>Bam</i> HI	pGEX-6P-1
CP80intF	cgc gga tcc atc ttc tat agt att gtt tta tgg	<i>Bam</i> HI	pGEX-6P-1 pET-32a pET-28a
CP80intR	att gcg gcc gcc tac cat aaa aca ata cta tag aag at	<i>Not</i> I	pGEX-6P-1 pET-32a

El fragmento se amplificó con un programa donde las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94°C, seguidos por 29 ciclos de 1 min de desnaturación a 94°C, 1 min de síntesis a 58°C, 90 seg de extensión a 72°C y como paso final 10 min de elongación a 72°C. El fragmento amplificado se purificó utilizando el kit purificación de PCR Qiaquick (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

El fragmento se clonó en pGEM-T de acuerdo a lo descrito por Promega, luego se liberó mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes, que también se utilizaron para digerir los vectores de expresión. El inserto se purificó y se ligó a los vectores de expresión de acuerdo a lo descrito anteriormente, con lo cual se transformó la cepa Nova Blue de *E. coli* (Novagen). Se seleccionaron colonias y se crecieron en 5 ml de medio LB-Amp para realizar la extracción del ADN plasmidial (Qiagen) y verificar la presencia del inserto mediante análisis de restricción. Los plasmidios recombinantes obtenidos se utilizaron para transformar la cepa de expresión BL21 (DE3; Novagen).

2.6 Expresión de la proteína de cubierta CP Ch-80 en *E. coli*

La proteína de cubierta del aislado GFLV Ch-80 se expresó en células *E.coli* BL21 (DE3), para lo cual 50 ml de medio LB-Amp se inocularon con cultivo bacteriano fresco al 0,5% correspondiente a cada clon. La mezcla se incubó a 37°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.5-0.7 a una longitud de onda de 600 nm. Cuando se alcanzó esta lectura, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM. Se continuó con agitación durante un tiempo de 1 a 3 horas. Para evaluar la cinética de inducción, se tomaron muestras de 1 ml antes de

agregar el inductor y cada hora posterior a la inducción hasta completar 3 horas. Una vez que se recolectaron todas las muestras a analizar, estas se centrifugaron por 3 min a 5.000 x g. La pella de bacterias obtenida se resuspendió en 200 µl de PBS 1X con PMSF 1 mM y se sonicó con 3 pulsos de 15 seg cada uno. Los extractos obtenidos se centrifugaron por 10 min a 15.000 x g y 4°C con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble. Ambas fracciones se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes.

2.7 Purificación de la proteína recombinante CP Ch-80

2.7.1 Columna de afinidad Ni-agarosa

Los 45 ml de cultivo bacteriano restante del estudio de la cinética de inducción, se centrifugaron por 10 min a 5.000 x g. La pella bacteriana obtenida se resuspendió en 4 ml de PBS 1X con PMSF 1mM y se sonicó con 3 pulsos de 1 min cada uno. Los extractos obtenidos se centrifugaron por 15 min a 15.000 x g y 4°C con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble. El contenido proteico de la fracción soluble se cuantificó utilizando el kit Micro BCA (Pierce). Cuando la proteína recombinante se obtuvo en la fracción insoluble, se determinó su solubilidad en soluciones crecientes de urea (1-8 M). Para esto se resuspendió en paralelo la pella correspondiente a 200 µl del producto sonicado con 1 ml de una solución con cantidades crecientes de urea 1-8 M en Tris 50 mM (pH 8,0). Se centrifugaron y se cargaron 20 µl del sobrenadante en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes para verificar la solubilidad. Las proteínas recombinantes solubilizadas en urea se purificaron utilizando la resina de níquel agarosa Ni-NTA His-Bind

(Novagen) según las indicaciones entregadas por el fabricante. Esta resina tiene alta afinidad por un segmento de polihistidina presente en la proteína de fusión. La proteína insoluble se mantuvo durante todo el proceso de purificación en presencia de la cantidad de urea necesaria para mantenerla soluble. Las proteínas fueron eluidas de la columna con concentraciones crecientes de imidazol (20-500 mM).

2.7.2 Lavados con urea y solubilización con SDS

Este proceso se realizó en el caso del clonamiento de la proteína CP Ch-80 cuando esta no se solubilizo en urea. El método se basó en hacer lavados sucesivos con urea en distintas concentraciones para arrastrar todas las proteínas solubles y dejar la proteína de interés libre de contaminación con otras proteínas. De la misma manera que en el punto anterior, los 45 ml de cultivo bacteriano restante del estudio de la cinética de inducción, se centrifugaron por 10 min a 5.000 x g. La pella bacteriana obtenida se resuspendió en 4 ml de PBS 1X con PMSF 1mM y se sonicó con 3 pulsos de 1 min cada uno. Los extractos obtenidos se centrifugaron por 15 min a 15.000 x g y 4°C con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble. Se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados sucesivos de la pella con soluciones: NaCl 1 M; Urea 2-6 M; Tris 50 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM, para terminar con la solubilización en una solución Tris 50 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM y SDS 0,3-1%. En esta última etapa las muestras se calentaron a 70°C en baño maría, se enfriaron y centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min, con repetición de dos veces cada solución. Se colectaron alícuotas en cada etapa del proceso para cargarlas en

gel de poliacrilamida 12,5% en condiciones desnaturalantes y analizar la solubilidad de la proteína de interés.

2.8 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras proteicas a analizar se diluyeron en 1 volumen de solución de carga (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8); glicerol 10%; SDS 3%; azul de bromofenol 0,00125%; β -mercaptoetanol 5%) y fueron hervidas por 5 min. Se cargaron en gel de poliacrilamida al 12,5%. Los geles de poliacrilamida-SDS se realizaron con una porción concentradora (Tris-HCl 0,5M (pH 6,8); SDS 0,4%; bis-acrilamida 4,5%; TEMED 0,3%; PSA 0,3%) y una separadora (Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); SDS 0,4%; bis-acrilamida 12,5%; TEMED 0,3%; PSA 0,3%). La solución de corrida del gel correspondió a tris-glicina (tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 volts hasta que el frente de corrida cayó del gel, aproximadamente 2 horas. Como referencia se cargó también un estándar de proteínas preteñido (Benchmark ladder, Invitrogen). Posteriormente, el gel se incubó en solución de tinción (ácido acético glacial 10%; metanol 45%; azul de coomassie 0,25%) durante 20-30 min con agitación. Luego se eliminó el exceso de colorante mediante lavados sucesivos en solución de desteñido (ácido acético glacial 10% y metanol 45%).

2.9 Obtención de anticuerpos policlonales

2.9.1 Inmunización de conejos con la proteína recombinante y obtención de anticuerpos policlonales

Los conejos se inyectaron intramuscularmente con aproximadamente 300-500 μg de proteína en 200 μl de una emulsión con adyuvante de Freund en proporción 1:1. Esta cantidad de proteína se obtuvo al cortar la banda desde geles de poliacrilamida al 12,5%. La primera inmunización se realizó con adyuvante de Freund completo y los refuerzos cada 15 días se realizaron con adyuvante de Freund incompleto. La sangría se realizó 10 días después de la quinta inmunización y se evaluó la producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en el suero del conejo mediante ELISA y *Western Blot*. El procedimiento para la obtención de anticuerpos policlonales fue realizado en colaboración con Juani Bustamante, BiosChile IGSA.

2.9.2 Preparación de anticuerpos policlonales mediante el uso de péptidos sintéticos

Los anticuerpos policlonales obtenidos con péptidos sintéticos (Peptide, INC, USA) se desarrollaron en colaboración con Juana Bustamante, BiosChile IGSA. Para esto, primero fue necesario realizar el acoplamiento de los péptidos a una proteína transportadora. Esto se realizó por el método de glutaraldehído, según el cual se tomaron 800 μg de transportador (hemocianina de loco, *Concholepas concholepas*, Biosonda) y se disolvieron en 800 μl de solución citrato de sodio 0,05 M (pH 6,5). Luego se tomaron 800 μg de cada mezcla de péptidos, previamente disueltos en 800 μl de la misma solución. Se mezclaron ambos volúmenes y se agregó glutaraldehído grado microscopía electrónica a una concentración final de 0,1%. Se incubó por una

hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se realizó una diálisis en membrana con tamaño de poro 14 kDa, previamente hervida en agua destilada por 5 min. Se hicieron 5 cambios de 500 ml con una solución PBS 1X cada una hora. Las muestras se congelaron a -20°C.

Se inyectó en conejos una mezcla de los péptidos acoplados al transportador en cinco dosis de 250 µg cada una. Las dosis se suministraron cada 14 días, luego de la tercera dosis se evaluó el título en suero contra péptidos acoplados a seroalbúmina de bovino (BSA) por ELISA y luego de la quinta dosis se sangraron los conejos y se evaluó nuevamente el título mediante ELISA y *Western Blot* utilizando una fracción de la proteína recombinante purificada como antígeno.

En la Tabla 6 se muestra la secuencia de los péptidos seleccionados y su ubicación en la proteína.

Tabla 6. Secuencia aminoacídica de los péptidos sintéticos diseñados para el desarrollo de anticuerpos policlonales anti GFLV Ch-80

Péptido	Secuencia	Largo	Ubicación(aa)
FL1	KIRSPYHRTPAR	12 aa	279-293
FL2	PKDCQANRY	9 aa	10-19
FL3	REEIEIGSRFFK	12aa	359-371
FL4	DAYNRITSRITK	12 aa	71-81
FL5	QWSLNTEFGKSS	12 aa	405-416
FL6	DWNELFKYPG	10 aa	260-269

2.9.3 Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA

Placas de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con un bioadhesivo obtenido de la cholga *Aulacomya ater* (Burzio y col., 2000). A cada pocillo se agregaron 50 µl de una solución con 3 µg/µl de adhesivo y se incubó durante 30 min a temperatura

ambiente. Después de eliminar esta solución la placa se secó durante 30 min a 37°C. Para activar la placa, a cada pocillo se agregaron 50 µl de una suspensión con 10 µg/µl de proteína recombinante en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Los sitios inespecíficos se bloquearon agregando 350 µl de solución de bloqueo (caseína-sacarosa al 2% en PBS), e incubando por 1 hora a 4°C. Posteriormente la placa se secó durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 50 µl de los sueros a analizar en diluciones seriadas desde 1:4 hasta 1:36, en solución de bloqueo. La placa se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C y posteriormente los pocillos se lavaron con Tween 20 al 0,02% en PBS tres veces durante 5 min cada vez. A continuación a cada pocillo se agregaron 50 µl de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina desarrollado en cabra (KPL) al 0,1% en solución de bloqueo. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces por 5 min con Tween 20 al 0,02% en PBS, se agregó a las placas 50 µl de solución FAL (NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; Tris 100 mM (pH 9,5)) en presencia de 1 mg/ml del sustrato para-nitrofenilfosfato (p-NPP). Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C y la reacción enzimática se detuvo agregando 50 µl de NaOH 3 N en cada pocillo. La absorbancia se determinó en un lector de placas de ELISA de 96 pocillos (Titertek Multiskan Plus MK II) con un filtro de 405 nm.

Para el análisis de muestras de vides infectadas se utilizaron kits comerciales de ELISA (Agritest), de manera de descartar la infección por otros virus distintos a GFLV. Este trabajo se realizó en colaboración con el Ing. Agrónomo Nicola Fiore, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile.

2.9.4 Análisis de anticuerpos mediante *Western blot*

Las proteínas a analizar se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalantes en un gel de poliacrilamida al 12,5% y luego se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (100 volts por 60 minutos en frío) en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1% (pH 8,0) y metanol al 20%). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% durante 1 hora. Luego se incubó con el primer anticuerpo (policlonal) diluido 1:300 en una solución con leche descremada al 5%, TBS-Tween 20 al 0,02% y la mezcla se incubó durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó 3 veces durante 10-15 min cada una con TBS-Tween 20 al 0,02% y agitación. A continuación se incubó por una hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo diluido 1:2.000, en leche descremada al 2,5%, TBS-Tween al 0,01%) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Se lavó nuevamente 3 veces. Para el revelado, las membranas se sumergieron en una solución tampón con 33 μ l de BCIP (50 mg/ml) y 66 μ l de NBT (50 mg/ml) en tampón FAL, hasta la aparición de las bandas, luego se sumergieron en tampón de detención (EDTA 2 mM, Tris 20 mM (pH 7,4)) y las membranas se lavaron con agua destilada.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis de muestras de tejido de vides infectadas con GFLV

Luego de analizar mediante ELISA, las muestras de vides infectadas provenientes de las regiones: Metropolitana, V y VI de Chile de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, se confirmó la presencia de GFLV y se descartó la infección por los virus: *Grapevine Leafroll-associated Virus 1, 2 y 3* (GLRaV-1, 2, 3), *Grapevine Virus A* (GVA), *Grapevine Virus B* (GVB), *Grapevine Fleck Virus* (GFkV), *Arabis Mosaic Virus* (ArMV), *Strawberry Latent Ringspot Virus* (SLRSV) y *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV), los cuales en condiciones naturales, pueden coexistir en la planta infectando distintos tipos de tejidos según el tipo de virus. Plantas de *Vitis vinífera* resultan susceptibles a estos virus, no existiendo por lo tanto resistencia natural a la infección por estos patógenos. Los resultados indicaron que las plantas posiblemente estaban infectadas sólo con GFLV para ser utilizadas como material de inicio en la extracción de ARN total. En la Figura 4 se muestra una planta infectada con el aislado chileno GFLV Ch-80 con claros síntomas de la infección. Por su agresividad, evidenciada en el fenotipo de las plantas infectadas, GFLV Ch-80 se seleccionó para secuenciar completamente su genoma durante el desarrollo de este trabajo de tesis.



Figura 4. Fotografía de una planta infectada con GFLV Ch-80
Se evidencian síntomas de mosaico amarillo en la lámina de las hojas.
Fotografía: Esteban Engel.

3.2 Extracción de ARN total de vides infectadas con GFLV

El ARN total se purificó según lo descrito en Materiales y Métodos desde dos tipos de tejido: hoja y floema. El protocolo seleccionado incluyó agentes que permiten evitar la oxidación de compuestos fenólicos y la contaminación con polisacáridos, permitiendo la obtención de ARN puro. La pureza, medida a través de la razón Abs_{260}/Abs_{280} , fue del orden de 1,7 en todos los casos (datos no mostrados). El ARN total obtenido de tejido enriquecido en floema mostró menor degradación que el de hoja, probablemente debido a que el material de hoja presentó manchas necróticas lo cual interfiere en la obtención de un ARN íntegro (Figura 5). El ARN de floema de vides infectadas con GFLV se utilizó como material de inicio en los experimentos de RT-PCR.

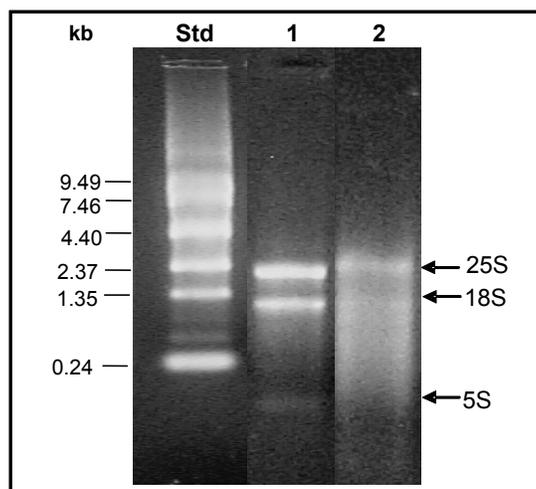


Figura 5. Análisis de ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa

1: ARN total purificado a partir de floema. **2:** ARN total purificado a partir de hoja. **Std:** estándar de ARN en kilobases (kb). Gel es al 1,5 % y es teñido con bromuro de etidio.

3.3 Preparación y clonamiento de ADNc viral

3.3.1 RT-PCR

Con el objeto de obtener ADNc para ser utilizado como templado en la amplificación por PCR de distintos fragmentos del genoma de GFLV, se evaluaron distintas condiciones para optimizar el protocolo de transcripción reversa a partir de ARN total de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Como resultado de este estudio, para la síntesis de ADNc se usaron hexámeros al azar y 500 ng de ARN total.

En un paso siguiente se diseñaron partidores (específicos y degenerados) para amplificar distintas zonas del genoma de GFLV Ch-80 basados en las secuencias de un aislado francés F13 (Serghini y col., 1990 y Ritzenthaler y col., 1991) y un aislado alemán NW (Wetzel y col., 2001). Estos partidores se utilizaron para amplificar, por

PCR, fragmentos del genoma de GFLV, usando como templado el ADNc de GFLV Ch-80, lo que permitió secuenciar una parte de éste.

La estructura y organización del genoma de los nepovirus está descrita en la literatura (Matthew's, 2002). Basándonos en esta información y debido a que uno de nuestros objetivos consistió en secuenciar el genoma completo de GFLV Ch-80, se utilizaron técnicas que permitieran secuenciar desde los extremos 5' y 3' UTRs. Se realizó 3' *RACE* usando oligo(dT)₁₂₋₁₈, ya que el genoma de estos virus es poliadenilado en su extremo 3' UTR. Para el extremo 5' se diseñó un partidoro degenerado (5'NW) tomando la secuencia desde el nucleótido 1 de la zona codificante del aislado alemán (NW) (Wetzel y col., 2001). Con las secuencias obtenidas, posteriormente se diseñaron partidores específicos (Materiales y Métodos, Tablas 3 y 4) de manera de cubrir la zona codificante del genoma de GFLV Ch-80.

Los fragmentos obtenidos por la reacción de PCR con estos partidores fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa para confirmar el tamaño esperado para cada uno de los fragmentos (Figuras 6 y 7). Luego fueron clonados en el vector pGEM-T y secuenciados para su posterior ensamblaje tanto para el caso del ARN2 como del ARN1. La decisión de clonar antes de secuenciar los fragmentos nos permitirá mantener la genoteca para posteriores trabajos de investigación en el laboratorio.

Finalmente, se obtuvieron las secuencias del ARN1 y ARN2 de GFLV Ch-80 las cuales cubren la totalidad de la zona codificante desde el ATG correspondiente al codón de inicio hasta el codón de término.

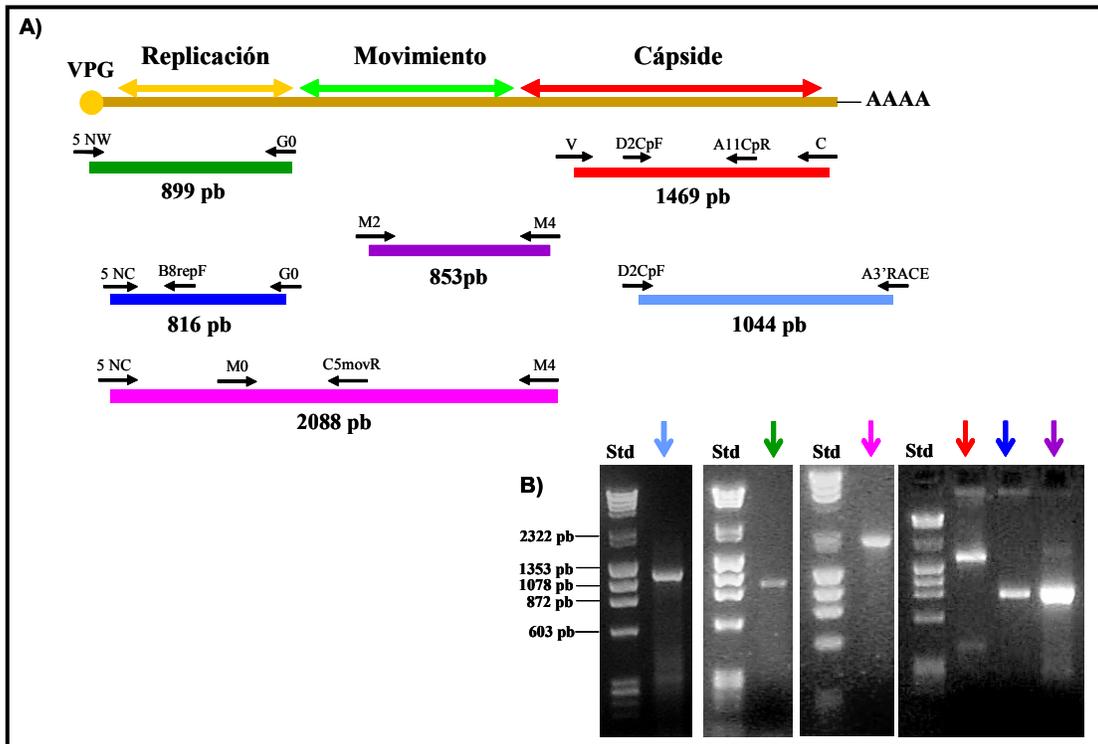


Figura 6. Amplificación de fragmentos del ARN2 de GFLV Ch-80 mediante RT-PCR

Esquema de los fragmentos amplificados del ARN2 de GFLV Ch-80 utilizando partidores específicos (flechas negras) **(A)** y separación de los fragmentos clonados por electroforesis en geles de agarosa 1,5% **(B)**. Se muestran los productos de RT-PCR clonados en el vector pGEM-T. ● : banda de 1044 pb; ● : 899 pb; ● : 2088 pb; ● : 1469 pb; ● : 816 pb y ● : 853 pb. **Std**: estándar de ADN en pares de bases (pb).

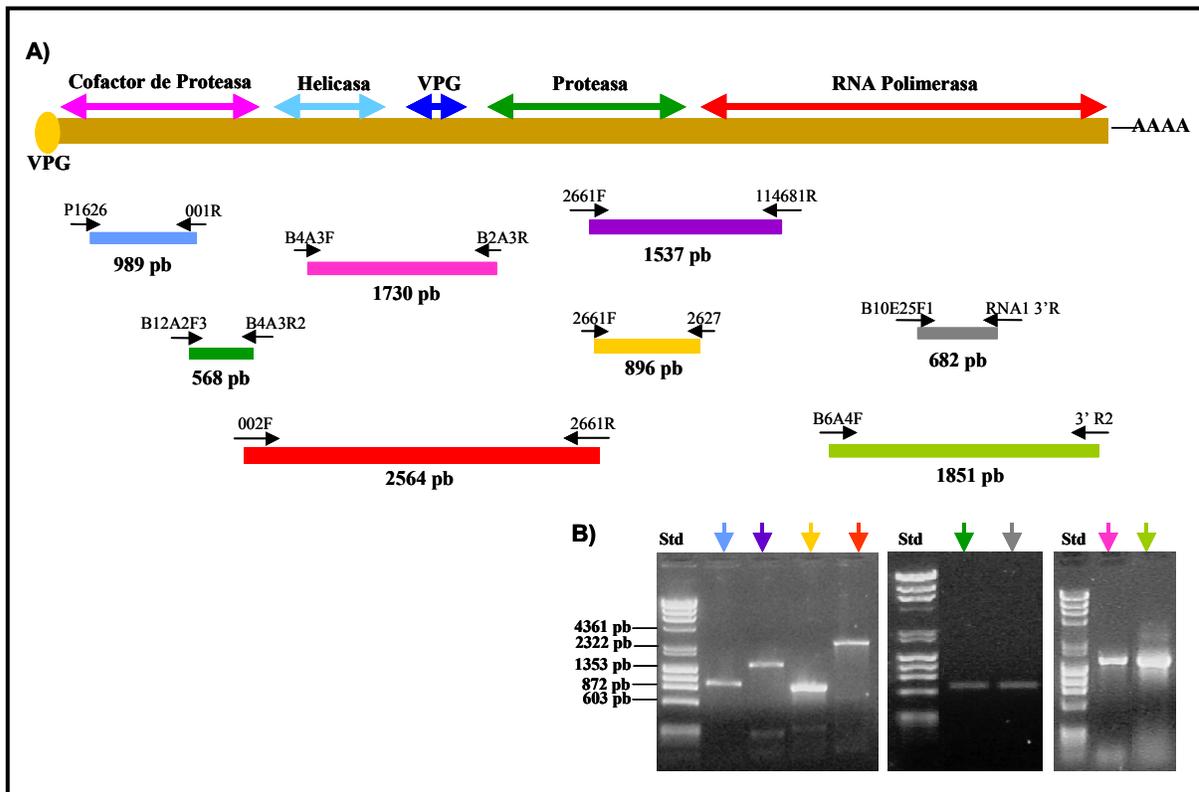


Figura 7. Amplificación de fragmentos del ARN1 de GFLV Ch-80 mediante RT-PCR

Esquema de los fragmentos amplificados del ARN1 de GFLV Ch-80 utilizando partidores específicos (flechas negras) **(A)** y separación de los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa 1,5% **(B)**. Se muestran los productos de RT-PCR clonados en el vector pGEM-T. ● : banda de 989 pb; ● :1537 pb; ● : 896 pb; ● : 2564 pb; ● : 568 pb; ● : 682 pb; ● :1730 pb y ● :1851 pb. **Std**: estándar de ADN en pares de bases (pb).

3.4 Secuenciación del genoma viral

Los clones recombinantes obtenidos en la genoteca se secuenciaron en ambas direcciones de tal manera que se pudo confirmar en forma certera la secuencia de los fragmentos clonados. Los fragmentos secuenciados se ensamblaron usando el programa Vector NTI suite 7.0 (Invitrogen) el cual ensambla por solapamiento de bases. En nuestro caso este procedimiento se realizó con una restricción de

identidad de 15 nucleótidos en los extremos de cada una de las secuencias sobrelapadas.

Las secuencias ensambladas corresponden a un marco de lectura abierto de 6.854 nucleótidos para el ARN1 y 3.324 nucleótidos para el ARN2, codificantes para las poliproteínas virales P1 y P2, respectivamente.

En la secuencia del ARN2 está contenida la región codificante para la proteína de cubierta viral (CP Ch-80) cuyo tamaño es de 1.515 nucleótidos, con un peso molecular teórico de 56 kDa, siendo ésta uno de nuestros objetivos de estudio.

El gen de la proteína CP Ch-80 fue clonado en dos mitades (CP Ch-80 α y CP Ch-80 β) y las proteínas se expresaron en *E. coli* (BL21 (DE3)); para lo cual su secuencia fue previamente confirmada en perfecto marco de lectura y en el tamaño esperado.

La secuencia de CP Ch-80 también se utilizó en la selección de péptidos de 9-12 aminoácidos de largo en las zonas de mayor hidrofiliidad (Tabla 6), con la idea de fabricar péptidos sintéticos, los cuales junto con las proteínas recombinantes (CP Ch-80 α y CP Ch-80 β) se utilizaron en la producción de anticuerpos policlonales.

En la Figura 8 se presentan las secuencias del gen y de la proteína de CP Ch-80 en nucleótidos y aminoácidos, respectivamente; así como también los péptidos seleccionados.

```

5' ggattagctggttagaggagtggctctatatcccaaaggattgccaggcaaataggacttg
  G L A G R G V V Y I P K D C Q A N R Y L
ggcaccctgaacatacgtgatatgatttcagactttaaggggtgccagtatgaaaagtgg
  G T L N I R D M I S D F K G V Q Y E K W
ataactgcaggattagttatgcctacctttaaggtagttgtaggtacctgcaaatgct
  I T A G L V M P T F K V V V R L P A N A
ttcactggattgacgtgggtgatgacctttgatgcctataaccggataactagtagaatc
  F T G L T W V M S F D A Y N R I T S R I
actgctagtgcatcctgtatacacccctgtcagtoaccacattggcttatccaccataag
  T A S A D P V Y T L S V P H W L I H H K
ttgggcacgttttcatgtgaaatagactatggagaattgtgtggctcatgctatgtggttt
  L G T F S C E I D Y G E L C G H A M W F
aagtccacaacatttgaatctccgagactacattttacgtgtttaacgggcaacaacaaa
  K S T T F E S P R L H F T C L T G N N K
gagctagcggcagactggcaagctgctcgcgagctatatgctgaattggaagcctacc
  E L A A D W Q A V V E L Y A E L E E A T
acttttcttgggaagccaacttttggtttttgatccagggtgtttttaatggcaaatccaa
  T F L G K P T L V F D P G V F N G K F Q
tttcttacttgccctcccataatttttgacctaacagccgctcacggctcttaagagtgtc
  F L T C P P I F F D L T A V T A L K S A
gggctgaccttgggacaagttccgatggttgggtactaccagagtttataacctaaatagc
  G L T L G Q V P M V G T T R V Y N L N S
actcttgtagttgtgttttgggtatgggaggtactattagaggaaaggtacactctgt
  T L V S C V L G M G G T I R G K V H I C
gcgccaatcttctatagatttgggtttgatgggtgttagtgagtggaacgggaccactatg
  A P I F Y S I V L W V V S E W N G T T M
gattggaatgaacttttcaagtatcccggggtgatgtggaagaagatgggagttttgaa
  D W N E L F K Y P G V Y V E E D G S F E
gtcaagattcgtctccatataccccaacgctgctagattgcttgctggtcaaagtcag
  V K I R S P Y H R T P A R L L A G Q S Q
agggacatgagctctctaaatttctatgcaatagcaggaccatcgctccatcgggtgag
  R D M S S L N F Y A I A G P I A P S G E
accgcacaacttctattgttgtacagattgatgaaattgtgcccagactcttcttta
  T A Q L P I V V Q I D E I V R P D L S L
ccaagtttgaagatgactattttgtgtgggtggatttttctgagttcacccttgataga
  P S F E D D Y F V W V D F S E F T L D R
gaagaaattgagattggttctcgtttctcgatttcacatcaaatactgtagagtgctc
  E E I E I G S R F F D F T S N T C R V S
atgggagaaaatccgtttgtgcaatgattgcttgatgattgcatagtggtgttttg
  M G E N P F A A M I A C H G L H S G V L
gacctcaagctccaatggagctgaacaccgaatttggcaagagcagcgggagcgtaac
  D L K L Q W S L N T E F G K S S G S V T
atcacgaagctggtgggtgataaagccaggggtctggacggaccttctcaggtttttgcc
  I T K L V G D K A R G L D G P S Q V F A
atgcaaaagctagaggggaattactgatttgttgattgggaattttgcaggagcaaacccg
  M Q K L E G I T D L L I G N F A G A N P
aatacacatttctctctatagccggtggatggcaattaaattggaccaagcaaagagt
  N T H F S L Y S R W M A I K L D Q A K S
attaaggtactcgtggttttgtgcaagcctcgtccgggtttcagttttatggaagaacc
  I K V L R V L C K P R P G F S F Y G R T
Agcttcccagttctag 3'
  S F P V -

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica del gen estructural y secuencia aminoacídica de la proteína CP Ch-80

Se muestra la secuencia en nucleótidos (negro) y aminoácidos (rojo). Las cajas amarillas contienen la secuencia de los péptidos seleccionados para la fabricación de anticuerpos. Las flechas verdes indican la división entre CP Ch-80 α y CP Ch-80 β . El gen consta de 1.515 nucleótidos y la proteína correspondiente de 505 aminoácidos. Está localizado en el extremo C-terminal del ARN2 de GFLV.

3.5 Análisis de secuencias

Al inicio de esta tesis se contaba con las secuencias publicadas de dos aislados europeos de GFLV (Serghini y col., 1990; Ritzenthaler y col., 1991 y Wetzel y col., 2001). Estas secuencias sirvieron de base en el diseño de partidores en zonas conservadas del genoma viral, y también para nuestros análisis posteriores de alineamientos de éstas secuencias con las obtenidas en nuestro laboratorio para los distintos aislados chilenos de GFLV.

Al analizar las secuencias parciales del genoma viral obtenidas de aislados chilenos de diferentes zonas geográficas de Chile, se observó que la homología a nivel de secuencias de nucleótidos es del orden de 90%, según análisis realizados utilizando el programa Multalin. En la Figura 9 se puede observar el alineamiento de un segmento genómico de los aislados chilenos Ch-229 (VI Región), Ch-133 (V Región) y Ch-80 (Región Metropolitana), correspondiente a una porción codificante para la proteína de movimiento. En ella, de las 60 diferencias observadas en la secuencia nucleotídica, para un total de 399 nucleótidos, 53 corresponden a cambios en el tercer nucleótido de cada codón y esto se traduce, la mayoría de las veces, en cambios por el mismo grupo aminoacídico. En la Figura 10 se presenta la secuencia traducida de esta porción de la proteína donde la comparación a nivel de aminoácidos nos muestra una identidad de 91%, de acuerdo a alineamientos realizados con el programa Vector NTI suite 7.0.

Con la información obtenida se pudo comprobar que la homología que existe a nivel del ARN2 entre el aislado chileno (Ch-80) y los aislados europeos (F13 y NW), es extrapolable a lo que ocurre entre aislados chilenos (Ch-80; Ch-229 y Ch-133). En la

Tabla 7 se pueden observar los porcentajes de identidad obtenidos al comparar una región codificante para la proteína de movimiento entre aislados chilenos y entre éstos y aislados europeos.

Análisis comparativos de secuencias nucleotídicas del ARN2 de GFLV Ch-80 y de aislados de otros países muestran una identidad aproximada del 90%. A nivel de secuencias de aminoácidos, la proteína de cubierta viral CP Ch-80 tiene una identidad aproximada del 93% al compararla con sus homólogos de Austria (acceso GeneBank: AAA80464), China (acceso GeneBank: CACA2880), Alemania (acceso GeneBank: Q91HK5), y Francia (acceso GeneBank: X16907.1). Estos resultados se obtuvieron realizando alineamientos entre las secuencias mencionadas usando el programa Vector NTI suite 7.0 (Figura 11).



Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de CP Ch-80 y de la CP de aislados de otros países

El alineamiento se realizó con el programa Vector NTI suite 7.0 y muestra una identidad de 92,7%. Amarillo: 100% identidad, Verde: 50% de similitud, Blanco: 20% identidad y Azul: aminoácidos conservados. Los números de acceso a GeneBank son: AAA80464 (Austria); CACA2880 (China); Q91HK5 (Alemania) y X16907.1 (Francia).

3.6 Clonamiento y expresión del gen CP Ch-80 en *E. coli*

Una vez que se confirmó la existencia de un marco de lectura abierto en la secuencia de la zona codificante del ARN2 de GFLV Ch-80, se procedió a diseñar partidores complementarios a los extremos del gen de CP Ch-80 completo, esto con la intención de amplificar la zona codificante para la proteína de cubierta viral desde ADNc de vides infectadas con GFLV Ch-80. Los partidores sentido y antisentido poseen en sus extremos los sitios de restricción necesarios para clonar la CP Ch-80 en los diferentes vectores de expresión (ver Tabla 5).

Inicialmente, la proteína se clonó en el vector p-GEX-6P-1 y se realizó la inducción en *E. coli* con resultados muy poco reproducibles, ya que sólo una vez se obtuvo la síntesis de la proteína con el tamaño esperado. Debido a esto, el clon se envió a secuenciar para asegurarnos de no tener errores de inserciones y/o deleciones, debido a la *Taq* polimerasa en la reacción de PCR. Este análisis, realizado dos veces, indicó una región codificadora aparentemente intacta, sin codones de término o interrupciones en su marco de lectura. Como consecuencia, se probaron distintas variaciones en el protocolo para favorecer la expresión, tales como: disminuir la temperatura de inducción y aumentar el tiempo (por ejemplo, 14 hrs a 30°C), agregar el inductor (IPTG) a una densidad óptica del cultivo menor a lo habitual (0.4-0.5 en lugar de 0.5-0.7, a una D.O. de 600 nm), agregar glucosa al medio de cultivo con el fin de disminuir la expresión basal de proteínas. Sin embargo en todos los casos los resultados fueron negativos (estos datos serán discutidos más adelante).

Alternativamente, y bajo la hipótesis que la falta de expresión de la proteína completa pudiera deberse a una posible toxicidad a la bacteria, se diseñaron partidores para la

expresión de la proteína recombinante en dos fragmentos de: 27 kDa, a la cual denominamos arbitrariamente CP Ch-80 α y 29 kDa, denominada CP Ch-80 β (Figura 8). Los productos amplificados por PCR fueron purificados y posteriormente clonados en el vector pGEM-T. Los clones positivos se identificaron por digestión con endonucleasas y por secuenciación (Figura 12). Una vez confirmada la secuencia se procedió con una digestión preparativa del ADN plasmidial, utilizando las enzimas de restricción correspondientes a los sitios de restricción codificados en los partidores, de manera de liberar solamente los fragmentos codificantes para las proteínas CP Ch-80 α y CP Ch-80 β . Los genes obtenidos con tamaños de 750 pares de bases para CP Ch-80 α y 790 pares de bases para CP Ch-80 β se purificaron desde geles de agarosa y se ligaron a los vectores de expresión bacteriana: pGEX 6P-1, pET-32a y pET-28a, previamente digeridos con las mismas enzimas de restricción. Células de *E. coli* Novablue se transformaron con esta mezcla de ligación y los clones recombinantes obtenidos para cada gen se identificaron por análisis con enzimas de restricción, confirmándose la presencia del fragmento de ADN esperado en geles de agarosa. En la Figura 13 se observan las digestiones realizadas a los vectores de expresión para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β en el caso de pGEX 6P-1 y CP Ch-80 β para pET-32a y pET-28a. De esta manera se pudo demostrar el correcto clonamiento en los vectores de expresión. En paralelo se confirmó la correcta inserción de los genes, secuenciando los plasmidios recombinantes que contenían cada uno de los genes en estudio.

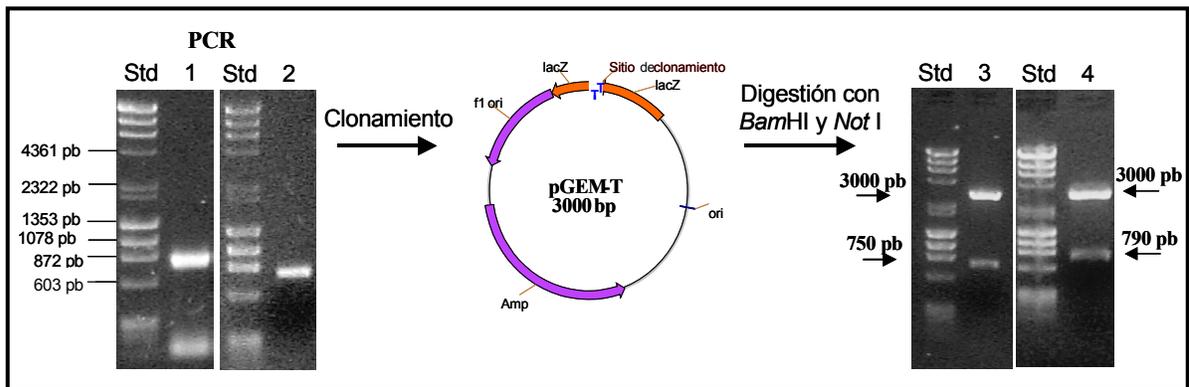


Figura 12. Esquema de la amplificación de la región que codifica para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β mediante PCR y clonamiento en el vector pGEM-T

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T y se utilizaron para transformar *E. coli*. Se observa además por electroforesis en geles de agarosa al 1%, la liberación de los fragmentos de restricción de 750 pb y 790 pb desde los vectores pGEM-T recombinantes. **1** y **2**: amplificados correspondientes a la región codificadora para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β , respectivamente; **3** y **4**: fragmentos de restricción liberados con las enzimas *Bam* HI y *Not* I correspondientes a CP Ch-80 α y CP Ch-80 β , respectivamente; **Std**: estándar de ADN en pares de bases.

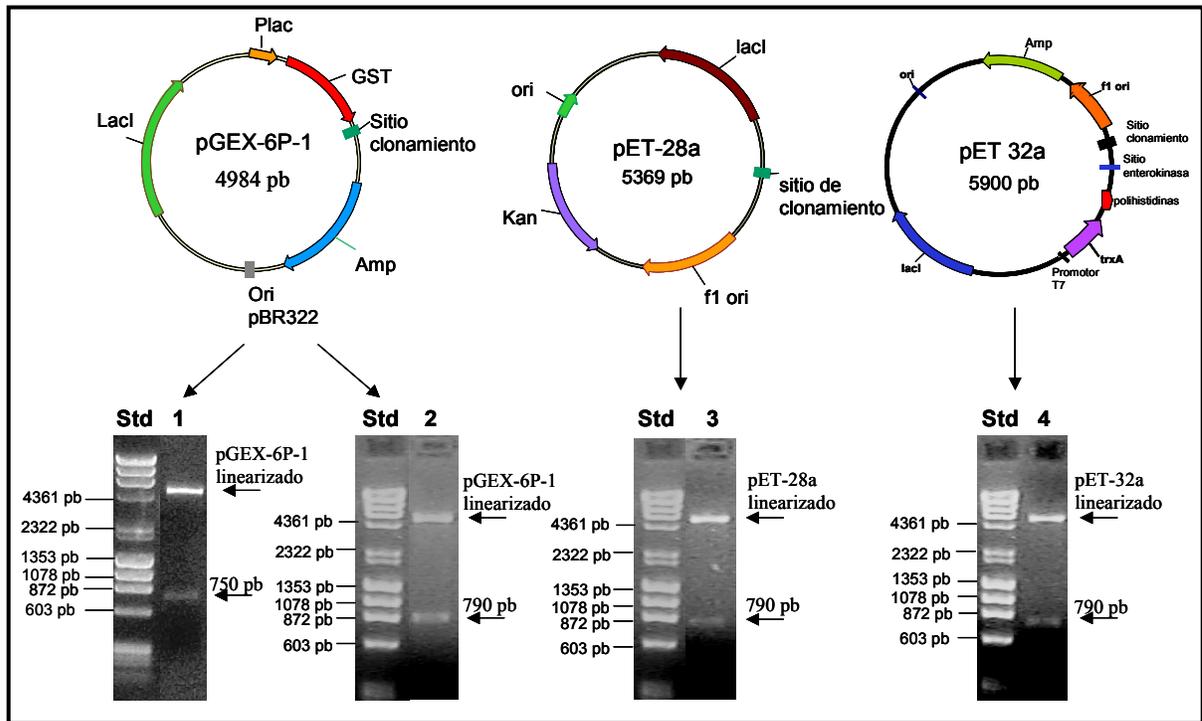


Figura 13. Esquema del clonamiento de la región que codifica para CP Ch-80 α y CP Ch-80 β en los diferentes vectores de expresión y análisis de la digestión enzimática de los clones mediante electroforesis en geles de agarosa

1 y 2: clonamiento de CP Ch-80 α y CP Ch-80 β , respectivamente, en el vector pGEX-6P-1; **3 y 4:** clonamiento de CP Ch-80 β en los vectores pET-28a y pET-32a, respectivamente. Se confirmó la correcta inserción de estos genes en los vectores mediante digestión enzimática con *Bam* HI y *Not* I para cada caso. La liberación de fragmentos de ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Una vez obtenidos los clones recombinantes correspondientes a CP Ch-80 α y CP Ch-80 β en el vector pGEX-6P-1 y CP Ch-80 β en pET-28a y pET-32a, se procedió a transformar con estos vectores la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*.

Cultivos bacterianos que contenían las cepas recombinantes se indujeron con IPTG de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos y se analizó la expresión de las proteínas recombinantes en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. Se observó una expresión abundante luego de tres horas desde el inicio de la inducción (Figura 14).

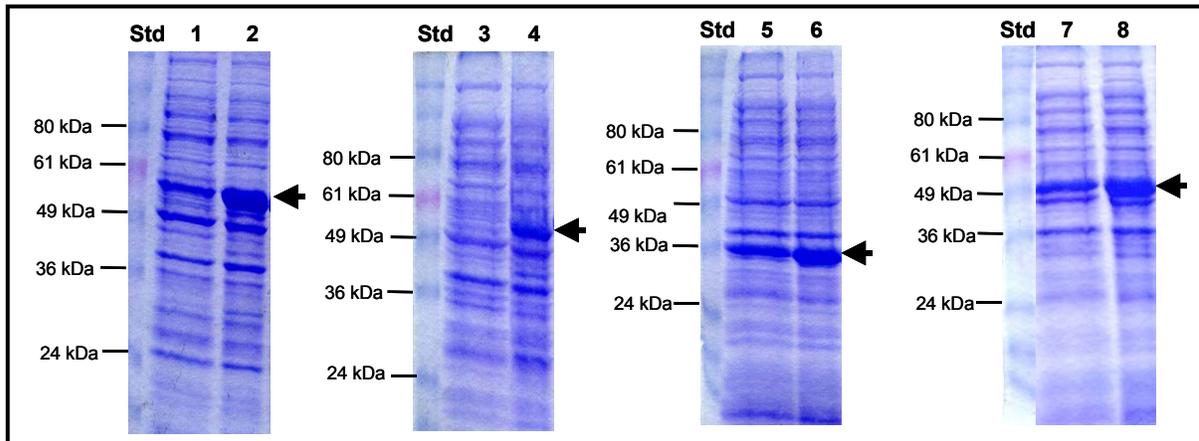


Figura 14. Análisis de las proteínas recombinantes CP Ch-80 α y CP Ch-80 β mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

Proteínas derivadas de bacterias transformadas con: **1 y 2:** pGEX6P1-CP Ch80 α sin inducción y luego de 3 horas de inducción, respectivamente; **3 y 4:** pGEX6P1-CP Ch80 β sin inducción y luego de 3 horas de inducción, respectivamente; **5 y 6:** pET28a-CP Ch80 β sin inducción y luego de 3 horas de inducción, respectivamente; **7 y 8:** pET32a-CP Ch80 β sin inducción y luego de 3 horas de inducción, respectivamente. Geles de poliacrilamida al 12,5 % en condiciones desnaturalantes.

3.6.1 Estimación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de las proteínas recombinantes presentes en el extracto crudo, con el objeto de estimar la cantidad de proteína con que se inmunizarían los conejos, luego de cortar la banda correspondiente a la proteína de interés desde geles de poliacrilamida. Las proteínas CP Ch-80 α y CP Ch-80 β , inducidas en *E. coli* transformada con el vector pGEX-6P-1, se cuantificaron según lo descrito en Materiales y Métodos. Alícuotas de los extractos crudos y cantidades conocidas de seroalbúmina de bovino (BSA) se analizaron juntos en un gel de poliacrilamida y se comparó la intensidad de las bandas luego de la tinción con azul de Coomasie (Figura15). Como resultado se determinó una concentración de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para CP Ch-80 α y 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para CP Ch-80 β .

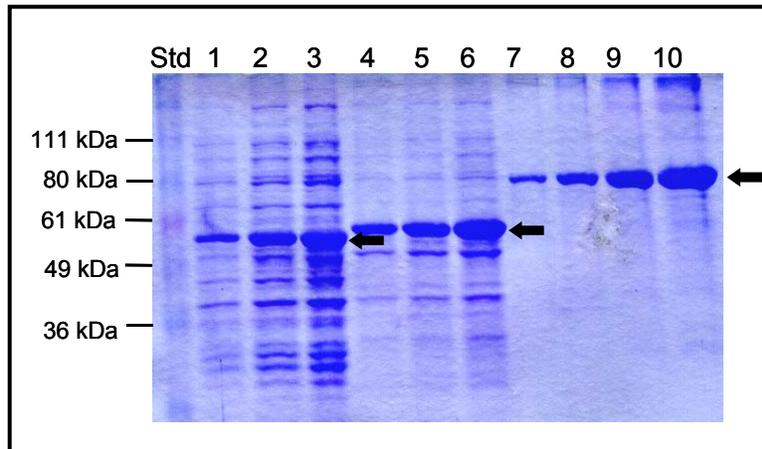


Figura 15. Estimación de la concentración de CP Ch-80 α y CP Ch-80 β recombinantes en un extracto crudo de bacterias recombinantes

1, 2 y 3: corresponden a 1, 2 y 4 μ l, respectivamente, de la fracción proteica insoluble de bacterias lisadas que contiene CP Ch-80 α ; 4, 5 y 6: corresponden a 1, 2 y 4 μ l, respectivamente, de la fracción proteica insoluble de bacterias lisadas que contiene CP Ch-80 β ; 7, 8, 9 y 10: alícuotas correspondientes a 1, 2, 4 y 8 μ g de BSA, respectivamente. Gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturantes. **Std**: estándar de tamaño molecular de proteínas.

3.7 Purificación de la proteína recombinante CP Ch-80 β

En una primera etapa y con el fin de solubilizar la proteína recombinante CP Ch-80 β expresada en el vector pET-28a, presente en la fracción insoluble del extracto bacteriano, ésta se resuspendió con urea 1-8 M de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. La proteína se obtuvo parcialmente soluble en urea 8 M Tris 50 mM (pH 8,0) y se purificó mediante una columna de afinidad níquel-agarosa. El resultado de la purificación se ilustra en la Figura 16. Se obtuvo la proteína con una purificación estimada del orden de 80-90%.

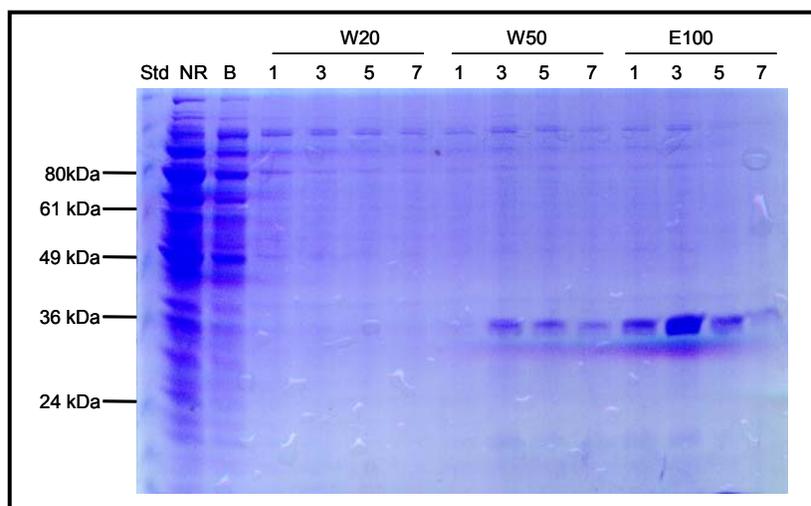


Figura 16. Análisis de la purificación parcial de CP Ch-80 β mediante cromatografía en Ni-agarosa por electroforesis en gel de poliacrilamida

NR: no retenido; **B:** lavado en presencia de 5 mM de imidazol; **1, 3, 5 y 7:** fracciones colectadas durante la purificación; **W20** y **W50:** lavados en presencia de 20 y 50 mM de imidazol, respectivamente; **E100:** elución en presencia de 100 mM de imidazol. **Std:** estándar de peso molecular de proteínas. Gel de poliacrilamida al 12,5 % en condiciones desnaturalantes.

La proteína recombinante CP Ch-80 β expresada en los vectores pET-28a y pET-32a resultó insoluble en urea 6 M. Para esta última se utilizó otro procedimiento el cual consistió en realizar lavados sucesivos con urea y solubilizar en SDS según se describió en Materiales y Métodos. Estos lavados permitieron solubilizar la mayoría de las proteínas presentes en la pella, lo que dejó a CP Ch-80 β aún insoluble pero mucho más limpia del resto de las proteínas bacterianas. Esta fracción semi purificada de CP Ch-80 β no se pudo purificar con la resina de afinidad níquel-agarosa debido a que esta es incompatible con el SDS presente en la solución, sin embargo mediante este procedimiento se obtuvo CP Ch-80 β con una pureza y una concentración suficiente para usos posteriores en la evaluación de los anticuerpos obtenidos contra ésta proteína (Figura 17).

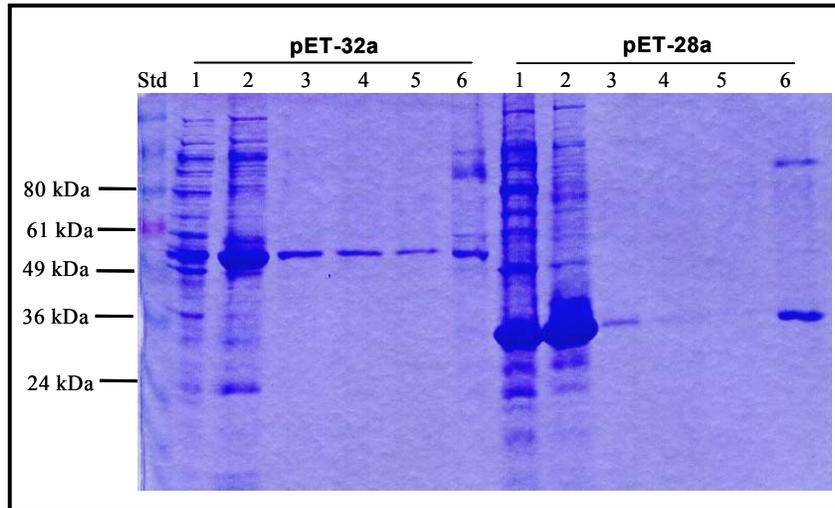


Figura 17. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de la purificación parcial de CP Ch-80 β obtenida de bacterias transformadas con pET-32a y pET-28a
1: Extracto crudo sin purificar; **2:** Primer lavado con SDS 0,3%; **3:** Segundo lavado con SDS 0,3%; **4:** Primer lavado con SDS 1%; **5:** Segundo lavado con SDS 1%; **6:** pella final resuspendida en PBS. **Std:** estándar de peso molecular de proteínas.

3.8 Obtención de anticuerpos policlonales

Una vez que se determinó la concentración de las proteínas recombinantes CP Ch-80 α y CP Ch-80 β presentes en el extracto crudo, éstas se cargaron en un gel de poliacrilamida y se cortó la banda correspondiente a la proteína de interés. Para la inmunización de los conejos se utilizó una mezcla de las proteínas CP Ch-80 α y CP Ch-80 β en 5 dosis de 400 μ g cada una.

Alternativamente, se siguió una segunda estrategia para el desarrollo de anticuerpos anti-CP Ch80. Esta consistió en la utilización de péptidos sintéticos como antígenos (Tabla 6). Los péptidos se acoplaron a una proteína transportadora (ver Materiales y Métodos) y se inmunizaron conejos con 5 dosis de una mezcla de péptidos de 250 μ g cada una.

Posteriormente, los antisueros obtenidos en ambos casos y correspondientes a anticuerpos policlonales contra la proteína CP Ch-80 fueron evaluados por ELISA y *Western blot* contra la proteína recombinante purificada CP Ch-80 β para determinar su título y especificidad.

3.8.1 Evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA

La respuesta inmune presentada por los conejos, fue evaluada por medio de la cuantificación de anticuerpos que presentan reactividad contra la proteína CP Ch-80 β purificada. Un primer análisis se hizo por el método ELISA de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos usando placas activadas con CP Ch-80 β recombinante purificada, las que se incubaron con diluciones seriadas de los sueros policlonales de los conejos inmunizados (A y B), además de suero pre-inmune como control. En la Figura 18 se muestran los resultados del ELISA donde se puede observar que se genera una buena respuesta inmune al inmunizar conejos con una mezcla de CP Ch-80 α y CP Ch-80 β cortadas desde geles de poliacrilamida. El anticuerpo policlonal obtenido reconoce la proteína recombinante en forma específica y esto no ocurre en el caso del suero pre-inmune. Se obtuvo un título de aproximadamente 1/250. Un factor que podría ser causa de este título en lugar de uno mayor, es el hecho de que los anticuerpos se realizaron contra CP Ch-80 α y CP Ch-80 β y la evaluación se realizó sólo contra CP Ch-80 β debido a que no contábamos con CP Ch-80 α purificada.

Los anticuerpos obtenidos con péptidos sintéticos se evaluaron mediante ELISA contra dos antígenos diferentes: una mezcla de los péptidos acoplados a BSA

(Figura 19A) y la proteína recombinante CP Ch-80 β purificada (Figura 19B). En la Figura 19A se observa la respuesta obtenida que indica un título aproximado de 1/8.000 para ambos conejos inmunizados (A y B). En la Figura 19B se observa la evaluación de éstos anticuerpos contra CP Ch-80 β , los cuales muestran a los péptidos sintéticos como un buen antígeno, con un título promedio aproximado de 1/500. Las diferencias obtenidas en ambos análisis pueden atribuirse al hecho que de los 6 péptidos seleccionados para la mezcla con la que se inmunizaron los conejos, sólo 4 de ellos están contenidos en CP Ch-80 β y esto estaría disminuyendo el título.

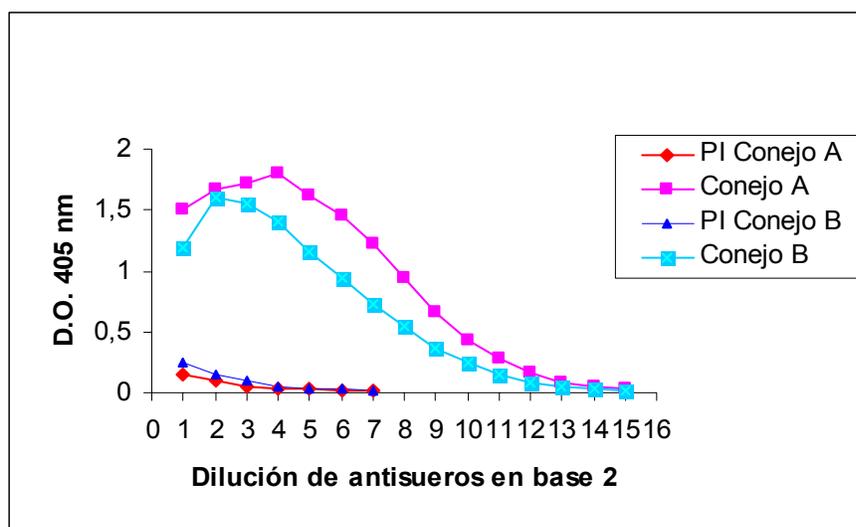


Figura 18. Titulación mediante ELISA de sueros policlonales obtenidos con los antígenos CP Ch-80 α y CP Ch-80 β

La evaluación se realizó contra la proteína recombinante CP Ch-80 β purificada. **PI**: suero pre-inmune; **Conejo A y B**: respuesta post-inmunizaciones.

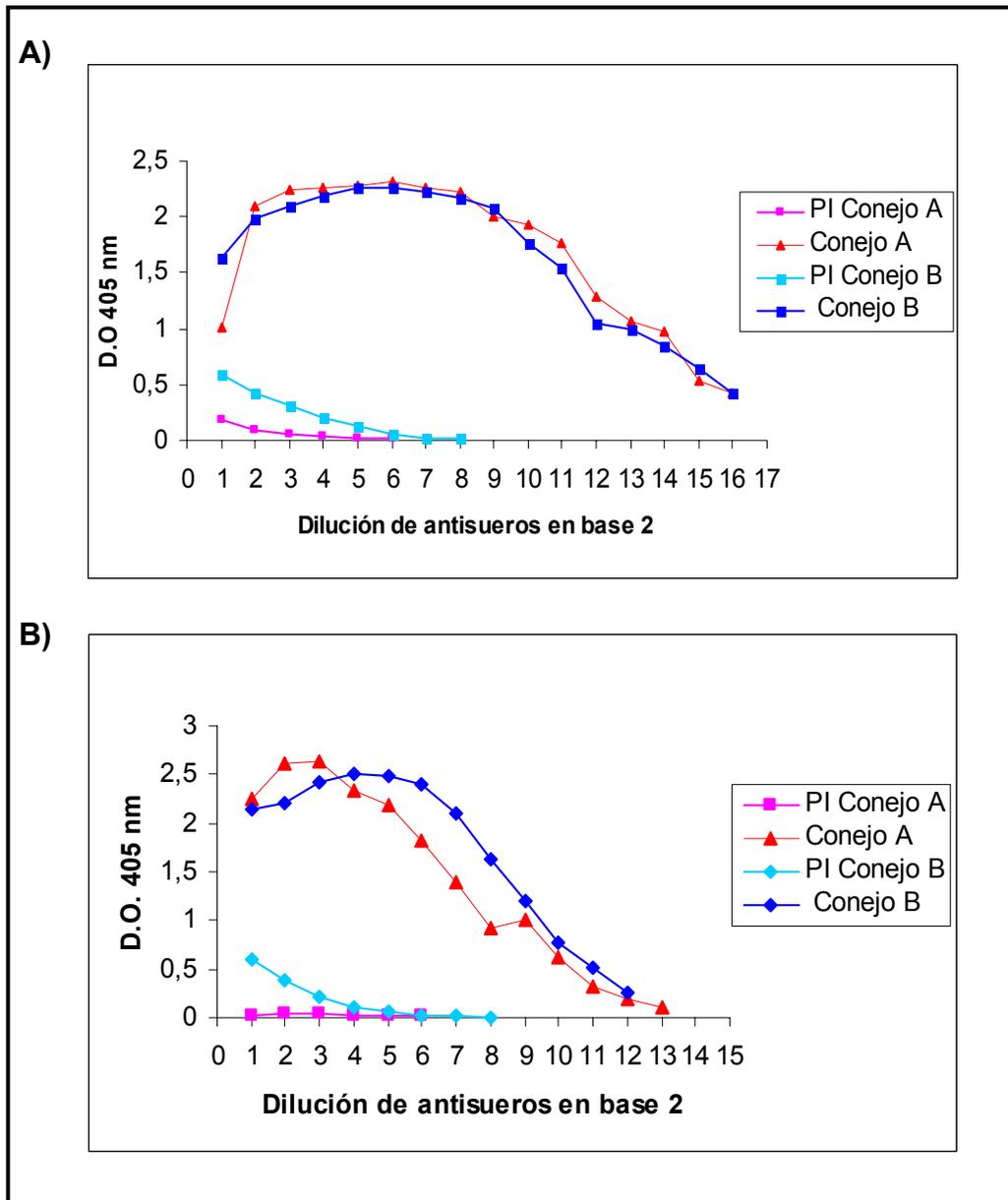


Figura 19. Titulación mediante ELISA de sueros policlonales obtenidos con péptidos sintéticos como antígenos

A) La evaluación se realizó contra una mezcla de los péptidos sintéticos acoplados a BSA.

B) La evaluación se realizó utilizando la proteína recombinante CP Ch-80 β purificada.

PI: suero pre-inmune; **Conejo A y B:** respuesta post-inmunizaciones.

3.8.2 Análisis de anticuerpos policlonales mediante *Western blot*

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos mediante ELISA y evaluar la especificidad de los sueros policlonales obtenidos, éstos se analizaron por la técnica de *Western blot*.

La membrana de nitrocelulosa que contenía las proteínas recombinantes purificadas se incubó con suero de conejo diluido 1/300, y se detectó la señal con una reacción cromogénica de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 20.

En la Figura 20A, se observa que en el caso de los anticuerpos obtenidos usando CP Ch-80 α y CP Ch-80 β obtenida desde geles de poliacrilamida, éstos reconocen la proteína recombinante CP Ch-80 β clonada en pET-28a (fusionada a una cola de 6 histidinas) y en pET-32a (fusionada a Trx), así como la proteína de fusión GST cuyo tamaño es de 26 kDa, debido a que el clonamiento se realizó en el vector pGEX 6P-1 cuya construcción deja la proteína de interés fusionada en el extremo amino-terminal a GST. La fusión TRX-CP Ch-80 tiene 49 kDa y la fusión His-CP Ch-80 tiene aproximadamente 30 kDa. Se evaluó además la especificidad de los anticuerpos contra Trx sola, cuyo tamaño es de alrededor de 20 kDa, no observándose reconocimiento en este caso.

Cuando se evaluaron los anticuerpos obtenidos mediante péptidos sintéticos (Figura 20B) observamos que como en el caso anterior, éstos reconocen las proteínas His-CP Ch-80 β , TRX- CP Ch-80 β y no reaccionan con la proteína Trx sola. En este caso también se evaluó la especificidad contra la proteína transportadora a la cual se

acoplaron los péptidos (Hemocianina), y se observa que ésta sí es reconocida por los anticuerpos.

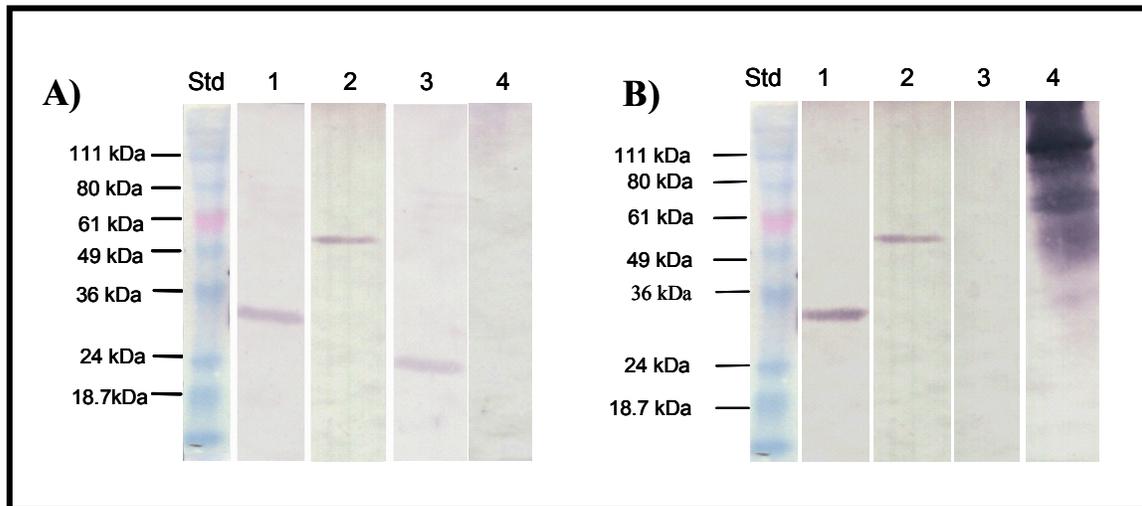


Figura 20. Análisis de anticuerpos policlonales mediante *Western blot*

A) Suero policlonal obtenido con CP Ch-80 α y CP Ch-80 β extraídas desde geles de poliacrilamida. **1:** His-CP Ch-80 β ; **2:** TRX-CP Ch-80 β ; **3:** Glutación-S-Transferasa (GST) y **4:** Tiorredoxina (TRX). **Std:** estándar de peso molecular de proteínas

B) Suero policlonal obtenido con péptidos sintéticos. **1:** His-CP Ch-80 β ; **2:** TRX-CP Ch-80 β ; **3:** Tiorredoxina (TRX) y **4:** Hemocianina.

4. DISCUSIÓN

Las infecciones de vides por GFLV en Chile, así como en todo el mundo, son causantes de importantes pérdidas económicas. Si bien, ciertos cultivares tolerantes a la infección por GFLV bajan levemente los rendimientos en la productividad, aquellos que son susceptibles pueden alcanzar pérdidas de hasta 80%, bajas en la calidad del fruto y disminución de la vida útil de la planta.

En nuestro país se conoce muy poco acerca de la variabilidad de las cepas virales de vid existentes, así como de los virus que infectan plantas en general. Además, existe la necesidad de tener sistemas que permitan la certificación de plantas libres de virus para su comercialización.

A pesar de que en la actualidad existen sistemas de detección de GFLV comerciales desarrollados en Europa, existe la necesidad de contar en nuestro país con sistemas desarrollados en Chile, basados en aislados locales, lo que permitirá una considerable disminución de costos para los viveristas y productores. Este hecho aumentaría su interés en tener plantas certificadas libres de virus para ser aprobadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su comercialización y exportación. En la actualidad, existe una normativa que exige que el material de propagación específicamente de la variedad *Vitis spp.* estén certificadas (Servicio Agrícola y Ganadero, 2003).

Basándonos en estos antecedentes, en este trabajo de tesis se clonó y secuenció la totalidad de la zona codificante del genoma de un aislado chileno de GFLV (Ch-80), que consiste en dos hebras de ARN (ARN1 y ARN2). La secuencia del ARN2 se

comparó con secuencias disponibles de aislados europeos, así como regiones de interés del genoma de otros aislados nacionales. El análisis comparativo se restringió al ARN2, donde se encuentran codificadas las proteínas de mayor interés para un método de diagnóstico, como son: la proteína de cubierta viral (CP) y la proteína de movimiento (MP). La región codificadora de la proteína de cubierta, en sus porciones CP Ch-80 α y CP Ch-80 β , se expresó en *E. coli* lo cual permitió la producción de anticuerpos policlonales.

De los aislados disponibles (Ch-80; Ch-229 y Ch-133), Ch-80 fue el que se seleccionó para secuenciar su genoma completo, debido a la mayor disponibilidad de material infectado con este aislado y a que presentaba una sintomatología mayor de infección por GFLV en relación a los otros aislados.

Se evaluaron diferentes protocolos para extracción de ARN total, para obtener ARN de vid y ARN viral con un alto rendimiento. Este procedimiento presentó desafíos ya que los tejidos vegetales presentan un alto contenido de polisacáridos y polifenoles, sustancias que interfieren con una eficiente extracción de los ácidos nucleicos. Además, las reacciones de digestión y amplificación de ADN, así como la reacción de transcripción reversa, son inhibidas en presencia de estas sustancias (Maliyakal, 1992). Sin embargo, con el procedimiento elegido se logró adoptar un protocolo que permite la obtención de ARN total con una pureza suficientemente buena para los experimentos de RT-PCR.

Tanto el ARN1 como el ARN2 son de hebra simple y de orientación positiva, los que contienen una proteína (VPg) en el extremo 5'-terminal y una cola de poli A en el extremo 3'-terminal (Pinck y col., 1988; Martelli y col., 1991). En base a las

secuencias descritas para otros aislados confirmamos que se logró secuenciar totalmente el ARN2 del aislado utilizado, incluyendo la zona 3' UTR obtenida por la técnica *RACE* y el 5' UTR mediante la elaboración de un partidador degenerado a partir del nucleótido 1 en la zona 5' del aislado F13 (Margis y col., 1993). Esto no fue posible para el caso del ARN1, a pesar de que se realizaron varios intentos utilizando las estrategias anteriormente mencionadas. El partidador degenerado en este caso se diseñó a partir de la secuencia publicada del aislado alemán NW (Ritzenthaler y col., 1991) pero no se obtuvo amplificación en las muestras de ARN del aislado chileno GFLV Ch-80, posiblemente debido a que existen diferencias importantes entre el aislado alemán y CP Ch-80 en esa zona lo que impide la hibridación del partidador para amplificar la zona 5' UTR. Se obtuvieron resultados similares para el caso del 3' *RACE* sin lograr el clonamiento para secuenciar el extremo 3' del ARN1. Debido a esto, para el caso del ARN1 se completó la secuencia de la zona codificante pero no de los extremos 5' y 3' UTRs. El hecho de secuenciar dos veces cada uno de los clones obtenidos nos permitió confirmar la secuencia de cada uno de ellos y disminuir errores en el proceso de secuenciación.

La secuencia completa del ARN2 de GFLV Ch-80 contiene 3.742 nucleótidos excluyendo el extremo 3' terminal (cola de poli A), con un marco de lectura abierto de 3.324 nucleótidos, de los cuales 1.512 nucleótidos codifican para 504 aminoácidos de la proteína de cubierta con un peso molecular estimado de 56 kDa, el mismo tamaño de la proteína de cubierta de la cepa F13 (Serghini y col., 1990). Para el ARN1, se obtuvo un marco de lectura abierto de 6.854 nucleótidos que, al ser alineado con el aislado NW (Ritzenthaler y col., 1991) corresponde a la posición 243

a 7.097 de este aislado, los cuales codifican para la poliproteína viral P1, que posteriormente origina: Cofactor de Proteasa, Helicasa, VPG, Proteasa y ARN Polimerasa.

Se ha descrito que los virus de ARN de plantas, en especial aquellos del tipo de GFLV que infectan cultivos perennes, tienen un gran potencial de variación genética, debido a que infectan a su huésped por largos periodos de tiempo y su proceso de replicación es propenso a errores por el hecho de no contar con un mecanismo de corrección asociado con su ARN polimerasa ARN dependiente (Vigne y col., 2004). Como consecuencia de esto, se espera que cada aislado viral consista en una población de variantes relacionadas genéticamente, llamadas quasiespecies (García-Arena y col., 2001).

Alineamientos de las secuencias obtenidas en esta memoria indican una variabilidad de 10% a nivel de nucleótidos y de 7% a nivel de aminoácidos entre el aislado GFLV Ch-80 y los aislados europeos. Este grado de variabilidad se mantiene para cada una de las proteínas codificadas en el ARN2, sin observarse regiones de mayor variabilidad o dominios más conservados en estos genes. Esta variabilidad también se observa cuando se comparan secuencias de aislados de distintas zonas geográficas de Chile (GFLV Ch-229, Ch-133 y Ch-80; Figuras 9 y 10). Lo anterior probablemente se explica debido al continuo intercambio de material de propagación de vides, incluyendo material infectado con GFLV, entre regiones distantes en el mundo.

Se podría argumentar que estas diferencias podrían deberse a errores debido a la *Taq* polimerasa. Sin embargo, para las reacciones de PCR en las que se utilizó *Taq*

polimerasa, se emplearon las condiciones óptimas de fidelidad, en especial la concentración de $MgCl_2$ de acuerdo a lo descrito por Eckbert y Kunckel, 1990. En base a los datos publicados, estimamos una tasa de error equivalente a la sustitución de 1 en 2.000 pares de bases, para 30 ciclos de PCR. En consecuencia, podemos deducir que en el genoma total secuenciado (aproximadamente 11 kilobases) se tendrían cerca de 6 sustituciones de bases, lo cual correspondería a un 0,05 % de variaciones por error de la *Taq* en el proceso de secuenciación. Estos números indican que para la CP Ch-80, con una región codificadora de 1.515 nucleótidos, uno esperaría menos de 1 cambio producido por la polimerasa. Por lo tanto, estimamos que las variaciones detectadas entre el aislado chileno y los europeos son debidas probablemente a variabilidad genética y no a errores de la *Taq* polimerasa. Para trabajos posteriores se recomienda la utilización de una polimerasa con actividad correctora 3'-5', con lo cual se disminuirían los posibles errores debido a este factor.

Además, en los análisis realizados observamos que las diferencias a nivel de ARN se producen en su mayoría en el tercer nucleótido de cada codón, representando mutaciones silenciosas. A nivel de proteína, la mayoría de las diferencias de aminoácidos se refieren a cambios por el mismo grupo aminoacídico, situación que se repite en relación a aislados de GFLV de otros países y su comparación con secuencias publicadas (Brandt y col., 1995), donde aquellos aminoácidos altamente críticos para la actividad de las proteínas no estarían siendo afectados.

En base a la secuencia nucleotídica obtenida para el ARN2 del aislado GFLV Ch-80, se clonó la región codificante para la proteína de cubierta (CP Ch-80) con el fin de expresar esta proteína en bacterias y obtener anticuerpos policlonales contra ésta.

Sin embargo no fue posible expresar la proteína completa, lo que podría atribuirse a que la proteína viral sea tóxica para la bacteria. La inducción de proteínas tóxicas es capaz de provocar la eliminación del plasmidio recombinante que contiene el gen que codifica dicha proteína, logrando mantener su crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, debido a la menor concentración de antibiótico presente, causada previamente por la liberación de β -lactamasas. Sin embargo, se confirmó la presencia del plasmidio recombinante en los cultivos inducidos. También es necesario considerar otros factores como: la formación de estructuras secundarias o diferencias en la utilización de codones del huésped que impiden que el ARN mensajero viral sea traducido eficientemente en estas bacterias. Es conocido que no todos los ARNm son traducidos con la misma eficiencia, siendo importante la similitud en el uso de codones especialmente al inicio de las secuencias, así como la formación de estructuras secundarias en horquillas que dificultan el acceso a los ribosomas e impiden el proceso de traducción de la proteína.

Como una estrategia alternativa para expresar la proteína en *E. coli*, se clonó el gen de CP Ch-80 en dos fragmentos que codifican las regiones amino (CP Ch-80 α) y carboxilo (CP Ch-80 β), cuyas masas moleculares teóricas de acuerdo a su secuencia son: 27 kDa para CP Ch-80 α y 29 kDa para CP Ch-80 β , respectivamente. Se logró una buena expresión de CP Ch-80 α y CP Ch-80 β clonadas en el vector pGEX-6P-1, las cuales fueron utilizadas para la obtención de anticuerpos policlonales. No se logró expresar CP Ch-80 α al clonar en los vectores pET-28a o pET-32a, posiblemente por las razones antes expuestas, pero se expresó CP Ch-80 β mediante los vectores

pET-28a y pET-32a, la que fue purificada y utilizada para evaluar los sueros policlonales.

El análisis por ELISA de los sueros policlonales permitió confirmar que éstos eran reactivos contra la proteína CP Ch-80 β con un título aproximado de 1/250. Además el análisis por *Western blot* confirma la especificidad contra la proteína recombinante CP Ch-80 β purificada y contra la proteína de fusión (GST). Esto corresponde al resultado esperado ya que en este caso CP Ch-80 se clonó en el vector pGEX-6P-1 el cual deja la proteína de interés fusionada a GST en su extremo amino-terminal.

Paralelamente, se desarrollaron anticuerpos policlonales mediante la inmunización con péptidos sintéticos diseñados en base a la secuencia obtenida en nuestro laboratorio para GFLV Ch-80. Estos anticuerpos se evaluaron mediante ELISA y *Western blot*. En el análisis por ELISA se utilizó una mezcla de los péptidos acoplados a BSA y se observó un título aproximado de 1/8.000. Estos anticuerpos también se evaluaron contra la proteína recombinante CP Ch-80 β purificada y se obtuvo un título de 1/500. Posteriormente, la evaluación por *Western blot* mostró que los anticuerpos reconocen específicamente tanto CP Ch-80 β como también la proteína Hemocianina, debido a que los péptidos se inyectaron acoplados a este transportador. Sin embargo, esto último no es un problema ya que hemocianina no es una proteína relevante para nuestros fines de diagnóstico viral en plantas, debido a que no está presente en ninguno de estos organismos.

La diferencia de la respuesta entre la evaluación con péptidos y CP Ch-80 β podría deberse a que mediante los péptidos se está detectando la respuesta contra

epítopes de la región que codifica para CP Ch-80α los cuales también podrían ser altamente inmunogénicos.

Una forma de evaluar la inmunogenicidad de cada uno de los epítopes sería realizar un ELISA utilizando cada uno de los péptidos por separado en lugar de una mezcla de ellos. Otra posibilidad que explica la diferencia obtenida en el título entre los anticuerpos obtenidos, es que la proteína inyectada desde un fragmento de gel de poliacrilamida podría resultar tóxica en conejos, y esto estaría afectando la respuesta inmune.

Actualmente, estamos realizando experimentos de inmunocaptura seguido de RT-PCR (IC-RT-PCR) en plantas infectadas con aislados chilenos de GFLV (datos no mostrados). En esta etapa, resultados preliminares nos muestran que los anticuerpos producidos en nuestro laboratorio son eficientes en capturar el virus a partir de plantas infectadas. En la literatura (Sefc y col., 2000), se ha descrito este método como una alternativa eficaz para la detección de virus que infectan vides, y con mayor sensibilidad que la técnica ELISA. Esto significa que, de ser reproducibles, las proyecciones de este trabajo estarán enfocadas hacia el desarrollo de un kit para la detección de GFLV. Sumado a esto, en nuestro laboratorio se están desarrollando anticuerpos contra aislados chilenos de los virus *Grapevine Leafroll Virus* (GLRV) y *Grapevine Fleck Virus* (GFV), para el desarrollo de nuevos kits de detección contra estos virus de importancia económica en Chile. Esto será de gran ayuda para la certificación en nuestro país de plantas libres de virus, necesario en los procesos de comercialización, importación y exportación, a objeto de poner a disposición de la fruticultura nacional materiales comprobadamente sanos y con garantía de genuidad

varietal. Dentro de los requisitos fitosanitarios establecidos por el SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, 2003), GFLV está considerado dentro de las plagas de control permanente en los programas de certificación a nivel nacional y es por ello, que poder contar en el futuro con sistemas de diagnóstico para estos virus desarrollados en nuestro país, será un gran aporte al desarrollo de esta actividad productiva mejorando la detección de GFLV.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arancibia, M. R. (1988). Identificación de los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (*V. vinifera* L.) presentes en el cv. Black seedless y la obtención de plantas limpias mediante termoterapia y cultivo de meristemas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago. Chile.

Auger, S. J., Aballay, E., Pinto, M. y Pastenes, C. (1994). Efectos del virus de la hoja en abanico VHA en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv. Thompson seedless. ACONEX 46: 20-23.

Andersen, K. and Johansen, I. E. (1998). A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. Virol. 241: 304-311

Brandt, S., Ibl, M. and Himmler, G. (1995). Coat protein gene sequence of an Australian isolate of grapevine fanleaf virus. Arch. Virol. 140: 157-162.

Burzio, L. A., Saez, C., Pardo, J., Waite, J. H. and Burzio, L. O. (2000). The adhesive protein of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) and *Aulacomya ater* (Molina, 1782): a proline-rich and a glycine-rich polyphenolic protein. Biochim. Biophys. Acta. 1479: 315-320.

Cereceda, C. y Auger, J. (1979). Aislamiento y caracterización del virus Mosaico Amarillo de la vid (*Vitis vinifera* L. cv. Semillón), presente en Chile. Investigación Agrícola 5: 83-88.

Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pines trees. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Covarrubias, C. (1993). Virus en Frutales: aspectos económicos. Virus en frutales de carozo, pomáceas y vides. INIA, La Platina, Santiago de Chile.

Digiario, M., Boscia, D., Simeone, V. and Savino, V. (1997). Detrimental effects of filamentous viruses to table grape varieties newly introduced in southern Italy. 12th Meeting of the international council for the study of viruses and virus-like disease of the grapevine. Lisboa, Portugal.

Eckert, K. A. and Kunkel, T. A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nucleic Acids Res. 18: 3739-3744.

Esmenjaud, D., Abad, P., Pinck, L. and Walter, B. (1994). Detection of a region of the capsid protein gene of Grape fanleaf virus by RT-PCR in the nematode vector *Xiphinema index*. Plant Dis. 78: 1087-1090.

Fattouch, S., M'Hirsi, S., Acheche, H., Marrakchi, M. and Marzouki, N. (2001). RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of *Grape fanleaf Virus* in Tunisian grapevines. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 235-244.

García-Arena, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Ann. Rev. Phytopath.* 39: 157-186.

Golino, D. A. (1993). Potencial interaction between rootstocks and grapevine latent virus. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 148-152.

Hamamoto, H., Watanabe, Y, Kamada, H. and Okada, Y. (1997). A single amino acid substitution in the virus-encoded alters host specificity. *Mol. Plant-Microb. Interac.* 10: 1015-1018.

Hammond, R. W. and Crosslin, J. M. (1998). Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. *J. Gen. Virol.* 79: 1815-1823.

Herrera, M. G. (1996). Panorama de enfermedades causadas por virus en frutales de carozo pomáceas y vides. *Simiente* 66: 35-36.

Herrera, G. (2001). Enfermedades de frutales causadas por virus en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.

Herrera, G. y Madariaga, M. (1994). Detección de los virus Tomato Ringspot Virus y Arabis Mosaic Virus en vides en Chile. *Fitopat.* 44 (1): 42.

Herrera, G. y Madariaga, M. (2001). Presencia e incidencia de virus de la vid en la zona central de Chile. *Agric. Téc.* 61: 4.

Hewitt, A. C. (1965). Las enfermedades y otros problemas de los viñedos chilenos. Informe al Gobierno de Chile. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia.

Latorre, B. (1992). Enfermedades de las plantas cultivadas. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.

Mackenzie, D. (1997). Improved RNA extraction from Woody plants for detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81: 222-225.

Maliyakal, E. J. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20: 2381.

Margis, R., Viry, M., Pinck, M. and Pinck, L. (1991). Cloning and in vitro characterization of the grape fanleaf virus proteinase cistron. *Viol.* 185, 779-787.

Margis, R., Ritzenthaler, C., Reinbolt, J., Pinck, M. and Pinck, L. (1993). Genome organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA2 deduced from the 122K polyprotein P2 *in vitro* cleavage products. *J. Gen. Virol.* 74: 1919-1926.

Martelli, G. P. (1991). Nepovirus. In "Classification and Nomenclature of Viruses". Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 368-371.

Martelli, G. P. (1993). Graft-transmissible diseases of grape vines. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Roma, Italia.

Martelli, G. P. y Savino, V. (1996). Entrenudo corto infeccioso de la vid-hoja en abanico. Plagas y enfermedades de la vid. APS, Ed. Mundi-Prensa, Esp.-Mex. 48-49.

Martelli, G. and Walter, B. (1998). Virus certification in grapevines. Plant virus disease control. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.

Naraghi-Arani, P., Daubert, S. and Rowhani, A. (2001). Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. J. Gen. Virol. 82: 1791-1795.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2004). Boletín Estadístico de Comercio Exterior Silvoagropecuario, Enero-Junio 2004, N° 34. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago de Chile (www.odepa.gob.cl)

Padgett, H. and Beachy, R. (1993). Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. The Plant Cell 5: 577-586.

Pan, S-H. and Malcom, B. A. (2000). Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21(DE3). Biotechniques 29: 1234-1238.

Pinck, L., Fuchs, M., Pinck, M., Ravelonandro, M. and Walter, B. (1988). A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. J. Gen. Virol. 69: 233-239.

Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmith, C., Duval, S., Piéquet, A., Loudes, A. M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C. and Pfeiffer, P. (2002). Grape fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. J. Virol. 76: 8808-8819.

Ritzenthaler, C., Viry, M., Margis, R., Fuchs, M. and Pinck, L. (1991). Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. J. Gen. Virol. 72: 2357-2365.

Roossinck, M. (1997). Mechanism of plant virus evolution. Ann. Rev. Phytopathol. 35: 191-209.

Sánchez, F., Chay, C., Borja, M. J. Rowhani, A., Romero, J., Bruening, G. and Ponz, F. (1991). cDNA sequence of the capsid protein gene and 3' untranslated region of a fanleaf isolate of GFLV. Nucl. Acids Res. 19: 5440.

Sánchez, C. R. (1995). Prospección de Nepovirus y Closterovirus en zonas vitivinícolas de la VIII Región. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.

Sánchez, R. y Hepp, R. (1994). Prospección de nepovirus y closterovirus en viñedos de la VIII Región. Simiente 64: 100 (Resumen).

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 6463-6467.

Sefc, K. M.; Leonhardt, W. and Steinkellner, H. (2000). Partial sequence identification of GLRaV-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. J. Virol. Meth. 86: 101-106.

Serghini, M. A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. and Pinck, L. (1990). RNA2 of grape fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.* 71: 1433-1441.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Departamento de semillas. (2003). Normas específicas de certificación de material de propagación de *Vitis spp.* Santiago. N° 2086.

Shintaku, M. H., Zhang, L. and Paulukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of cucumb mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *The Plant Cell* 4: 751-757.

Sit, T. L., Haikal, P. R., Callaway, A. S. and Lommel, S. A. (2001). A single amino acid mutation in the carnation ringspot virus capsid protein allows virion formation but prevents systemic infection. *J. Virol.* 19: 9538-9542.

Schneider, W. L. and Roossinck, M. (2000). Evolutionary related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *J. Virol.* 74: 3130-3134.

Steinkellner, H., Himmler, G., Salg, R., Mattanovich, D. and Katinger, H. (1992). Amino-acid sequence comparison of nepovirus coat proteins. *Virus Genes* 6, 2: 197-202.

Szilazy, D., Salánky, K. and Balázs, E. (1999). Stunting Inducer by Cucumber Mosaic Cucumovirus-Infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. *Mol. Plant-Microb. Interac.* 12: 1105-1113.

Van Regenmortel, M. H. V. and Muller, S. (1999). Synthetic peptides as antigens. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 28. Elsevier. Amsterdam.

Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. and Fuchs, M. (2004). Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J. Gen. Virol.* 85: 2435-2445.

Viry, M., Serghini, M. A., Hans, F., Ritzenthaler, C., Pinck, M and Pinck, L. (1993). Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *J. Gen. Virol.* 74: 169-174.

Weber, H., Schultze, S. and Pfitzner, A. (1993). Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the resistance gene in the tomato. *J. Virol.* 67: 6432-6438.

Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G. M. and Krczal, G. (2001). Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Res.* 75: 139-145.

