

UCH-FC
Biotecnología
G521
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ANÁLISIS DEL GENOMA DE AISLADOS CHILENOS DE GLRaV-3 Y
DESARROLLO DE MÉTODOS DE INMUNODETECCIÓN BASADOS EN EL
RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CRISTOBAL GIRARDI LAVIN

Dr. Pablo Valenzuela Valdés
Director de Memoria de Título

Dr. Mario Roseblatt Silber
Patrocinante

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión y evaluador

Dra. Claudia Stange
Correctora y evaluadora

SANTIAGO, Martes 28 de Junio de 2005



UCH - FC
Biotecnología
9521
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**ANÁLISIS DEL GENOMA DE AISLADOS CHILENOS DE
GLRaV-3 Y DESARROLLO DE MÉTODOS DE
INMUNODETECCIÓN BASADOS EN EL RECONOCIMIENTO
DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Cristobal Girardi Lavin

Director de Memoria: Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Profesor patrocinante: Dr. Mario Rosemblatt Silber

FUNDACIÓN CIENCIA PARA LA VIDA

Santiago, Chile 2005



Hay quienes construyeron pirámides para llegar alto, otros de modesta capacidad, debemos instruirnos en grandes templos del saber para lograr nuestros objetivos. Es así como llegué a esta universidad, y en particular a la Facultad de Ciencias, lugar donde me encontré con grandes intelectuales, personas, luchadores. Estoy muy contento de haber vivido mi etapa de formación como biotecnólogo aquí, donde además, compartí y experimenté factores que normalmente faltan en nuestra alicaída sociedad, diversidad y tolerancia.

Hasta pronto Universidad de Chile.....

DEDICATORIA

Se podría pensar que la persona más feliz por el término de esta etapa de mi vida, una larga carrera universitaria, llena de tropiezos y repuntes, es quien escribe estas líneas. Sin embargo creo que hay dos personas que sienten aún más alegría que yo, mis padres, a quienes dedico sin duda este trabajo, por su incondicional apoyo, cariño y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al director de esta memoria, el doctor Pablo Valenzuela, quien me recibió y permitió desarrollar este trabajo en la Fundación Ciencia para la Vida, contribuyendo así de manera sustancial en mi formación profesional.

Asimismo, debo agradecer de manera muy especial a Esteban Engel por su constante ayuda, apoyo, entrega de conocimiento y disposición para el desarrollo de mi trabajo; sin duda fue un pilar fundamental para que esta memoria llegara a buen término.

Quisiera agradecer también a Consuelo Bruno, Vivian Wilhelm, Francisco Santana y Sebastián Valenzuela por su constante colaboración y amistad.

A Juanita Bustamante por su colaboración en una parte trascendental de este trabajo.

Al director de la Fundación Ciencia para la Vida, Dr. Mario Roseblatt, quién también fue profesor patrocinante de esta memoria.

En general quiero agradecer a toda la gente del laboratorio y de la Fundación por su calidad humana y por hacer de este un ambiente de trabajo ideal.

Finalmente no puedo dejar de agradecer a mi comisión evaluadora, Michael Handford y Claudia Stange, por su excelente disposición hacia mi trabajo y persona.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUCCION.....	1
1. Agricultura y cultivo de la vid en Chile.....	1
2. Virus del Enrollamiento Clorótico de la Vid.....	2
2.1 GLRaV-3.....	4
3. Sistemas de detección viral.....	6
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivo general.....	8
6. Objetivos específicos.....	8
II. MATERIALES Y METODOS.....	10
1. Animales.....	10
2. Células.....	10
3. Material de vid infectado.....	10
4. Reactivos.....	10
5. Partidores.....	11
6. Vectores.....	12
7. Preparación de extractos proteicos de vid.....	14
8. Preparación de ARN total de vid.....	14
9. Transcripción reversa.....	15
10. Amplificación de ADN por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).....	15
11. Análisis de ADN y ARN en geles de agarosa.....	16
12. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.....	16
13. Digestión con endonucleasas de restricción.....	16
14. Desfosforilación y purificación de pGEX-6P-1 y pET-32a(+).....	17
15. Ligación de fragmentos de ADN a vectores.....	17
16. Preparación de células <i>E. coli</i> competentes.....	18
17. Transformación de <i>E. coli</i> competentes.....	18
18. Purificación de ADN plasmidial.....	19
19. Secuenciación de ADN.....	19
20. Análisis de secuencias.....	19
21. Preparación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	20
A. Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes.....	20
B- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes..	21
C- Purificación de las proteínas recombinantes.....	21
D- Concentración de proteínas recombinantes.....	22
E- Determinación de la concentración de proteínas.....	23

22. Inmunización de ratones y conejos con proteína recombinante y obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales	23
23. ELISA	24
B- TAS-ELISA para la detección de vides infectadas.	25
24. <i>Western blot</i>	26
25. Purificación de inmunoglobulinas totales	26
26. IC-RT-PCR.....	27
III. RESULTADOS	29
1. Selección del material vegetal	29
2. Extracción de ARN total de vid.....	29
3. Obtención y amplificación de ADNc viral	30
4. Clonamiento, secuenciación y análisis del genoma viral	32
5. Clonamiento del gen de la proteína de la cápside en pGEX-6P-1 y en pET-32a.....	35
6. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de la proteína de la cápside recombinante	37
7. Obtención y caracterización de anticuerpos contra la proteína de la cápside	40
a- Anticuerpos policlonales en conejo	40
b- Anticuerpos monoclonales en ratón	41
8. Detección de vides infectadas con GLRaV-3.....	43
8.1. Detección de GLRaV-3 en vides mediante ELISA.....	44
a. Análisis y caracterización del anticuerpo policlonal contra GLRaV-3	44
b. Análisis y caracterización de los anticuerpos monoclonales contra GLRaV-3.....	45
8.2. Detección de GLRaV-3 en vides mediante IC-RT-PCR.....	46
a. Evaluación de los anticuerpos monoclonales y policlonales	46
b. Análisis de reacción cruzada con otros virus mediante IC-RT-PCR	48
8.3. Prueba final de muestras desconocidas mediante ELISA e IC-RT-PCR	49
a. Diagnóstico mediante ELISA	49
b. Diagnóstico por IC-RT-PCR	51
IV. DISCUSION.....	55
V. CONCLUSIONES.....	68
VI. REFERENCIAS	69

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Sintomatología presentada por una vid infectada con GLRaV-3.....	3
Figura 2. El virus del enrollamiento clorótico de vid (GLRaV-3).	5
Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar el genoma del virus GLRaV-3 y otros virus (GLRaV-1 y GFLV).....	11
Figura 3. Esquema de los vectores pGEM-T, pET-32a y pGEX-6P-1.....	13
Figura 4: Análisis electroforético de ARN total de vid.	30
Figura 5. Amplificación del genoma de GLRaV-3 mediante PCR.	31
Figura 6. Relaciones filogenéticas generadas a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína de la cápside de distintos aislados de GLRaV-3.	35
Figura 7. Alineamiento de 2 regiones del genoma de GLRaV-3.	35
Figura 8. Análisis electroforético de fragmentos liberados desde plasmidios recombinantes con el gen cp766.....	36
Figura 9. Esquema de la expresión de la proteína de la cápside recombinante utilizando los plasmidios pET-32a y pGEX-6P-1.	37
Figura 10. Análisis electroforético de la cinética de inducción de la proteína de cubierta recombinante.....	38
Figura 11. Análisis electroforético de la purificación parcial de la proteína recombinante de cubierta viral.	39
Figura 12. Análisis de los anticuerpos policlonales contra CP-766 mediante ELISA y <i>Western blot</i>	41
Figura 13. Determinación del título de anticuerpos monoclonales contra CP-766 mediante ELISA.	42
Figura 14. Análisis de los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante <i>Western blot</i>	43
Figura 15. Evaluación y titulación de anticuerpos monoclonales utilizando tejido de vid infectada con GLRaV-3 mediante TAS-ELISA.	45
Figura 16. Evaluación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante IC-RT-PCR.	47
Figura 17. Análisis de posible reactividad cruzada de anticuerpos policlonales y monoclonales en vid infectada mediante IC-RT-PCR.	48
Figura 18. Diagnóstico de muestras problema mediante ELISA.	50
Figura 19. Diagnóstico de muestras problema por IC-RT-PCR.....	52
Figura 20. Diagnóstico de muestras problema mediante RT-PCR.....	53
Tabla 2. Virus presentes en las muestras problemas analizadas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina de bovino
CP	Proteína de la cápside
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
dATP	Deoxirriboadenina trifosfato
dCTP	Deoxirribocitosina trifosfato
dGTP	Deoxirriboguanina trifosfato
dNTP	Deoxirribonucleótido trifosfato
dTTP	Deoxirribotimina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FAL	Fosfatasa alcalina
g	Fuerza de gravedad
gr	Gramo
GLRaV	Virus del enrollamiento clorótico de vid
GST	Glutación-S-transferasa
h	Hora
ha	Hectárea
IC-RT-PCR	Inmunocaptura RT-PCR
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M-MLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina
NBT	Nitroazul de tetrazolio
nm	Nanometros
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Solución de tampón de fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial hidrógeno
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
P-NPP	Para-nitrofenilfosfato
PSA	Persulfato de amonio
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
RNasa	Ribonucleasa
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAS-ELISA	Sandwich de triple anticuerpo-ELISA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TRX	Tioredoxina de <i>E. coli</i>
U	Unidad enzimática
UTR	Región no traducida
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltio
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

La patología del enrollamiento clorótico de la hoja de vid (GLRaV) es la virosis de vides más difundida en el mundo y causante de importantes pérdidas en el sector vitícola. Hasta ahora se han reportado nueve variantes serológicamente distintas de GLRaV, siendo GLRaV-3 la más frecuente en el mundo y en Chile. El GLRaV-3 es un *Ampelovirus*, filamentoso, de ARN hebra simple, monopartito y de alrededor de 18 kb. Dado lo poco que se conoce sobre este virus en Chile y lo difícil que se hace su detección, se decidió secuenciar el genoma de aislados chilenos. Esto permitió además iniciar el estudio del grado de variabilidad existente entre ellos y aislados extranjeros y obtener además anticuerpos específicos para desarrollar métodos eficientes de detección del virus. Con este fin, ARN viral obtenido de tejido infectado de vid, fue sometido a RT-PCR con partidores específicos y los fragmentos obtenidos fueron clonados en bacteria. Esto permitió confeccionar una colección de ADNc virales, la que fue posteriormente secuenciada. Se obtuvo la secuencia completa de la zona codificante de un aislado viral chileno y secuencias parciales del genoma de otros 3 aislados de nuestro país. El análisis de estas secuencias demostró que los aislados chilenos poseen entre ellos y con aislados extranjeros, una alta identidad nucleotídica en el gen estructural que codifica para la proteína de la cápside, de aproximadamente un 98%. Este gen posteriormente se clonó y expresó en *E. coli*. A partir de la proteína recombinante purificada, se desarrollaron anticuerpos policlonales en conejo y anticuerpos monoclonales en ratón. Mediante su uso se pudo detectar de manera eficiente el virus en plantas infectadas con GLRaV-3 por TAS-ELISA e IC-RT-PCR. Se concluye que la IC-RT-PCR es el método más sensible y recomendado para el diagnóstico del virus GLRaV-3 en plantas de vid.

SUMMARY

The grapevine leafroll disease (GLRaV) is the most widespread virosis of grapes in the world. It causes important losses to grape growers. Up to now, nine serologically different variants of GLRaV have been reported, and GLRaV-3 is the most frequent in the world and in Chile. GLRaV-3 is a filamentous single-stranded monoparite RNA Ampelovirus, of about 18 kb. Considering the limited knowledge about this virus in Chile and the difficulties of its detection, we decided to sequence the genome of Chilean viral isolates. This made it possible to analyze the variability among them and with foreign isolates, and also to produce specific antibodies to develop efficient methods to detect the virus in infected plants. With this purpose, viral RNA was extracted from infected grape tissue and RT-PCR carried out with specific primers and the resulting fragments cloned in bacteria. This allowed us to obtain a viral cDNA library that was then sequenced. The complete sequence of the coding region of one Chilean isolate and partial sequences of the genome from 3 other Chilean isolates were obtained. The sequence results indicate that the Chilean isolates have high nucleotide identity in the region coding for the capsid protein, of about 98%, between them and with the only foreign isolate that has been sequenced. This gene was then cloned and expressed in *E. coli*. Polyclonal and monoclonal antibodies were developed in rabbit and mouse, respectively from the purified recombinant protein. Using these reagents GLRaV-3 was efficiently detected in infected grapes by TAS-ELISA and IC-RT-PCR. It is also concluded that IC-RT-PCR is the most sensitive and recommended method for diagnosis of GLRaV-3.

}

I. INTRODUCCION

1. Agricultura y cultivo de la vid en Chile

Chile es un país en que la actividad agrícola, y principalmente la fruticultura constituye uno de los motores de la economía nacional, generando una importante fuente laboral. A nivel mundial, Chile se posiciona como uno de los principales exportadores de fruta fresca y sus derivados. Dentro de este contexto las vides aparecen como los frutales con la mayor producción estimada de huertos industriales. Actualmente, de las 220.000 ha totales del país destinadas a frutales (ODEPA, 2003), las vides superan las 172.000 ha (distribuidas entre la III y VIII regiones), dividiéndose en 52.685 ha destinadas a la uva de mesa, 9.853 ha a vides pisqueras y 110.097 ha a vides para la producción de vinos (SAG, 2003). En términos generales, la exportación de uva de mesa en el 2004, generó US\$ 835,2 millones, llegando a ser el producto exportado de mayor importancia dentro de los frutales. Por otra parte, ese mismo año los ingresos por exportación de vino llegaron a US\$ 707,1 millones, posicionándonos como el quinto exportador de vino a nivel mundial (ODEPA, 2005). En consecuencia el negocio del cultivo de la vid significa una entrada anual superior a US\$ 1.500 millones para nuestro país.

Es necesario considerar, no obstante, que aún existe un potencial de mejoramiento de la producción del sector vitícola y vitivinícola, dado que pese a existir las condiciones técnicas para garantizar la producción y exportación de uva, hay un déficit importantísimo en lo que a calidad de la producción se refiere. Uno de los factores determinantes en este sentido, es el alto grado de infecciones producidas por hongos, bacterias, fitoplasmas y virus, siendo las infecciones virales las de menor estudio en Chile. Las pérdidas económicas producidas por patógenos virales en vides son debidas a factores tales como la reducción del crecimiento,

alteración del color y sabor de las bayas, deformación, retraso en la maduración, aumento de la sensibilidad a otros patógenos y plagas, incompatibilidad variedad/portainjerto y muerte de la planta (Covarrubias, 1993). Las infecciones virales se caracterizan por su veloz diseminación a través de vectores, tipo insecto, nemátodos y el mismo hombre, lo que trae como consecuencia una mayor dificultad para su control.

A nivel mundial se han identificado 55 virus de vid, pertenecientes a 6 familias y 20 géneros (Martelli, 2003). Los de mayor importancia debido a las pérdidas económicas que acarrear son los pertenecientes a los géneros *Nepovirus*, tales como Grapevine Fanleaf Virus (GFLV), Arabis Mosaic Virus (ArMV), y *Ampelovirus*, dentro del cual se encuentran los Grapevine Leafroll associated Virus (GLRaV). En Chile se ha detectado la presencia de distintos tipos de virus que infectan vides, siendo los de mayor incidencia *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus 2* (GLRaV-2), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus A* (GVA) y el *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3), virus causante de la enfermedad conocida como enrollamiento clorótico de la vid (Prodan y col., 2003).

2. Virus del Enrollamiento Clorótico de la Vid

Este virus de distribución mundial se identificó por primera vez en California en 1958, y en 1988 en Chile (Arancibia, 1988), induce síntomas que se evidencian principalmente desde el inicio del verano hasta mediados de otoño. Las plantas severamente infectadas por este virus presentan una senescencia otoñal anticipada. Los principales síntomas son: malformación y decoloración de la lámina foliar, en variedades tintas el cambio de color es a rojo púrpura, mientras que en las blancas es a amarillo, mosaico intervenal y desarrollo deficiente de las bayas. Las alteraciones que se producen en el fruto son principalmente una baja en cuanto a concentraciones de azúcar, color y un cambio en la acidez del mosto por un aumento de ácido

máfico (Gugerli, 2003). El GLRaV produce una degeneración del floema de la planta, en los nuevos brotes, en hojas y pecíolos (Carstens, 2002). Sin embargo, plantas infectadas por el virus pueden presentarse como asintomáticas dificultando así su diagnóstico.

Se han realizado estudios para evaluar en plantas infectadas por GLRaV, la productividad de diferentes variedades de vides y el nivel de azúcares presentes en las bayas. Los resultados muestran que tanto la cantidad como la calidad del fruto disminuye considerablemente con respecto a plantas sanas, alcanzando niveles de disminución en la productividad superiores al 50% (Goheen y Cook, 1959; Walter y Martelli, 1997). Esto se ve reflejado no solo en un retardo en la acumulación de azúcar en el fruto, sino que también en una baja en la producción de antocianinas en cultivos para vino tinto, decoloración de los racimos y en un retardo en la maduración y cosecha (Carstens, 2002).

Se han descrito hasta ahora 9 formas serológicamente diferentes de este virus (GLRaV-1 a GLRaV-9), siendo el GLRaV-3 el de mayor incidencia y por lo tanto uno de los más perjudiciales para la industria vitivinícola nacional (Lillo y Pérez Harvey, 2002).



Figura 1. Sintomatología presentada por una vid infectada con GLRaV-3.

Se observa malformación y coloración roja en la hoja, síntomas característicos de la infección con GLRaV-3 en una variedad tinta (Merlot). Foto: Tom Zabadal.

2.1 GLRaV-3

El GLRaV-3 es uno de los virus que más pérdidas económicas genera en Chile, no sólo por su agresividad y velocidad de propagación, sino también, porque se ha reportado que la patología provocada por el complejo GLRaV no se propaga fácilmente en vides infectadas salvo que se encuentre presente GLRaV-3 (Ling y col., 1998).

Esta cepa se transmite mediante propagación vegetativa (injertos), y por vectores tales como chanchito blanco (*Planococcus ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni*, *Pseudococcus calceolariae* y *Planococcus citri*) y por la conchuela *Pulvinaria vitis*, (Ling y col., 1998).

El GLRaV-3 es un virus filamentoso y flexible de entre 1.800-2.000 nm de largo como se aprecia en la Figura 2A (Ling y col., 1997).

Este virus se replica asociado a vesiculaciones en la mitocondria y en el retículo endoplasmático (Hull, 2002). Dada su naturaleza de ARN puede incorporar mutaciones en su genoma durante la replicación (García-Arenal y col., 2001).

Su genoma, el cual ha sido totalmente secuenciado solo para el aislado de USA NY1 (acceso GenBank AF037268), es un fragmento de RNA de hebra simple y de orientación positiva de cerca de 18.000 nucleótidos (Ling y col., 2004). Contiene 13 marcos de lectura abiertos (Figura 2B), su estructura genómica constaría de tres módulos; el módulo accesorio que incluye los genes de la proteasa y del factor de especificidad para el vector, el módulo central presenta tres genes esenciales para la replicación viral los que codifican para la metiltransferasa, helicasa y una RNA polimerasa y el módulo chaperona-CP el cual contiene el gen que codifica para la chaperona homóloga a una HSP-70 encontrada en otros closterovirus (proteína de estrés térmico), el gen codificante de una proteína de 59 kDa de función

desconocida, y finalmente el gen estructural de la proteína de cubierta que encapsidaría la mayor parte del genoma del virus y su duplicado que codifica para la CPd que encapsidaría solamente una pequeña región correspondiente al extremo 5' del genoma (Ling et col., 1998). En sus extremos posee, un casquete (cap metilado) en 5' y una estructura de horquilla en 3'. (www.dpvweb.net/notes/showgenus.php?genus=Ampelovirus).

Análisis del genoma del virus muestran una mayor variabilidad en el extremo 5' que en otras regiones del genoma (Ling y col., 2004). Este virus posee una proteína de cubierta (CP) de 35 kDa, y se ha descrito que la zona del genoma que codifica para la CP es una de las menos variables entre virus del mismo género (Little y col., 2001).

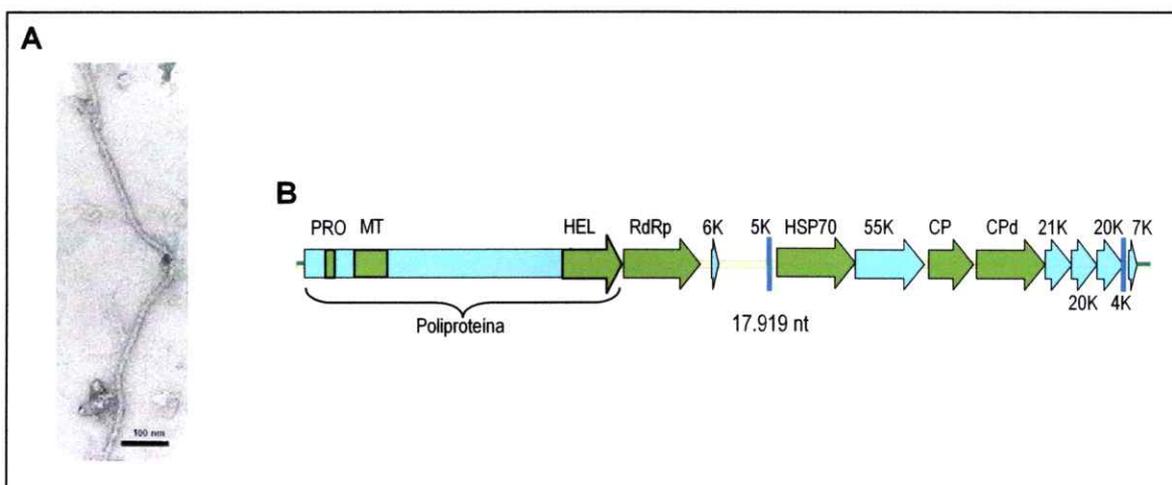


Figura 2. El virus del enrollamiento clorótico de vid (GLRaV-3).

A. Microscopía electrónica del virus filamentosos GLRaV-3 obtenida de Credi y Giunchedi, 1996. La muestra fue teñida con acetato de uranilo al 2%. La barra representa 100 nm.
B. Organización del genoma de GLRaV-3. Se muestran las diferentes proteínas codificadas, en verde las de función conocida y en celeste las desconocidas que se designan según su tamaño. PRO, proteasa de tipo papaína; MT, metil-transferasa; HEL, helicasa; RdRp, ARN polimerasa dependiente de ARN; HSP70, proteína de estrés térmico 70; CP, proteína de la cápside; CPd, proteína de la cápside divergente.

3. Sistemas de detección viral

En Chile, el estudio y diagnóstico de fitopatógenos en frutales es un tema relativamente reciente. El problema de la infección y transmisión de virus radica en la forma como se propagan los frutales; en la mayoría de los viveros se realiza mediante estacas, permitiendo que las enfermedades virales se perpetúen y diseminen en los campos. En nuestro país, la mayoría del material de propagación disponible para la venta, tanto para la uva de mesa como para vides viníferas, se caracteriza por provenir de plantas calificadas como corrientes. Esto significa que los viveros solo pueden acreditar que el material es obtenido de plantas madres vigorosas y aparentemente libres de enfermedades sobre la base de una inspección visual. No existen entidades públicas o privadas que cuenten con la infraestructura, capacidad técnica y financiera para certificar o producir plantas libres de virus. Recientemente en Chile, el Ministerio de Agricultura a través del Servicio Agrícola y Ganadero esa promoviendo un “Programa de Certificación Frutícola Nacional” (SAG, 2003). Para ello, basándose en programas similares europeos y norteamericanos y en la experiencia de fitopatólogos nacionales, se han definido los patógenos de los cuales deben estar libres los frutales, lista que incluye a GLRaV-3. Inicialmente la certificación será para vides, pomáceas, carozos, frutales menores, frutillas y cítricos, los que representan las especies frutícolas de mayor importancia económica para el país.

Sin embargo, la detección de patógenos virales se hace muy complicada, por el bajo título viral que presenta el tejido de plantas infectadas, la estacionalidad que presentan algunos virus y la consiguiente variación en la carga viral durante el año, la presencia de compuestos como polisacáridos y polifenoles que interfieren con los ensayos y finalmente, la poca sensibilidad y el alto costo de los métodos de detección disponibles en el mercado. El alto costo se debe a

que son productos de importación, lo que se traduce en un desinterés por parte de los productores frutícolas en adoptar tecnologías de detección viral en forma rutinaria.

Hasta hace poco tiempo, la tecnología de detección de virus se ha basado en el uso de tests serológicos, de tipo ELISA o similares, mediante el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales (Clark y col., 1977; Jordan, 1990). Sin embargo, se ha demostrado que este tipo de tecnologías no tienen la suficiente sensibilidad para la detección de virus, cuando estos se encuentran en bajos títulos, por ejemplo en tejidos leñosos y en vectores. Es por esto que tecnologías basadas en la reacción de PCR son las que apuntan a un mejor diagnóstico. Una de las tecnologías más avanzadas, en cuanto a sensibilidad, especificidad y capacidad de diferenciar variantes, es la IC-RT-PCR, que consiste en una etapa inicial de inmunocaptura (IC), que permite concentrar el virus y eliminar compuestos presentes en el extracto que suelen inhibir la transcriptasa reversa y la polimerasa (Nolasco y col., 1993; Rowhani y col., 1995; Leone y col., 1997). Además contempla una etapa de amplificación (PCR), posterior a la transcripción reversa (RT), que permite detectar mínimas cantidades de material viral.

El virus GLRaV-3 al igual que muchos otros virus que tienen un genoma de ARN, puede incorporar mutaciones en su genoma durante el proceso de replicación (García-Arenal y col., 2001). En consecuencia, kits de detección para virus desarrollados en el extranjero podrían ser menos eficientes en Chile. Reportes en la literatura demuestran que simples sustituciones de aminoácidos pueden afectar severamente la sintomatología viral (Shintaku y col., 1992; Hammond y Crosslin, 1998; Szilassy 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 importantes alteraciones de la capacidad infectiva viral y además la dificultad que presenta el diagnóstico de este virus, debido a que plantas infectadas pueden mostrarse como asintomáticas visualmente, justifica plenamente la necesidad de secuenciar aislados virales chilenos, lo que permitiría diseñar estrategias eficientes de diagnóstico y control viral. Por otro lado, los estudios más importantes hechos sobre la caracterización y variabilidad de los genomas de estos patógenos han sido realizados principalmente en el hemisferio norte, en Europa y USA. No hay información sobre la heterogeneidad genómica de las cepas virales aisladas en Chile.

4. Hipótesis

Variantes nativas del virus GLRaV-3 presentarían variabilidad genómica con respecto a aislados estudiados en otras zonas geográficas del planeta, que dificultaría su detección especialmente por sistemas de diagnóstico desarrollados en el extranjero.

5. Objetivo general

Secuenciar aislados chilenos de GLRaV-3, analizar la variabilidad de sus genomas, y expresar el gen que codifica para la proteína de la cápside en *E. coli*, con el fin de desarrollar anticuerpos que se utilicen en el diseño de métodos simples y eficientes para la detección del virus.

6. Objetivos específicos

- Extracción de ARN de aislados virales a partir de plantas de vid infectadas.
- Preparación de una genoteca de ADNc del virus en *E. coli*.
- Secuenciación del genoma viral de uno o más aislados locales.
- Clonamiento y expresión de la proteína de la cápside viral en *E. coli*.

- Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales contra la proteína de la cápside.
- Desarrollo de un método de diagnóstico eficiente para GLRaV-3

II. MATERIALES Y METODOS

1. Animales

En este trabajo se utilizaron ratones Balb/c y conejos New Zealand proporcionados por el vivero de BiosChile IGSA.

2. Células

Las células de *Escherichia coli* Novablue y BL21 (DE3) se adquirieron de Novagen.

3. Material de vid infectado

El material infectado de vid con virus fue proporcionado por el laboratorio del Ing. Agr. Nicola Fiore de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. La certificación de la infección con GLRaV-3 fue hecha mediante ELISA (kit italiano Agritest) y RT-PCR.

Se trabajó con distintos aislados de 2 cepas de *Vitis vinifera*, provenientes de distintas regiones del país. Estos fueron los aislados 766, 765 y 664 de la cepa Merlot (provenientes de la VI region) y los aislados 817, 279 y 346 de la cepa Chardonnay, provenientes de la región Metropolitana. El aislado 346 es el único que no presenta infección con GLRaV-3.

4. Reactivos

Las sales, ácidos, bases, bromuro de etidio y solventes utilizados son de grado analítico o de biología molecular y se adquirieron en Merck y Sigma. Las enzimas de restricción, Taq ADN polimerasa, T4 ADN ligasa, M-MLV transcriptasa reversa, RNasin, fosfatasa alcalina de ternero, X-GAL, IPTG, hexámeros de secuencia al azar, estándar de tamaño molecular λ/Φ de ADN, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, el estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas Benchmark ladder, y el reactivo glicerol se obtuvieron de Invitrogen y Promega. Los sistemas de purificación de productos de PCR, de ADN plasmidial y de extracción de ADN desde geles

de agarosa se obtuvieron de Qiagen. La triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron de Difco Laboratories. La agarosa se obtuvo de Sigma. Los anticuerpos anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón producidos en cabra, conjugados con FAL, se obtuvieron en Kirkegaard & Perry Laboratorios (KPL). El anticuerpo anti-IgG de ratón producido en conejo, conjugado con FAL, se obtuvo de Pierce. NBT, BCIP, azida de sodio, para-nitrofenilfosfato, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, Tritón X-100, CTAB, ácido ascórbico, espermidina, Tween 20, PBS y SDS fueron adquiridos de SIGMA. El β -mercaptoetanol se obtuvo de Merck. Las placas de ELISA de 96 pocillos Immulon 2HB fueron adquiridas de Nunc.

5. Partidores

Los partidores utilizados para las reacciones de PCR, poseen una longitud de entre 18-22 bases y su temperatura de hibridación se calculó en base a la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$, según la cual la mayoría de los óligos tiene una T_m entre 56°C y 62°C. Los partidores sentido se anotan con una F y los partidores reversos con una R. En azul se indican los sitios de nucleasas de restricción *Bam*H I de los partidores sentido, y en verde se indican los sitios *Not* I de los partidores reversos. A continuación se muestra la secuencia de cada partidor, la longitud esperada del amplicón y el código para su identificación.

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados para amplificar el genoma del virus GLRaV-3 y otros virus (GLRaV-1 y GFLV).

Nombre del partidor	Secuencia	Nombre y tamaño del producto obtenido
LC1F *	5'- cgc tag ggc tgt gga agt att-3'	A=546 pb
LC2R *	5'- gtt gtc cgg ggt acc aga tat-3'	
C547F *	5'- att aac ttg acg gat ggc acg -3'	B=340 pb
H229R *	5'- ata agc att cgg gat gga cc -3'	
LR3-H330F *	5'- gat gct ttc gcg tat ttc ttg -3'	C=300 pb
LR3-C629R *	5'- cgg cac gat cgt act ttc taa -3'	
KSL95-5F *	5'- atg gca ttt gaa ctg aaa tt -3'	H=1017 pb
KSL95-6R *	5'- tat aag ctc cca tga att at -3'	
LR33'F1 **	5'- aat gca cta aca aat aca tga t -3'	I=573 pb
LR33'R1 **	5'- agt tta gtc atc tta cct cg -3'	
LR3HSPF1	5'- aat ggt gag gaa gta aag aat g -3'	J=742 pb
LR3-C629 *	5'- cgg cac gat cgt act ttc taa -3'	

LR3CD3F1 LR3CD3R1 **	5'-tat ttt ttc gtc ttc tct tag g -3' 5'-ttg cct gtt taa aat cat cca t -3'	K=1388 pb
LR3 CD1F1 ** LR3CD1R1	5'-tag agc gct taa aat acg tag-3' 5'-cac tta aaa cgt gca aga cac-3'	L=765 pb
LR3CDS5F1 LR3CDS5R1	5'-tat gtg gac gta acg cag aat-3' 5'-ggg gac gac ttc ata tat ctg-3'	Q=1133 pb
LR3CPdF1 LR3CPdR1 **	5'- gat cga tgt cta taa att ggt g-3' 5'- tct gcg tag tct tgc gtt tat -3'	R=1006 pb
LR3CD10F1 ** LR3CD10R1	5'- aca agg aga aat tta agg gga -3' 5'- tgc ttc ttc aac tgc ggc ca -3'	S=1048 pb
LR3CD1F2 ** LR3CD1R2	5'- gaa ggg aaa agg aaa aga aac -3' 5'- cat ccc gtg gta gaa gag c- 3'	T=1025 pb
LR3K-AF1 LR3K-AR1	5'- att gaa gta ggc gta ttt gtt t -3' 5'- ctg ggt aaa agt tgt caa gac -3'	U=1121 pb
LR3R-SF1 LR3R-SR1	5'- cga taa cgg aag ctc tac ag -3' 5'- acg taa gta tct agt atg tct c -3'	V=1064 pb
LR3CD1F3 ** LR3CD1R3	5'- ccg ggc ttt cac gtt tac aa -3' 5'- gtt ttt gcc tgt gct tca tgc -3'	W=956 pb
LR3CD1F4 ** LR3CD1R4	5'- acg atc aat gaa ggc aag gc -3' 5'- aaa tga gat ctg tgc ccg ac -3'	X=1027 pb
LR3CD1F5 ** LR3CD1R5	5'- gtt tag gga cat tgc ttg gg -3' 5'- cgt cct aaa cat aca aag ctg -3'	Y=1028 pb
LR3CD1F6 ** LR3CD1R6	5'- caa tgg tgc acg ata act tca -3' 5'- ctt cca agt att cgc gct ag -3'	Z=1046 pb
LR3CD1F7 ** LR3CD1R7	5'- cat gta tgc aat cca gtc cta -3' 5'- ctg ggc ata gac ata agc gt -3'	A1=1028 pb
LR3CD1F8 ** LR3CD1R8	5'- ctg gga tga agc ctc tcg ta -3' 5'- tct cat tga ttc tcc gct tc -3'	A2=905 pb
LR3CD1F9 ** LR3CD1R9	5'- cta agt aac acc tag gaa ttt c -3' 5'- taa cag ctc tat ctt tga cgt a -3'	A3=948 pb
LR3CPexpF1 LR3CPexpR1	5'- ata gga tcc atg gca ttt gaa ctg aaa tt -3' 5'- aca ggc gcc gcc tac ttc ttt tgc aat agt tgg -3'	EXP=942 pb
LR1CPF1 LR1CPR1	5'- cta gcg tta tat ctc aaa atg a -3' 5'- ccc atc act tca gca cat aaa-3'	502 pb
LR1CPR2	5'- cat tgt taa tca ccg cag tac -3'	
M2F * M4R *	5'- A/G/CtA/G gat ttt agg ctc aat gg -3' 5'- gtA/C atc cac ttA/C/G/T/tca tac tg -3'	814 pb

Nota: * partidores descritos en la literatura. ** partidores basados en el aislado NY1.

6. Vectores

Para la construcción de la genoteca de ADNc viral se utilizó el vector pGEM-T (obtenido de Promega) diseñado especialmente para la clonación de productos de PCR. Este vector posee una timidina en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que permite la ligación de segmentos de ADN obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra. Para la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizaron dos

vectores. El vector pGEX-6P-1, obtenido de Amersham-Pharmacia, produce una proteína recombinante fusionada a glutatión-S-transferasa (GST) en el extremo 5' lo que permite su posterior purificación. El vector pET-32a(+), obtenido de Novagen, produce una proteína recombinante fusionada a tioredoxina (TRX) de *E. coli* y a un péptido de 6 histidinas que permite su posterior purificación. Las estructuras de estos plásmidos se muestran en la Figura 3.

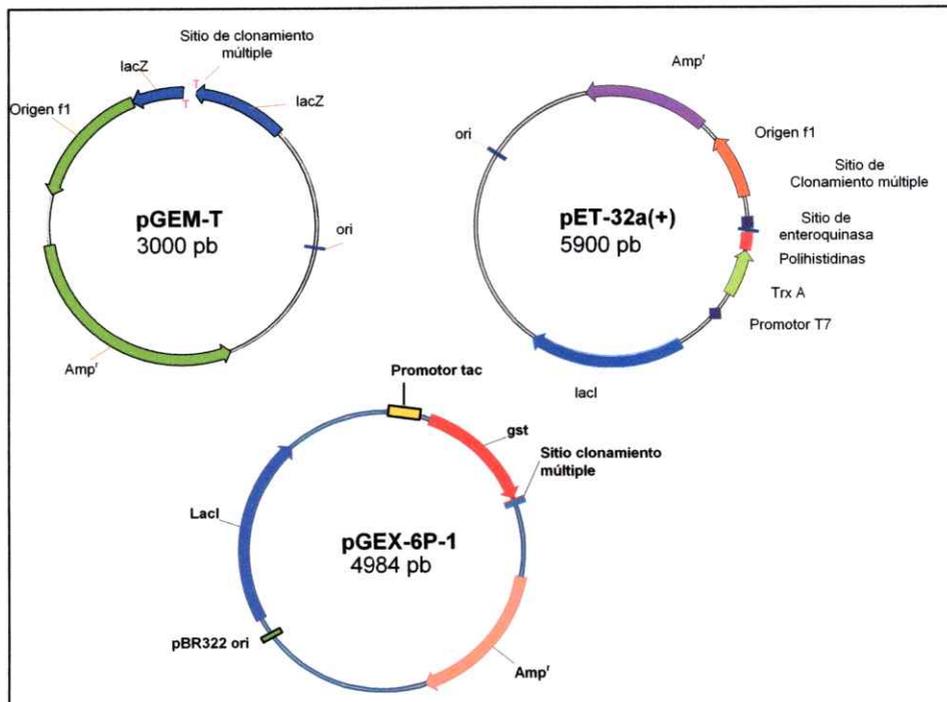


Figura 3. Esquema de los vectores pGEM-T, pET-32a y pGEX-6P-1.

El vector pGEM-T se compone de un sitio de clonamiento múltiple para productos de PCR; *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *F1 ori*, origen de replicación para producir ADN de hebra simple; *ori*, origen de replicación y *lacZ*, región codificante para la β -galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento.

El vector pGEX-6P-1 de expresión en *E. coli* se compone de *ori*, origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; *Amp^r*, gen para resistencia a ampicilina; *gst*, gen codificante para la glutatión-s-transferasa (GST) controlado por el promotor Tac, que permite alta expresión inducible por IPTG; un sitio de clonamiento múltiple y un sitio de corte para la proteasa Precission (Amersham-Pharmacia) para escindir la GST de la proteína de interés.

El vector pET-32a(+) de expresión en *E. coli* se compone de *ori*, origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina; *Origen f1*, origen de replicación del fago f1; *lacI* represor del operón lac; promotor de T7; *Trx*, gen de tioredoxina A de *E. coli*; sitio de corte con enteroquinasa y la secuencia codificadora para un péptido de polihistidinas.

7. Preparación de extractos proteicos de vid

Se extrajeron proteínas totales de vid infectadas con GLRaV-3 para ser analizadas mediante *Western blot*, inmunocaptura RT-PCR (IC-RT-PCR) y ELISA con anticuerpos policlonales y monoclonales específicos contra la proteína de cubierta del virus. El protocolo consistió en extraer con un bisturí el tejido floemático de sarmientos de vid infectada y homogenizarlo en una solución de extracción de proteínas de vid (Tris 0,2 M pH 8,2; NaCl 0,14 M; PVP (40000) 0,5 mM; PEG (6000) 1,9 mM, NaN₃ 0,2 M, Tween 20 0,5 ml), en una relación tejido:tampón = 1:4. Luego la muestra se centrifugó 2 veces a 8000 x g por 5 min a 4°C, rescatando cada vez el sobrenadante de la centrifugación.

8. Preparación de ARN total de vid

Para esto se utilizó el método de Chang y col., 1993 modificado. Todas las soluciones se prepararon en agua libre de nucleasas por tratamiento con DEPC. Se extrajo el floema de vid infectada a partir de sarmientos lignificados y se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se agregaron 600 µl de tampón de extracción (CTAB 2% p/v, PVP 2% p/v, Tris-HCL 100 mM pH 8; EDTA 25 mM, NaCl 2 M, espermidina 0,5 M, ácido ascórbico 8 mM, β-mercaptoetanol 2% v/v) precalentado a 65°C a 100 mg de tejido molido. Se incubó a 65°C por 5 min agitando vigorosamente cada 1 min y se realizaron dos extracciones con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando cada vez a 10000 x g por 8 min y rescatando la fase acuosa. Luego se agregó un cuarto del volumen del sobrenadante obtenido de cloruro de litio 10 M y se precipitó toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se centrifugó a 10.000 x g y 4°C por 25 min. La pella obtenida se secó a temperatura ambiente invirtiendo los tubos y se resuspendió en agua libre de nucleasas con 0,5% SDS. Luego se realizó una extracción con cloroformo:alcohol

isoamílico (24:1). La fase acuosa rescatada se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% por 45 min a -80°C , se centrifugó a $10.000 \times g$ y 4°C por 20 min. La pella obtenida se secó y luego se resuspendió en $40 \mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas.

9. Transcripción reversa

La transcripción reversa (RT) se realizó usando como templado ARN total en una cantidad máxima de $2 \mu\text{g}$. Se utilizaron hexámeros al azar (50 ng). Se incubó el ARN y los hexámeros por 5 min a 70°C . Luego de incubar en hielo por 5 min, la mezcla de reacción se completó a un volumen de $25 \mu\text{l}$ agregando $5 \mu\text{l}$ del tampón 5X suministrado con la enzima, 25 unidades de inhibidor de RNasa (RNasin), 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV, dNTP $10 \mu\text{M}$ final y agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h.

10. Amplificación de ADN por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos Eppendorf autoclavados de $600 \mu\text{l}$ en los que se agregaron los siguientes componentes: $5 \mu\text{l}$ de solución PCR 10 X sin Mg, $1,5 \mu\text{l}$ de MgCl_2 50 mM , $4 \mu\text{l}$ de mezcla de dNTP 10 mM , $2,5 \mu\text{l}$ de cada partidor a una concentración $10 \mu\text{M}$, $50\text{-}200 \text{ ng}$ de ADN templado, $0,5 \mu\text{l}$ de Taq ADN polimerasa $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ y se completa a un volumen final de $50 \mu\text{l}$ con agua miliQ estéril. Luego los tubos se incubaron en un termociclador modelo PTC-200 MJ Research con un programa que incluye una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min y luego 30 ciclos de amplificación, cada uno de ellos consta de una etapa de desnaturalización a 94°C por 1 min, una etapa de apareamiento a $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$ durante 1 min (la temperatura depende de la T_m de los partidores que se utilicen) y una etapa de extensión a 72°C por 1 min (se utiliza 1 min de extensión por cada kilobase de ADN a amplificar). Finalmente se realizó una etapa de elongación por 10 min a 72°C .

La purificación de los productos de PCR se realiza con el kit Qiaquick de Qiagen siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

11. Análisis de ADN y ARN en geles de agarosa

El análisis de ARN y ADN mediante electroforesis se realizó en geles de agarosa de una concentración ajustada al tamaño del ácido nucleico a observar (entre 0.8% y 2%) en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,3) y bromuro de etidio 0,2 µg/ml. Para cargar las muestras en el gel, se les agregó 1/10 del volumen de una solución de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v y glicerol 50% v/v en TE). Se utiliza como estándar de peso molecular una mezcla del fago λ Hind III mezclado con Φ X174/Hae III, que contiene fragmentos que van desde los 70 pb hasta 23 kb. El gel se corre a 100 V, en tampón TAE 1X y posteriormente los ácidos nucleicos se observan en el gel sobre un transiluminador UV desde donde se fotografian.

12. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Para purificar ADN desde geles de agarosa, se utilizó el Kit Rapid Gel Extraction System, de Quiagen. Se cortó el segmento de interés desde un gel confeccionado con agarosa de alta pureza y bajo punto de fusión, se colocó en un tubo Eppendorf limpio y se procedió de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante.

13. Digestión con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción, se realizó empleando el tampón de reacción recomendado por el fabricante para cada enzima. Las enzimas utilizadas a lo largo de esta tesis fueron *Bam*H I, *Eco*R I y *Not* I. La cantidad necesaria de ADN, sea éste plasmidial o un producto de PCR, se mezcla con un volumen del tampón 10X apropiado para la enzima de

restricción, correspondiente a un décimo del volumen final de reacción. Así mismo, se agrega la enzima de restricción en una relación de 5 unidades por microgramo de ADN a digerir y el volumen final de reacción se completa con agua bidestilada. La mezcla se incuba a 37°C por 1-4 horas.

14. Desfosforilación y purificación de pGEX-6P-1 y pET-32a(+)

El vector previamente digerido con las endonucleasas *Bam*H I y *Eco*R I se desfosforiló para evitar su autoligación. Para esto se utilizó la enzima fosfatasa alcalina de becerro siguiendo las instrucciones del fabricante. A 5-10 µg de ADN plasmidial previamente linearizado, se le agregaron 10 µl de la solución tampón 10X que es suministrada con la fosfatasa y 2 unidades de dicha enzima, agregando agua desionizada hasta completar 100 µl de volumen final. Esta mezcla se incuba durante 1 h a 37°C. Posteriormente la enzima se inactivó agregando EDTA a una concentración final de 10 mM y se incubó por 15 minutos a 75°C. Finalmente se procedió a realizar una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1. La fase acuosa se extrajo nuevamente con cloroformo:alcohol isoamílico y luego se precipitó el ADN con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

15. Ligación de fragmentos de ADN a vectores

Los fragmentos purificados de ADN, amplificados por PCR o extraídos desde geles de agarosa, fueron ligados a los vectores de clonamiento o expresión en una relación de 1:10 de vector a fragmento. La reacción de ligación se realizó en 10 µl con 1 U de ligasa T4 (Promega) en el tampón de ligación correspondiente. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente.

El producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* competentes.

16. Preparación de células *E. coli* competentes

Células de *E. coli* Novablue y BL21 se cultivaron en medio LB estéril (10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura y 5 gr de NaCl por cada litro). Inicialmente se preparó un inóculo de 100 µl de bacterias (a partir de un stock de glicerol) a las cuales se le agregó 5 ml de medio LB estéril y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente este cultivo se agregó a 500 ml de medio LB estéril. El cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6-0,8 a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se centrifugó a 3500 x g por 10 minutos a 4°C y la pella se resuspendió en 250 ml de NaCl 10 mM estéril y frío. Se volvió a centrifugar en las condiciones antes descritas y las células se resuspendieron en 250 ml de CaCl₂ 75 mM, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se volvieron a centrifugar. La pella de células se resuspendió en 60 ml de CaCl₂ 75 mM y glicerol 15% v/v, ambos estériles y fríos. Las células se dejaron en hielo por 3 h, se alicuotaron en tubos Eppendorf estériles y se congelaron rápidamente en etanol con hielo seco para ser finalmente almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso (Sambrook y col., 1989).

17. Transformación de *E. coli* competentes

Un volumen de 100 µl de células competentes previamente descongeladas y reposadas en hielo durante 30 min, se mezcló con 10 µl del producto de ligación y se incubó por 30 min en hielo. Luego se sometió a un shock térmico a 42°C por 1 minuto y se incubó en hielo por 2 minutos. A continuación se agregó 900 µl de medio SOC (Sambrook y col, 1989) estéril y se incubó en un agitador a 37°C y 200 rpm durante 60 min. Posteriormente se centrifugó por 1 min a 2500 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 LB que contienen ampicilina 50 µg/ml. En el caso del vector p-GEM-T, se realizó una selección por α-complementación agregando 20 µl

de X-GAL 50 mg/ml y 10 μ l de IPTG 1M. Estas placas se incubaron invertidas durante toda la noche en una estufa a 37°C.

18. Purificación de ADN plasmidial

Para la extracción plasmidial desde células bacterianas, se comenzó con 2-5 ml de cultivo bacteriano incubado anteriormente toda la noche (8-10 horas con agitación a 37°C). El cultivo se centrifugó a 5000 x g por 1-2 min para obtener una pella concentrada de bacterias. A partir de esta pella se obtuvo el ADN plasmidial siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante del kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

19. Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN se secuenciaron usando el método de Sanger modificado (Sanger y col., 1977), utilizando el Kit comercial Bigdye 2.0 fabricado por Perkin Elmer y un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer fabricado por Applied Biosystems. Para esto se utilizaron partidores específicos para las secuencias que flanquean el inserto como los partidores PUC/M13 Fw y PUC/M13 Rv propios del vector pGEM-T. En algunas ocasiones se utilizaron también los partidores propios de cada amplificado.

20. Análisis de secuencias

Las secuencias se alinearon, corrigieron y ensamblaron con el programa Vector NTI suite 8.0 obtenido de Invitrogen. De la misma manera se realizaron algunos alineamientos utilizando el programa ClustalX. La comparación de las secuencias con la base de datos del NCBI se realizó mediante el algoritmo BLASTN que compara la secuencia nucleotídica contra una base de datos), BLASTX que compara la secuencia nucleotídica traducida en todos sus marcos de lectura (6) contra una base de datos de proteínas y BLASTP que compara la secuencia

aminoacídica contra una base de datos de proteínas (Altschul y col., 1997). La búsqueda de dominios con función conocida de proteínas se realizó mediante PSI-BLAST (Altschul y col., 1997) e Interpro (Mulder y col., 2005). Los árboles filogenéticos se realizaron con el programa Mega2 (Kumar y col., 2001), utilizando el método de *neighbour-joining* (Saitou y Nei., 1987).

21. Preparación de proteínas recombinantes en *E. coli*

A. Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes

La proteína de cubierta del virus se expresó en células *E. coli* BL21 DE3 previamente transformadas con los vectores recombinantes pGEX-6P-1-cp y pET32a-cp. Para inducir la expresión de las proteínas, 50 ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 50 µg/ml) se inocularon con 1 ml de cultivo bacteriano correspondiente al clon. La mezcla se incubó a 37°C con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.5-0.7 a una longitud de onda de 600 nm. Luego, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó con agitación para la expresión de la proteína recombinante. Para evaluar la cinética de inducción, se tomaron muestras de 1 ml de inducción 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, éstas se centrifugaron por 3 min a 5000 x g. La pella bacteriana obtenida se resuspendió en 200 µl de tampón PBS con PMSF 1 mM. Las muestras fueron sonicadas mediante 3 pulsos de 15 segundos cada uno. Los extractos obtenidos se centrifugaron por 10 min a 15000 x g a 4°C con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble. Ambas fracciones fueron luego analizadas en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes.

B- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras proteicas a analizar se mezclaron con 1 volumen de tampón de carga 2X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10% v/v; SDS 3% p/v; azul de bromofenol 0,00125% p/v; β -mercaptoetanol 5% v/v), en el caso de las fracciones proteicas insolubles estas se resuspendieron directamente en 100 μ l de tampón de carga 2X. Las muestras se calentaron a 100°C por 5 min y luego se cargaron en un gel de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida-SDS se prepararon según Laemmli (1970). Estos constan de una porción concentradora (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4% p/v; acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 4,5% p/v; TEMED 0,3% v/v; PSA 0,3% v/v) y una separadora (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4% p/v; acrilamida:bis-acrilamida (30:1) 12,5% p/v; TEMED 0,3% v/v; PSA 0,3% v/v). La solución de corrida del gel corresponde a tris-glicina. (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1% p/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante entre 100 y 120 volts hasta que el frente de corrida cayó del gel, generalmente entre 2 y 2,5 h. Como referencia se cargó también un estándar de Invitrogen *BenchMark prestained protein ladder* que incluye tamaños de proteína de 8,4 kDa hasta 176,5 kDa. Posteriormente el gel se tiñó en una solución de tinción (ácido acético glacial 10% v/v; metanol 45% v/v; azul de Coomassie 0,25% p/v) durante 20-30 min con agitación y se destiñó en la misma solución sin colorante. Los geles se secaron en un secador modelo 543 Gel Dryer de la marca Bio-Rad a 80°C durante 40 min en condiciones de vacío.

C- Purificación de las proteínas recombinantes

50 ml del cultivo bacteriano inducido (ver sección 21A) se centrifugó a 5000 x g a 4°C por 10 min. La pella bacteriana obtenida se resuspendió en 4 ml de PBS con PMSF 1 mM y se homogenizó con un sonicador mediante 3 pulsos de 1 min cada uno. La suspensión obtenida

se centrifugó a 14000 x g a 4°C por 15 min con el fin de separar la fracción proteica soluble de la insoluble. La proteína recombinante se encontró en la fracción insoluble por lo que se determinó su solubilidad en soluciones crecientes de urea (1 M-6 M) y N-lauroílo sarcosina de sodio o sarcosil (0,8%-2%). Para esto se resuspendió en paralelo la pella proteica correspondiente a 200 µl de sonicado con 1 ml de PBS 1X con cantidades crecientes de urea desde 1M a 6M y de la misma manera con el tampón STE (Tris 10 mM pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) con concentraciones crecientes de sarcosil, entre 0,8% y 2%. Luego de determinada la concentración óptima para solubilizar cada proteína recombinante, se procedió a su purificación. En el caso de la proteína recombinante TRX-CP, se utilizó 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. Para purificar la proteína recombinante GST-CP766 se utilizó la resina glutatión-sefarosa según esta descrito por Frangioni y Neel (Frangioni y Neel, 1993). Esta resina tiene alta afinidad por la glutatión-S- transferasa presente en la proteína de fusión. Las proteínas fueron recolectadas en distintas eluciones de las columnas con concentraciones crecientes de imidazol y glutatión respectivamente como indica el fabricante.

Por otra parte se purificó la proteína GST-CP766 cortando la banda correspondiente a la proteína recombinante (60,43 kDa) desde un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes con el fin de inyectarla en conejo para producir anticuerpos policlonales.

D- Concentración de proteínas recombinantes

Se concentraron los eluidos obtenidos de la purificación que contenían la proteína de interés mediante un módulo de ultrafiltración con agitación de Amicon. Este sistema utiliza una

membrana de exclusión por tamaño, en este caso de 10 KDa. Se hace presión con un gas inerte (N₂) a alta presión para concentrar la proteína de interés.

E- Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las fracciones purificadas se determinó cargando cantidades crecientes de proteína purificada (2 µl-10 µl) y comparándola con cargas de concentraciones crecientes de BSA (0,5 µg-8 µg) en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes.

22. Inmunización de ratones y conejos con proteína recombinante y obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales

Se inyectaron 3 ratones Balb/c intraperitonealmente con aproximadamente 50 µg de proteína en 200 µl de una emulsión con adyuvante de Freund 1:1. La primera inyección se realizó con adyuvante de Freund completo y los refuerzos a los 14 y 30 días se realizaron con adyuvante de Freund incompleto. La sangría se realizó a los 40 días posteriores a la primera inyección y se evaluó el título de los antiseros mediante ELISA y *Western blot* con la proteína recombinante TRX-CP.

Para la fusión y producción de anticuerpos monoclonales se eligió aquel ratón que presentó el mejor título. Adicionalmente se inyectaron subcutáneamente 2 conejos con aproximadamente 500 µg de proteína en una emulsión con adyuvante de Freund 1:1. Se realizaron cinco inmunizaciones cada 15 días, la primera con adyuvante de Freund completo y los refuerzos con adyuvante de Freund incompleto. Posteriormente se sangró el conejo. Finalmente se evaluó el título de los líquidos ascíticos y antiseros policlonales mediante ELISA y *Western blot*. Todo el proceso para la obtención de anticuerpos fue desarrollado en colaboración con Juanita Bustamante de BiosChile IGSA.

23. ELISA

A- ELISA para la titulación de anticuerpos.

Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano las cuales se recubrieron con un bioadhesivo obtenido de la cholga (*Aulacomya ater*) (Burzio y col., 2000). A cada pocillo se agregaron 50 μ l de una solución con 3 μ g/ml del adhesivo y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Luego se eliminó esta solución y se secó la placa 30 min a 37°C. Para activar la placa se agregó a cada pocillo 50 μ l de una suspensión con 10 μ g/ml de proteína recombinante purificada en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Se bloqueó usando 350 μ l de una solución caseína-sacarosa al 2% a 37°C por 1 h y se secó la placa a la misma temperatura y tiempo. A continuación se agregó 50 μ l de los sueros a analizar a cada pocillo en diluciones seriadas en base 2, con solución de bloqueo, partiendo con una dilución 1:4. La placa se incubó 3 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 a 0,02% por 5 min cada vez. Se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón o de conejo según corresponda, conjugado a fosfatasa alcalina desarrollado en cabra (KPL), con 50 μ l de una dilución 1:1000 en solución de bloqueo por pocillo. Las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavó 4 veces como se indicó anteriormente. El revelado se realizó incubando 50 μ l por pocillo de una solución 1 mg/ml de paranitrofenilfosfato (PNPP) en tampón FAL (NaCl 100 mM, Tris 100 mM, MgCl₂ 5 mM; pH 9,5) a 37°C por 30 min. El revelado se detuvo agregando 50 μ l de una solución de NaOH 3 N. Finalmente la placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA ELX 800 de Biotek Instruments Inc.

B- TAS-ELISA para la detección de vides infectadas.

Se utilizaron los anticuerpos del kit comercial Bioreba y los anticuerpos desarrollados durante esta tesis, contra la proteína de la cápside del virus para la implementación de un TAS-ELISA (Kerschbaumer y col., 1997).

Se activó una placa de 96 pocillos incubando a 37°C por 3h con 200 µl de una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal en tampón de captura (Na_2CO_3 1,59 M, NaHCO_3 2,93 M, NaN_3 0,2 M, pH 9,6) por pocillo. Se lavó 4 veces con 200 µl de solución de lavado (NaCl 8 M, KH_2PO_4 0,2 M, Na_2HPO_4 1,15 M, KCl 0,2 M, Tween 20 0,5 M, NaN_3 0,2 M, pH 7,4). Posteriormente se incubó la placa con 200 µl por pocillo de un extracto de proteínas de vid (ver sección 7), toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 4 veces con 200 µl de tampón de lavado y se incubó con el segundo anticuerpo (monoclonal) con 200 µl por pocillo de una dilución 1:15000 en tampón de conjugado (Tris 2,4 M, NaCl 8 M, PVP 20 M, Tween 20 0,5 M, BSA 2 M, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, KCl 0,2 M, NaN_3 0,2 M, pH 7,4) por 4 h a 37°C. Se lavó 4 veces con solución de lavado y se incubó la placa por 1 h a 37°C con un tercer anticuerpo anti-IgG de ratón producido en conejo y acoplado a fosfatasa alcalina obtenido de Pierce. Se utilizaron 50 µl del tercer anticuerpo en una dilución 1:7000 en tampón de conjugado. Se lavó la placa 4 veces con 200 µl de tampón de lavado. Finalmente se reveló incubando con 200 µl por pocillo de la solución de revelado (ver sección 23-A) por 1 h 20 min a 37°C. La lectura de la placa se realizó a 405 nm.

24. Western blot

Las muestras de proteínas recombinantes purificadas 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 de 0,45 μ m durante 1 h a 100 V en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8, metanol al 20%). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% durante 1 h. Luego se incubó con el primer anticuerpo diluido 1:500 en el caso de utilizar el suero policlonal y 1:1000 para el anticuerpo monoclonal. Estos se diluyeron en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% y la membrana se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó 3 veces durante 10-15 min cada con TBS-T 0,02% y agitación. A continuación se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón) conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:3000 en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% por una hora. Luego se lavó 3 veces durante 10-15 min con TBS-Tween 0,02% y agitación.

El revelado se realizó incubando la membrana en 20 ml de solución de revelado o tampón FAL (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM, pH 9,5) adicionada con los sustratos nitrobluetetrazolium NBT (0.33 mg/ml) y 5-bromo-4 cloro-3 indolilidil fosfato BCIP (0.17 mg/ml). La membrana se mantuvo en esta solución hasta que aparecieron bandas coloreadas. La reacción se detuvo agregando tampón de detención (EDTA 2 mM, Tris 20 mM pH 7,4). Las membranas se lavaron posteriormente con agua destilada.

25. Purificación de inmunoglobulinas totales

De acuerdo al protocolo descrito por Harlow y Lane (1988), 5 ml de antisuero policlonal obtenido de conejo se centrifugaron por 30 min a 3000 x g. Posteriormente se transfirió el

sobrenadante a un matraz de 250 ml y se agregó suavemente 0,5 volúmenes de sulfato de amonio saturado. Se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la mezcla se centrifugó por 30 min a 3000 x g. El sobrenadante rescatado se transfirió a un nuevo matraz con agitación magnética. Luego se agregó sulfato de amonio saturado hasta llegar a una concentración final del 50% de saturación (0,5 volúmenes del volumen inicial). Se centrifugó nuevamente a 3000 x g por 30 min y se descartó el sobrenadante. La pella se resuspendió en 1,5 ml de PBS. Finalmente se dializó contra 3 cambios de PBS de toda la noche y la solución dializada se centrifugó para eliminar componentes remanentes del suero.

26. IC-RT-PCR

Se modificó el protocolo descrito por Sefc (Sefc y col., 2000). Tubos Eppendorf de 0,6 ml se incubaron con 50 µl de una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal concentrado (ver sección 25) o de una dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal en la solución de captura (NaHCO₃ 0,1N pH 9,5), por 1h 30 min a 37°C. Posteriormente se lavaron 3 veces los tubos con PBS-Tween 20 0,05% y se incubaron con 50 µl de un extracto de proteínas de vid toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 0,05%. En el mismo tubo se hizo la transcripción reversa en un volumen final de 45 µl. Se agregaron 2,5 µl de los partidores LC2 y LR3C629 (10 µM final) y 10 µl de agua DEPC a cada tubo. Se incubó la mezcla a 72°C por 5 min. Luego de incubar en hielo por 5 min, se completó la mezcla de reacción agregando 10 µl del tampón 5X suministrado con la enzima, 4 µl de dNTP (10 µM final), 25 unidades de inhibidor de RNasa (RNasin), 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV y agua DEPC. La mezcla de reacción se incubó por 1h a 37°C.

La reacción de PCR se llevó a cabo tomando 10 µl de la reacción de transcripción reversa (50-200 ng de ADN templado) a los que se agregó 2,5 µl de solución PCR 10 X sin Mg, ajustando

las concentraciones de sales con 1,2 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 μ l de Triton 5%, 3,6 μ l de KCl 18mM, 4 μ l de mezcla de dNTP 10 mM, 2,5 μ l de cada partidor (LC1F y LC2R) a una concentración 10 μ M, 0,5 μ l de Taq ADN polimerasa 5 U/ μ l y se completó a un volumen final de 50 μ l con agua miliQ estéril. La incubación en el termociclador se realizó como se explicó anteriormente (sección 10).

III. RESULTADOS

1. Selección del material vegetal

Como se mencionó en Materiales y Métodos se trabajó con los aislados 766, 817, 765, 664, 279 y 346 de distintas variedades de *Vitis vinifera* y provenientes de las regiones IV y RM de Chile. Estas plantas fueron provistas y analizadas previamente en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile, mediante ELISA (kit Agritest) y RT-PCR para certificar la infección con GLRaV-3 y evaluar la presencia de otros virus. Todos los aislados salvo el 346, el cual se utilizó como control negativo en ciertos ensayos por no estar infectado con GLRaV-3, dieron reacción positiva solo para GLRaV-3. El aislado 766 fue seleccionado para ser amplificado y secuenciado, debido a la mayor disponibilidad de material infectado de este aislado y por presentar mayor agresividad en la infección. Los aislados 817, 765 y 664 solo se amplificaron y secuenciaron parcialmente en ciertas zonas del genoma, con el fin de realizar estudios comparativos entre aislados chilenos de GLRaV-3. Finalmente los aislados 279 y 346 solo fueron utilizados para ensayos inmunológicos, como control positivo y negativo respectivamente por presentar una carga viral muy alta el primero y el segundo por no estar infectado con GLRaV-3.

2. Extracción de ARN total de vid

La extracción de ARN total de vid se realizó a partir de tejido rico en floema, sarmientos lignificados de vid, como se menciona en Materiales y Métodos. Se eligió este tejido para realizar la extracción ya que según nuestro proveedor de material infectado, después de probar varios tejidos, este fue con el que se obtuvo mayor calidad y cantidad de ARN total (Nicola Fiore, Facultad de Agronomía, U. de Chile, comunicación personal). Además este tejido se

encuentra disponible durante todo el año, y la carga viral presenta menor estacionalidad que en otros tejidos.

Como se puede apreciar en la Figura 4, el ARN ribosomal de vid se ve intacto. Se distinguen de manera nítida las distintas bandas ribosomales y no se aprecia degradación, por lo que podemos inferir que gran parte del ARN viral se encuentra en buenas condiciones. Además para confirmar la calidad del ARN extraído, se realizó una transcripción reversa y amplificación por PCR con partidores específicos para el gen de la enzima malato deshidrogenasa de vid (MDH). Estos partidores amplificaban el gen con intrón por la presencia de ADN genómico y el mensajero de este gen (Stewart y Nassuth, 2001). Los resultados indicaron que se obtuvo una banda del tamaño esperado, que correspondía al ARNm (resultados no mostrados).

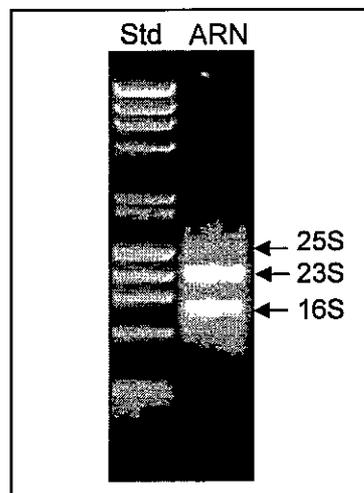


Figura 4: Análisis electroforético de ARN total de vid.

Se observan las bandas correspondientes a los distintos ARN ribosomales en un gel de agarosa al 1%.

3. Obtención y amplificación de ADNc viral

Una vez verificada la integridad del ARN extraído de vid infectada, este se sometió a una transcripción reversa como se describe en Materiales y Métodos con el fin de obtener ADNc

viral. Posteriormente se utilizaron partidores específicos para GLRaV-3 obtenidos de la literatura y otros diseñados basándose en la secuencia completa del genoma de un aislado de USA disponible en GenBank y en base a las secuencias que se fueron obteniendo (Tabla 1).

Mediante PCR se amplificaron 20 fragmentos de distinto tamaño del aislado 766 que se sobrelapan en sus extremos (Tabla 1), los que cubren el 99,1% del genoma del virus, quedando solo por secuenciar alrededor de 200 pb en la región 3' UTR, como se puede observar en la Figura 5A. Estos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa donde se confirma el tamaño esperado de los fragmentos. En la Figura 5B, se muestran algunos ejemplos de amplicones obtenidos.

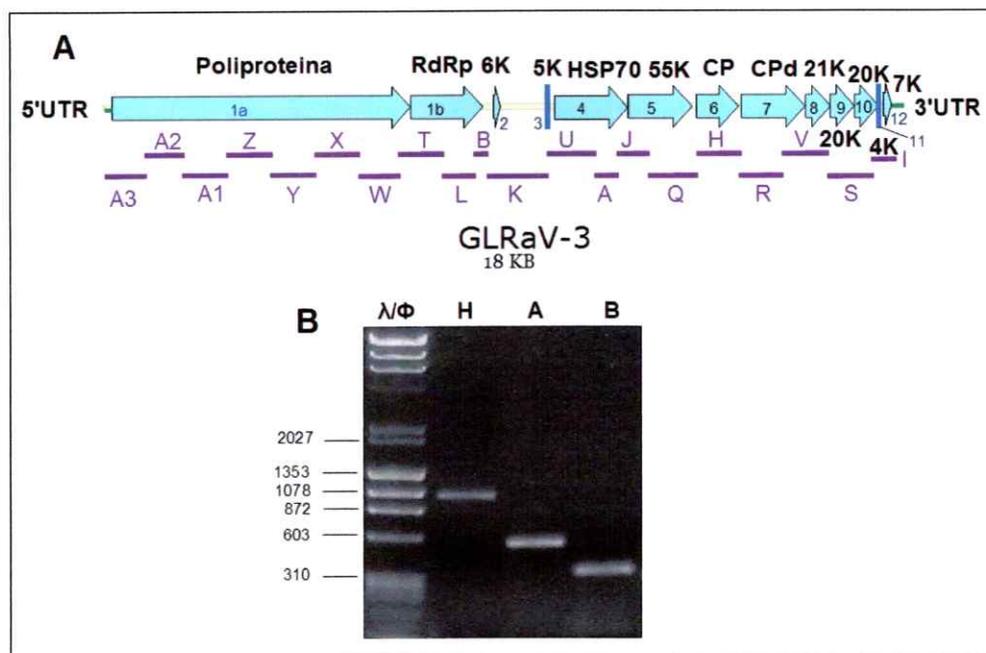


Figura 5. Amplificación del genoma de GLRaV-3 mediante PCR.

A. Organización en el genoma de los distintos amplificados obtenidos mediante RT-PCR. Se muestran con flechas y barras (en calipso y azul) los 13 ORFs descritos para el genoma de GLRaV-3. **B.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de los amplificados H (1.017 pb), A (546 pb), B (340 pb). λ/Φ corresponde al estándar de tamaño de ADN en pb.

4. Clonamiento, secuenciación y análisis del genoma viral

Confirmado el tamaño de cada producto de PCR, éstos se purificaron y se clonaron en el vector pGEM-T, el cual se utilizó para transformar células competentes *E. coli* NovaBlue. Los clones recombinantes fueron analizados mediante digestión con endonucleasas de restricción, mediante lo cual se confirmó el tamaño de los insertos clonados. Se secuenciaron 2 veces en ambos sentidos los clones recombinantes obtenidos, confirmándose la validez de las secuencias obtenidas al ser estas 100% idénticas en la región de solapamiento. Se realizaron alineamientos de nuestras secuencias con la secuencia del genoma completo del aislado de USA disponible en GenBank, obteniéndose una identidad superior al 90% en las secuencias que efectivamente correspondían a GLRaV-3. Además se confirmó que cada uno de los ORF estuviera en perfecto marco de lectura para los genes descritos (Ling y col., 1998 y 2004) y que éstos fueran del tamaño esperado. Las secuencias obtenidas (Incluidas en solicitud de patente en preparación) fueron ensambladas con un solapamiento mínimo de 50 pb, utilizando el programa Vector NTI Suite 8 obtenido de Invitrogen.

Una vez obtenida la secuencia completa de la zona codificante del genoma del aislado 766, se realizó un análisis bioinformático para identificar y determinar la posible función de las proteínas correspondientes a los 13 marcos de lectura abiertos encontrados en el genoma de GLRaV-3, basándose en la similitud con familias de proteínas, motivos y dominios conocidos. Los resultados obtenidos confirman los dominios descritos anteriormente en la literatura (Ling y col., 2004). Se detectó un dominio de una proteasa tipo papaína, un dominio metiltransferasa y un dominio helicasa, codificados en el ORF 1a. El ORF 1b codificaría para una ARN polimerasa dependiente de ARN. Un dominio HSP70 codificado por el ORF 4, y los dominios CP y CPd codificados en los ORF 6 y 7 respectivamente. Ahora en cuanto a los ORF que

codifican para proteínas de función desconocida se obtuvo que el ORF 3 codificaría para una proteína de 5 kDa con dominio transmembrana similar a pequeñas proteínas hidrofóbicas encontradas en otros closterovirus, el ORF 5 para una proteína de 55 kDa con un 26% ($E = e^{-107}$) de similitud respecto a una proteína de movimiento perteneciente a la familia de las proteínas de estrés térmico (HSP90), presente en el closterovirus Sweet potato chlorotic stunt virus. El ORF 2 y los ORF 8 a 12 codificarían para proteínas en las cuales no se encontraron dominios descritos en otros virus.

Con el fin de estudiar la variabilidad genética entre aislados chilenos y extranjeros disponibles y la relación filogenética con otros virus de vid, se realizaron alineamientos y un análisis filogenético a partir de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la CP de los aislados 766, 664, 765 y 817 y otros closterovirus. Los resultados que se presentan en la Figura 6, indican que los aislados 664, 766 y 765 son muy similares entre ellos y con el aislado de USA, con el cual presentan una identidad a nivel nucleotídico de un 98%, dato obtenido de un alineamiento nucleotídico entre las secuencias de la CP de estos aislados. Sin embargo, el aislado 817 se encuentra en otra rama del árbol filogenético, lo que indica que difiere en mayor grado de los demás aislados chilenos así como también del aislado de USA, con una identidad a nivel nucleotídico de un 94% con cada uno de los aislados estudiados (dato obtenido de alineamientos nucleotídicos entre los aislados 817, 664, 766, 765 y el aislado de USA).

De la misma manera se observa que el aislado brasileño es el filogenéticamente más distante de los anteriores, aún mas que el aislado 817.

Se desprende de los distintos alineamientos nucleotídicos de la proteína de la cápside de los aislados estudiados, que la mayoría de las diferencias encontradas se presentan en el tercer

nucleótido de cada codón (en un 74% de los casos), lo que se traduce generalmente en un cambio de aminoácido del mismo grupo aminoacídico o en que no haya cambio del aminoácido (datos no mostrados).

Los resultados también indican que los aislados chilenos analizados son filogenéticamente más cercanos a aislados de GLRaV-1, quedando en grupos más distantes otros ampelovirus o closterovirus como GLRaV-5, LChV-2 (Little cherry virus-2) y GLRaV-2. El aislado francés de GFLV que se utilizó como aislado filogenéticamente no relacionado, es el que más se aleja de los demás como se esperaba, ya que este pertenece a la familia *Comoviridae*.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, se secuenció casi completamente el aislado 766, llegándose a un 99,1% del genoma, faltando solamente por secuenciar alrededor de 200 nucleótidos en el extremo 3'. El alineamiento nucleotídico de esta secuencia con el aislado de USA nos entregó una identidad de un 97%. Igualmente se obtuvo el 62,5% de la secuencia del genoma del aislado 817. Este porcentaje corresponde a dos regiones de su genoma, 3853 nucleótidos en la porción donde se encuentra la poliproteína (5' poliproteína) y 7341 nucleótidos en la porción 3', abarcando desde la HSP70 hasta el ORF 10 (3' hsp70 a p20). En la Figura 7 se muestran los resultados de los alineamientos de las regiones 5' y 3' antes mencionadas para los aislados 766, 817 y el aislado de USA de GLRaV-3 cuya secuencia se encuentra disponible en Genbank. Se observa que el aislado 817 presenta mayor variabilidad, en ambas regiones 5' y 3', que el aislado 766 comparado con el aislado de USA. La región 3' se presenta como la más conservada entre estos aislados, sobretudo al comparar el aislado 766 con el de USA, con un 98% de identidad contra el 94% de identidad que presentan estos aislados al compararlos con el aislado 817. La región correspondiente a la poliproteína presenta mayor variabilidad que la región 3' en cada una de las comparaciones realizadas entre

estos aislados. Estos resultados confirman que el aislado 817 es el que más difiere de los aislados chilenos, ya que los demás aislados son muy parecidos al de USA.

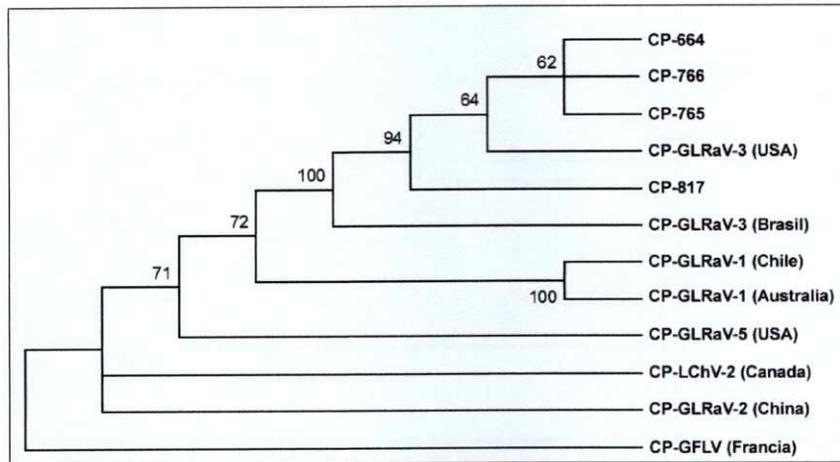


Figura 6. Relaciones filogenéticas generadas a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína de la cápside de distintos aislados de GLRaV-3.

Los alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa ClustalX y el árbol filogenético fue construido con el programa MEGA 2.1, por el método de neighbour-joining con 55000 réplicas de bootstrap. Los números indican los resultados del bootstrap.

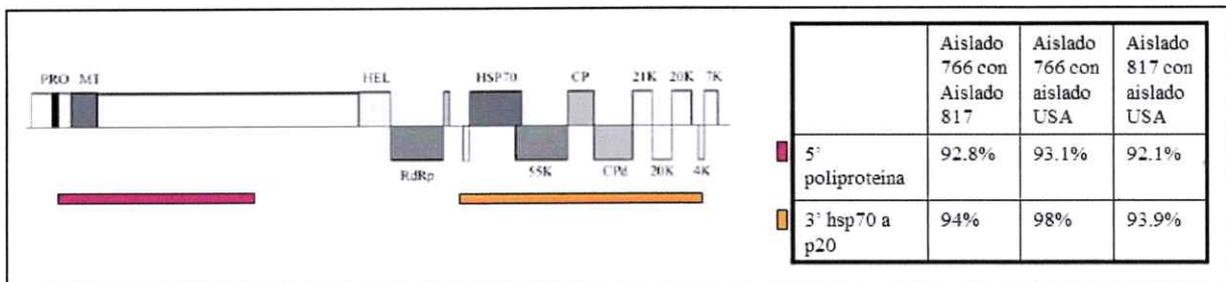


Figura 7. Alineamiento de 2 regiones del genoma de GLRaV-3.

Resultado de los alineamientos nucleotídicos de las regiones 5' en rojo y de la región 3' en naranja de los aislados chilenos 766 y 817 y el aislado de GLRaV-3 de USA. Los porcentajes presentados corresponden a identidad entre los aislados comparados.

5. Clonamiento del gen de la proteína de la cápside en pGEX-6P-1 y en pET-32a

Se diseñaron los partidores específicos en base a las secuencias obtenidas, sentido LR3CPexpF1 y antisentido LR3CPexpR1, para el gen que codifica para la proteína de la cápside. Estos partidores contenían sitios de restricción en sus extremos para las endonucleasas *BamH* I y *Not* I respectivamente, esto con el propósito de clonar el gen

amplificado por PCR a partir de ADNc del aislado 766 en la orientación correcta y en marco de lectura con los genes de fusión de cada vector de expresión. El producto de PCR obtenido fue purificado y clonado en el vector p-GEM-T. Se verificó mediante digestión y secuenciación la presencia del gen de interés en los clones positivos para luego realizar una digestión preparativa con las enzimas antes mencionadas. El producto de la digestión, de aproximadamente 950 pb, se purificó desde un gel de agarosa y se ligó a los vectores de expresión bacteriana pGEX-6P-1 y pET32-a, previamente digeridos con las mismas enzimas y luego desfosforilados. Células *E. coli* Novablue se transformaron con las mezclas de ligación, y los clones que poseían inserto fueron confirmados mediante digestión con endonucleasas, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 942 pb esperado, luego de electroforesis en un gel de agarosa (Figura 8). Luego, los vectores recombinantes pGEX-6P-1-cp y pET-32a-cp, se utilizaron para transformar células competentes *E. coli* BL21(DE3) diseñadas para la expresión de proteínas.

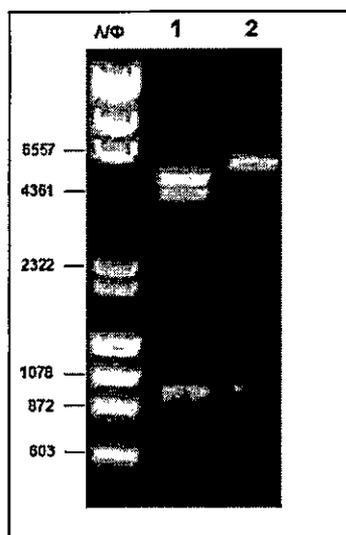


Figura 8. Análisis electroforético de fragmentos liberados desde plasmidios recombinantes con el gen cp766.

(1) pGEX-6P-1-cp digerido con *BamH* I y *Not* I, (2) pET 32a-cp digerido con *BamH* I y *Not* I. En ambos casos se observa la banda esperada para el fragmento liberado correspondiente al gen de la proteína de la cápside de 942 pb, y los vectores linearizados. Se emplearon geles de agarosa al 1%. λΦ corresponde al estándar de tamaño de ADN en pb.

6. Expresión en *E. coli* y purificación de la proteína de la cápside recombinante

Se utilizaron como se mencionó anteriormente dos vectores de expresión. Las células BL21 transformadas con el vector pET32a-cp produjeron una proteína de fusión entre la proteína de la cápside y tioredoxina A de *E. coli* (TRX), también codificada por el vector (Figura 9). Para el caso del vector pGEX-6P-1-cp se obtuvo la proteína recombinante como una fusión entre la proteína de la cápside y la glutatión-S-transferasa (GST), también codificada en el vector (Figura 9). Las proteínas GST-CP y TRX-CP fueron utilizadas para inmunizar animales y evaluar los anticuerpos obtenidos respectivamente.

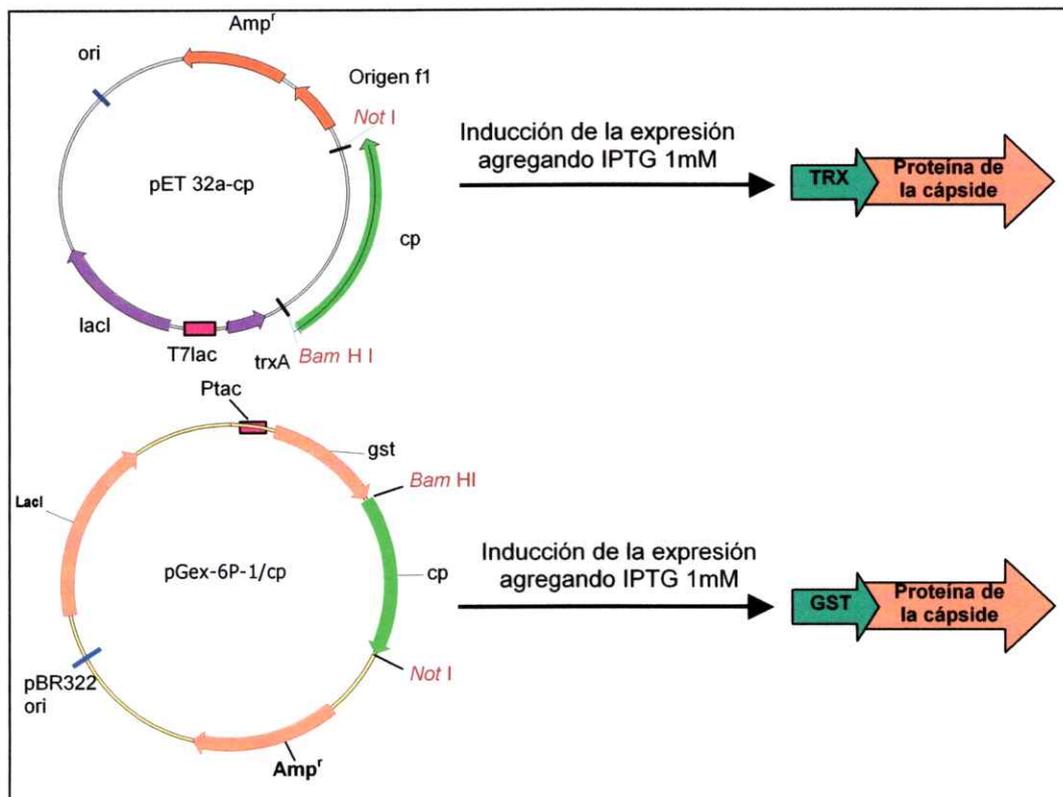


Figura 9. Esquema de la expresión de la proteína de la cápside recombinante utilizando los plasmidios pET-32a y pGEX-6P-1.

El gen la proteína de la cápside de GLRaV-3 seleccionado en esta tesis se clonó en los vectores de expresión procarionte pET-32a y pGEX-6P-1 los cuales permiten obtener proteínas recombinantes en fusión con tioredoxina y glutatión-S-transferasa respectivamente. La expresión está controlada por los promotores T7 Lac y Ptac y la expresión de T7 ARN polimerasa en *E. coli* BL21 está controlada por un promotor inducible por IPTG.

Se seleccionaron clones BL21 recombinantes para el gen de interés en ambos vectores y se indujeron con IPTG para expresar la proteína recombinante tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 21A). Las fracciones proteicas obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida donde se observa una alta expresión de la proteína de fusión en ambos sistemas, llegando a un máximo 3 horas después de agregado el inductor (datos no mostrados). La proteína de fusión con GST tiene un tamaño de 60,4 kDa, correspondiente a la suma de la proteína de cubierta de 34,4 kDa y GST de 26 kDa (Figura 10A). Asimismo para la proteína de fusión con tiorredoxina se obtuvo una proteína de 52,4 kDa, correspondiente a la suma de la proteína de interés de 34,4 kDa y TRX de 18 kDa (Figura 10B). Ambas proteínas se detectaron en la fracción insoluble del extracto bacteriano, debiéndose solubilizar para su posterior purificación.

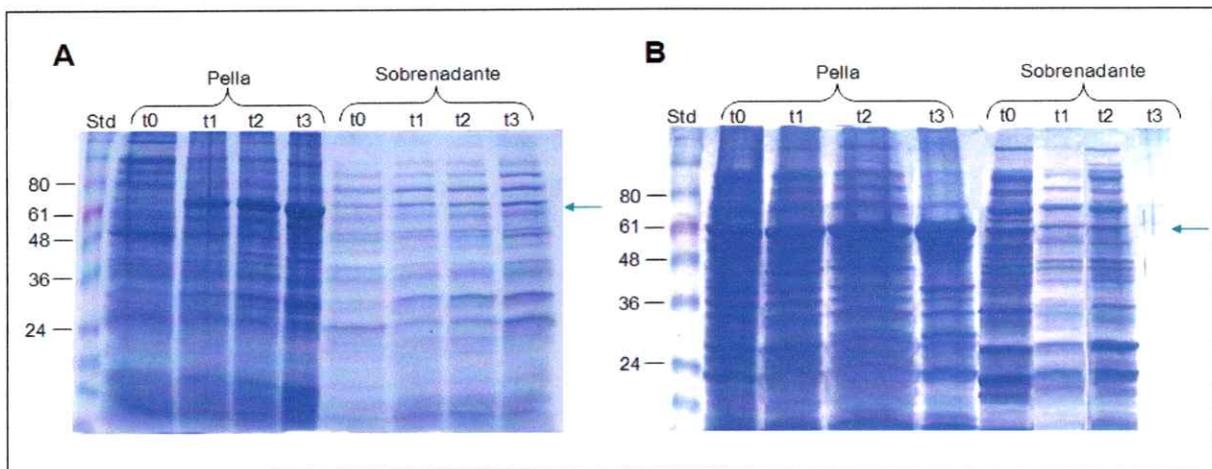


Figura 10. Análisis electroforético de la cinética de inducción de la proteína de cubierta recombinante.

Bacterias transformadas con los vectores pGEX-6P-1-cp (A) y pET 32-a-cp (B) fueron inducidas mediante IPTG a expresar la proteína recombinante correspondiente. Fracciones proteicas de *E. coli* BL21(DE3) solubles (Sobrenadante) e insolubles (Pella) fueron analizadas a distintos tiempos (en horas) de inducción, en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalantes. Std: estándar de peso molecular de proteínas en kDa.

La proteína GST-CP se solubilizó con concentraciones crecientes de sarcosil desde 0,8% a 2%, encontrándose la mayor cantidad de proteína soluble en la fracción con sarcosil 1%. Esta concentración fue utilizada en su posterior purificación mediante una columna de afinidad de glutatión sefarosa, la cual tiene gran afinidad por GST presente en la proteína de fusión recombinante. A su vez, la proteína TRX-CP se solubilizó con distintas concentraciones de urea, desde 1 M hasta 7 M. La concentración óptima utilizada en la purificación con una columna de afinidad níquel-agarosa fue urea 5 M. Esta columna tiene alta afinidad por las 6 histidinas presentes en la proteína de fusión recombinante. La proteína recombinante es retenida en la columna, eliminándose en la fracción no retenida y en los lavados la mayoría de las otras proteínas del extracto (ver Figura 11). La proteína recombinante TRX-CP se eluyó de la columna a concentraciones entre 50 mM y 100 mM de imidazol. La proteína GST-CP, se eluyó de la columna de afinidad a una concentración de 10 mM de glutatión reducido.

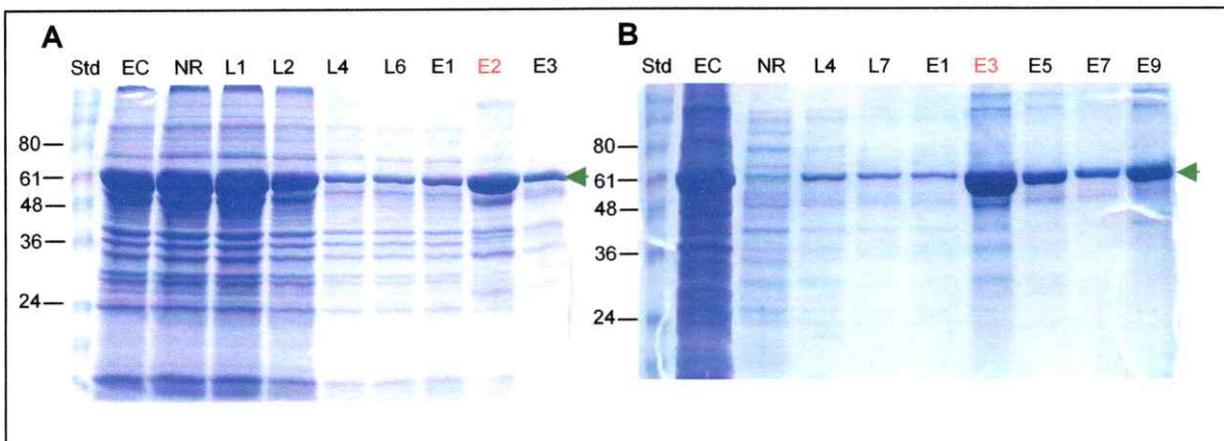


Figura 11. Análisis electroforético de la purificación parcial de la proteína recombinante de cubierta viral.

Las proteínas recombinantes GST-CP y TRX-CP fueron purificadas por medio de la resina glutatión-sefarosa (A) y la resina níquel-agarosa (B) respectivamente. EC corresponde al extracto crudo de proteínas bacterianas; NR corresponde a la fracción no retenida por la resina; L corresponde a distintos lavados a los que se somete la resina para eliminar la fracción proteica unida inespecíficamente. E corresponde a las eluciones de las proteínas recombinantes a una concentración de 10 mM de glutatión reducido en A y con concentraciones crecientes de imidazol (50 mM a 100 mM) en B. En rojo se muestra la elusión con mayor concentración de proteína parcialmente purificada. Std: estándar de tamaño molecular de proteínas en kDa.

Posterior a la purificación, las proteínas recombinantes, se concentraron en un módulo de ultrafiltración con agitación obtenido de Amicon (ver Materiales y Métodos).

Para estimar la concentración de las proteínas parcialmente purificadas se analizaron alícuotas de estas fracciones de elusión en un gel de poliacrilamida junto con un patrón de concentración conocida de BSA y se comparó la intensidad de las bandas. Según estos datos se determinó una concentración de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la TRX-CP y de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la GST-CP en 1,5 ml y 1,8 ml totales respectivamente.

7. Obtención y caracterización de anticuerpos contra la proteína de la cápside

a- Anticuerpos policlonales en conejo

Para la producción de anticuerpos policlonales, la banda correspondiente a la proteína recombinante GST-CP de 60,4 kDa se escindió desde un gel de poliacrilamida como se describió en Materiales y Métodos. La proteína se distribuyó en 10 dosis iguales de 450 μg cada una y se inmunizaron 2 conejos con 5 dosis cada uno. Una vez terminado el proceso de inmunización, los sueros obtenidos se analizaron mediante ELISA y *Western blot*, contra la proteína recombinante TRX-CP para determinar su título y especificidad. En la Figura 12A se muestran los resultados del ELISA para TRX-CP. Estos indican que los anticuerpos policlonales desarrollados contra GST-CP reconocen específicamente la proteína recombinante, descartando el reconocimiento de GST por sí solo. Además se observa una alta reactividad en los sueros policlonales y no así en los sueros preinmunes. Ambos sueros policlonales presentan un excelente título, siendo levemente mejor el del anticuerpo obtenido a partir del conejo A (alrededor de 1/4000). Para confirmar la especificidad de los anticuerpos estos se analizaron mediante *Western blot*, utilizando en cada caso 1,4 μg de antígeno. Como se observa en la Figura 12B, los anticuerpos policlonales del conejo A (anticuerpo A)

reconocen la proteína recombinante TRX-CP de 52,4 kDa y la proteína GST de 26 kDa, utilizada como control. Sin embargo la intensidad de la banda correspondiente a la GST es menor. Resultados muy similares se obtuvieron al utilizar el anticuerpo policlonal obtenido del conejo B (datos no mostrados).

En base a los resultados obtenidos se seleccionó el suero policlonal obtenido del conejo A para los ensayos posteriores de inmunodetección por presentar éste un mejor título.

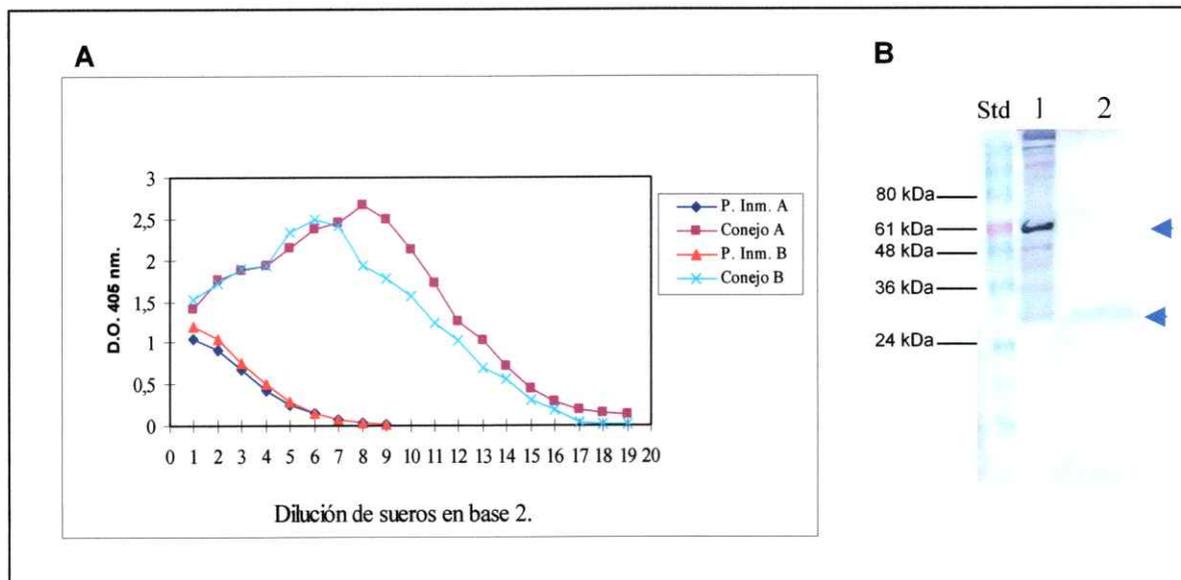


Figura 12. Análisis de los anticuerpos policlonales contra CP-766 mediante ELISA y Western blot.

A. Titulación de antisueros policlonales anti-GST-CP-766 mediante ELISA. Se utilizó la proteína recombinante TRX-CP para evaluar la respuesta inmune contra la CP-766. P.Inm. A y B: Suero preinmune de los conejos A y B. Conejo A y B: Respuesta de los conejos A y B después de la quinta inmunización. **B.** Análisis mediante *Western blot* del suero A policlonal contra CP-766. (1) TRX-CP-766, (2) GST, (Std) estándar de peso molecular de proteínas.

b- Anticuerpos monoclonales en ratón

La proteína recombinante purificada GST-CP se inyectó en ratones con el fin de obtener anticuerpos monoclonales. Luego de evaluar mediante ELISA los sobrenadantes de fusión completa, contra las proteínas TRX-CP y GST, se obtuvieron 22 sobrenadantes de hibridomas específicos contra la proteína de la cápside. Estos fueron analizados mediante ELISA y

Western blot, contra la proteína TRX-CP (datos no mostrados), lo que permitió seleccionar 4 clones que presentaban un mayor título y no mostraban bandas inespecíficas. Finalmente se obtuvieron los fluidos ascíticos correspondientes. Estos 4 anticuerpos 5A5, 2D6, 8G5 y 7H3 fueron evaluados nuevamente mediante ELISA y *Western blot* contra la proteína recombinante TRX-CP para determinar su título y especificidad. En la Figura 13 se observan los resultados del ELISA utilizando como antígeno TRX-CP con el fin de descartar el reconocimiento inespecífico de epítomos de la proteína GST. El resultado de este análisis indica que cada uno de los anticuerpos reconoce específicamente la proteína recombinante y posee un título adecuado, destacando los monoclonales 5A5 y 7H3, que presentan un título mayor a 1/100000.

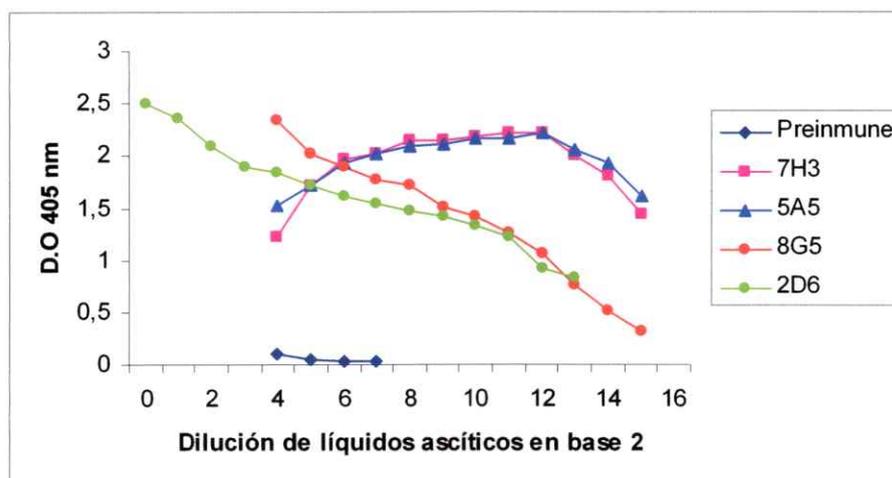


Figura 13. Determinación del título de anticuerpos monoclonales contra CP-766 mediante ELISA.

El análisis de los anticuerpos monoclonales 7H3, 5A5, 8G5 y 2D6 se realizó utilizando la proteína recombinante TRX-CP purificada como antígeno.

Posteriormente estos resultados fueron confirmados mediante *Western blot* utilizando en cada caso 1,4 µg de antígeno, como se aprecia en la Figura 14. Aquí se puede observar que los anticuerpos reaccionan de manera específica contra la proteína TRX-CP de 52,4 kDa y no contra la proteína de fusión (GST) de 26 kDa ni contra la proteína de cubierta del virus Fleck

de vides, utilizada como control negativo. Esto corrobora la especificidad de los anticuerpos obtenidos. Cabe destacar que en el *Western blot* correspondiente al anticuerpo 5A5 se detecta una banda de menor tamaño que podría corresponder a productos de degradación o productos incompletos de expresión que contienen el epítipo de la CP.

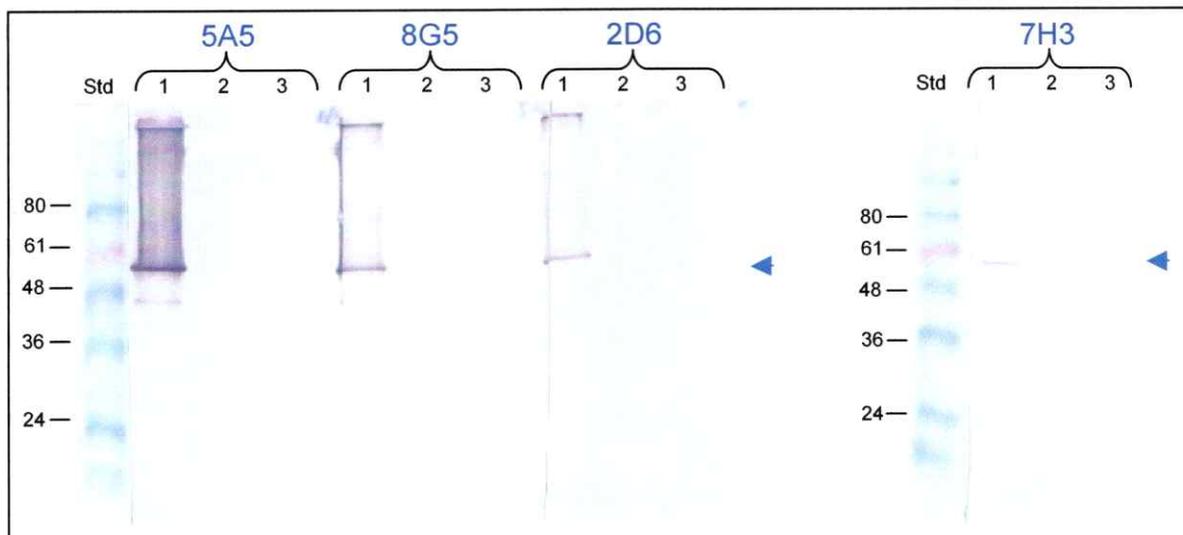


Figura 14. Análisis de los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante *Western blot*.

Respuesta de los anticuerpos monoclonales 5A5, 8G3, 2D6 y 7H3 contra TRX-CP purificada (1), GST (2) y la proteína de la cápside de GFkV (3). Std corresponde a estándar de tamaño molecular de proteínas en kDa.

8. Detección de vides infectadas con GLRaV-3

Nuestra intención en este trabajo como se mencionó anteriormente, fue la de desarrollar un método eficiente de inmunodetección para el GLRaV-3. Con este propósito se diseñaron y ensayaron 2 métodos de detección basados en anticuerpos, uno usando la tecnología TAS-ELISA y otro basado en la tecnología IC-RT-PCR. Para esto, una vez caracterizados los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos, se procedió a realizar pruebas de detección del virus GLRaV-3 en tejido infectado de vid mediante estos dos métodos para así evaluar la eficiencia de los anticuerpos desarrollados y determinar la mejor combinación de estos.

8.1. Detección de GLRaV-3 en vides mediante ELISA

Previo a los ensayos de detección, se determinó la concentración óptima de antígeno, es decir la relación de tejido infectado y tampón de extracción de proteínas a utilizar, determinándose en 1:4 de tejido:tampón para la extracción de proteínas (Resultados no mostrados). Posteriormente se determinó la dilución óptima del extracto a utilizar. Para esto se utilizaron distintas diluciones del extracto proteico de vid infectada y se analizaron mediante ELISA. Las pruebas se realizaron con el kit comercial Bioreba y con el kit prototipo desarrollado durante esta tesis. Los resultados (no mostrados) revelaron que la dilución óptima a utilizar era una 1:5 del extracto original.

a. Análisis y caracterización del anticuerpo policlonal contra GLRaV-3

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Ing. Agr. Nicola Fiore de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. Se realizó una titulación del suero policlonal anti CP-766 procedente del conejo A mediante ELISA con un extracto proteico de vid infectada con GLRaV-3. El título se estimó en alrededor de 1/15000 (Ing. Agr. Nicola Fiore, comunicación personal). Además se hicieron ensayos para determinar si había reacción cruzada con otros virus. Para esto se utilizaron plantas sanas y plantas infectadas con los virus GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GFLV, GFkV y ToRSV. Asimismo se utilizó el kit comercial de Agritest como control positivo, y su anticuerpo secundario conjugado. No hubo reacción cruzada con ninguno de estos patógenos virales (Ing. Agr. Nicola Fiore, comunicación personal). Los resultados con plantas no infectadas mostraron una lectura muy similar a la obtenida usando solo el tampón de extracción. Estos resultados confirman el excelente título y la alta especificidad de este anticuerpo.

b. Análisis y caracterización de los anticuerpos monoclonales contra GLRaV-3

Se titularon y evaluaron los distintos anticuerpos monoclonales obtenidos contra vides infectadas con GLRaV-3. Para esto se utilizaron extractos proteicos de la planta control positivo 279 y la planta control negativo 346. Se evaluaron distintas diluciones de los anticuerpos a ensayar (1:2048 a 1:65536). Se utilizó una dilución 1:1000 del antisuero policlonal obtenido, para asegurar una eficiente inmunocaptura en el ELISA, pese a tener éste un título mucho más alto y finalmente un tercer anticuerpo acoplado a FAL. La Figura 15 muestra claramente que el monoclonal 5A5 es el que tiene un mejor título, sin presentar una disminución de la señal, incluso a una dilución de 1:65000. A pesar de que los demás anticuerpos reconocen también la proteína recombinante purificada, con buenos títulos, estimados en aproximadamente 1:2000, su reactividad con extracto de vid es mucho menor que la del anticuerpo 5A5. Es por esto que para los posteriores ensayos de detección viral, se seleccionó este anticuerpo.

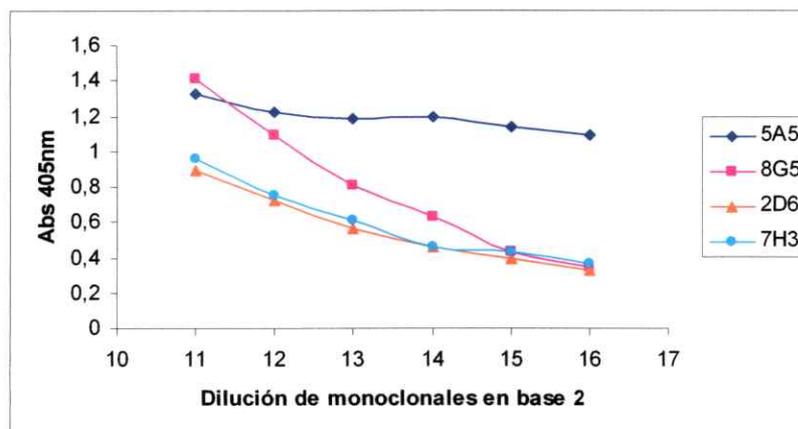


Figura 15. Evaluación y titulación de anticuerpos monoclonales utilizando tejido de vid infectada con GLRaV-3 mediante TAS-ELISA.

El análisis de los anticuerpos monoclonales 5A5, 8G5, 2D6 y 7H3 se realizó utilizando un extracto proteico de vid infectada con GLRaV-3 del aislado 279.

8.2. Detección de GLRaV-3 en vides mediante IC-RT-PCR

a. Evaluación de los anticuerpos monoclonales y policlonales

Para llevar a cabo los ensayos de inmunocaptura RT-PCR (IC-RT-PCR) se seleccionaron dos partidores antisentido específicos para la transcripción reversa (LC2 y LR3C629) de manera de asegurar la obtención de ADNc correspondiente a la zona que se pretende amplificar por PCR. Para la reacción de PCR se utilizó la pareja de partidores LC1 y LC2 los cuales amplifican una zona de 546 pb en la HSP 70 viral, región conservada dentro del genoma. Esta pareja de partidores se caracterizó por amplificar el fragmento esperado en todos los aislados del virus GLRaV-3 analizados.

Por otra parte, se decidió purificar y concentrar las inmunoglobulinas totales de una alícuota de 5 ml de antisuero policlonal obtenido del conejo A para utilizar en estos ensayos (Ver Materiales y Métodos), de manera de desechar otros componentes del antisuero que no correspondían a inmunoglobulinas, para lograr una mejor inmunocaptura y una mejor definición. Los resultados de la IC-RT-PCR con anticuerpo policlonal concentrado y suero policlonal se muestran en la Figura 16, donde se observa que la banda esperada de 546 pb aumenta considerablemente en intensidad usando el anticuerpo concentrado, y a la vez se puede apreciar que no hay captura de la partícula viral al utilizar el suero preinmune de conejo (control negativo). Cabe destacar que al parecer una cantidad mínima de virus se estaría adhiriendo al tubo por sí solo, ya que se observa la banda esperada en el carril que contenía solo la planta infectada, sin inmunocapturar (Figura 16A, carril 4).

De la misma forma se hicieron ensayos de IC-RT-PCR con el antisuero policlonal obtenido del conejo B en una dilución 1:500 y con 2 monoclonales obtenidos en ratón, utilizados en una dilución 1:1000. Las concentraciones utilizadas se eligieron en base al artículo de Sefc y col.

(2000), para asegurar una eficiente inmunocaptura del virus, pese a que estos anticuerpos presentaban un título mayor. Se eligieron los monoclonales 5A5 y 8G5 por ser los que presentaron mayor título (Figura 15). Los resultados se observan en la Figura 16B en donde se aprecia que los anticuerpos policlonales procedentes del conejo B reconocen y capturan la partícula viral de GLRaV-3, y no así el suero preinmune de estos. Por otra parte el monoclonal 5A5 es muy eficiente para inmunocapturar, se observa la banda esperada muy intensa, más aun que con el anticuerpo policlonal concentrado. Sin embargo al realizar la inmunocaptura con el anticuerpo monoclonal 8G5 no se observan bandas.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron el anticuerpo policlonal concentrado proveniente del conejo A y el anticuerpo monoclonal 5A5 como reactivos de captura viral, en el desarrollo de ensayos de detección con plantas infectadas con GLRaV-3, plantas infectadas con otros virus y plantas sanas.

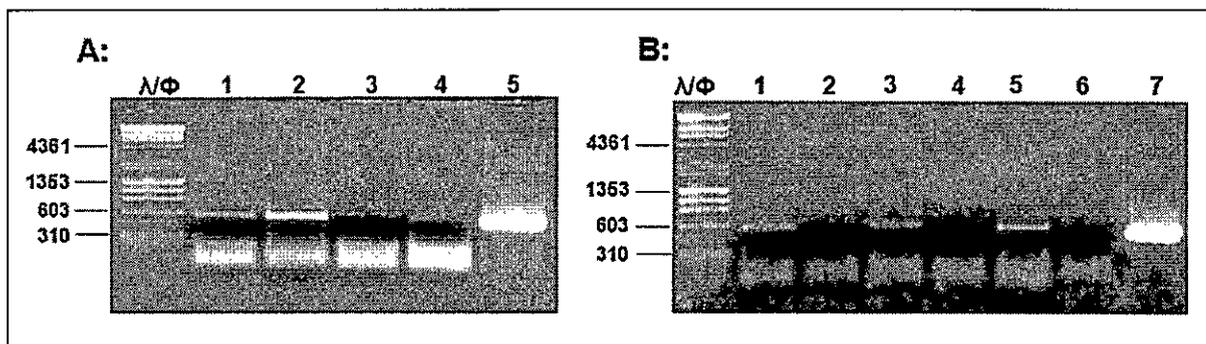


Figura 16. Evaluación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante IC-RT-PCR. A. Análisis de la respuesta en la inmunocaptura con el anticuerpo policlonal sin concentrar (1) y concentrado (2). Los carriles 3 y 4 corresponden a la inmunocaptura con suero preinmune y sin anticuerpo, respectivamente. El control positivo del PCR se observa en el carril 5. B. Análisis del antisuero policlonal obtenido del conejo B y de los anticuerpos monoclonales 5A5 y 8G5. (1), antisuero policlonal concentrado A utilizado como control positivo. (2) y (4) sueros preinmunes de los conejos A y B respectivamente. (3), antisuero policlonal B. (5) y (6) anticuerpos monoclonales 5A5 y 8G5 respectivamente. (7), control positivo del PCR. λΦ corresponde al estándar de tamaño de ADN en pb.

b. Análisis de reacción cruzada con otros virus mediante IC-RT-PCR

Se evaluaron plantas infectadas con GLRaV-1, GFLV y GLRaV-3 como control positivo.

En el caso de GLRaV-1, se seleccionaron los partidores antisentido LR1CPR1 y LR1CPR2, utilizados en la misma reacción, para la transcripción reversa y la pareja LR1CPF1 y LR1CPR1 para el PCR, que amplifican un fragmento de 502 pb. En el caso de GFLV se utilizaron los partidores degenerados M2F y M4R, que amplifican un fragmento de 814 pb.

Los virus fueron inmunocapturados con el anticuerpo policlonal y con el anticuerpo monoclonal 5A5. Los resultados preliminares obtenidos indican que no hay reacción cruzada del anticuerpo policlonal (Figura 17A) ni del monoclonal 5A5 (Figura 17B), con plantas infectadas con GLRaV-1 ni tampoco con plantas infectadas con GFLV. Sin embargo en la evaluación de este último virus con el anticuerpo policlonal, se puede observar una banda inespecífica de alrededor de 1000 pb, que no corresponde al tamaño esperado del amplificado de GFLV.

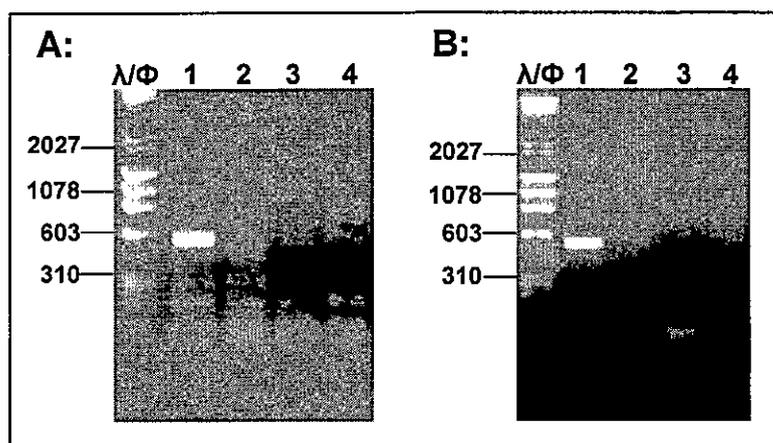


Figura 17. Análisis de posible reactividad cruzada de anticuerpos policlones y monoclonales en vid infectada mediante IC-RT-PCR.

A. Análisis de reacción cruzada del antisuero policlonal A y B del anticuerpo monoclonal 5A5. (1), vid infectada con GLRaV-3. (2), vid sana. (3), vid infectada con GFLV. (4), vid infectada con GLRaV-1. (λ/Φ), estándar de tamaño de ADN en pb.

8.3. Prueba final de muestras desconocidas mediante ELISA e IC-RT-PCR

Una vez caracterizados los anticuerpos desarrollados y las condiciones de su uso, se analizaron mediante ELISA e IC-RT-PCR 6 muestras de vid de condición sanitaria desconocida. Posteriormente se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos por ambos métodos y se comparó con la información fitosanitaria que nos entregó nuestro proveedor de material infectado.

a. Diagnóstico mediante ELISA

En este ensayo se utilizó nuestro kit de ELISA prototipo, que consiste en utilizar el anticuerpo policlonal A como primer anticuerpo, el monoclonal 5A5 como segundo anticuerpo y un tercer anticuerpo conjugado con FAL (Pierce). Asimismo en forma paralela, se utilizó un kit de detección comercial (Bioreba) para GLRaV-3 desarrollado en Suiza. Además de las 6 muestras problema se utilizaron los controles positivos (planta 279) y negativo (planta 346) de infección, así como una planta infectada con el virus GFLV para confirmar que no existe reconocimiento de este virus por nuestros anticuerpos. De la misma manera, se realizó un control con el kit prototipo, sin antígeno, y otro agregando solamente el segundo anticuerpo 5A5, para evaluar la posibilidad de reconocimiento inespecífico, así como para medir la señal basal de la reacción al utilizar el kit prototipo. En cada uno de estos casos se reveló con un tercer anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. Los resultados obtenidos, como se aprecia en la Figura 18, muestran que el control positivo (279) posee una señal muy intensa y que el control negativo por el contrario, no presenta mayor señal. Asimismo en todos los demás controles negativos se observa una señal muy baja, cercana al blanco (tampón FAL). Igualmente los resultados indican que en las muestras desconocidas, solo hay una señal considerable para la planta 4, lo que indica que estaría infectada con GLRaV-3. El resto de las

muestras tienen señales de la misma intensidad que los controles negativos. Lo interesante es que esta planta es solo detectada por nuestro kit prototipo, y no por el kit comercial Bioreba, lo que indicaría que nuestro procedimiento sería más sensible para la detección del aislado chileno de GLRaV-3 utilizado. De la misma manera la señal en el control positivo (planta 279) es muy superior al utilizar el kit prototipo, comparado con el kit comercial. Esta es una indicación adicional de la mayor sensibilidad del test prototipo. Se observa igualmente que la señal obtenida con nuestro control positivo es mucho más intensa a la obtenida para la planta 4. Por otra parte, la señal obtenida al utilizar como antígeno el extracto proteico con GFLV es similar a los controles negativos, descartando que haya reacción cruzada de nuestros anticuerpos con GFLV. Esto indica que la especificidad del test prototipo es igual o mejor a la del test comercial.

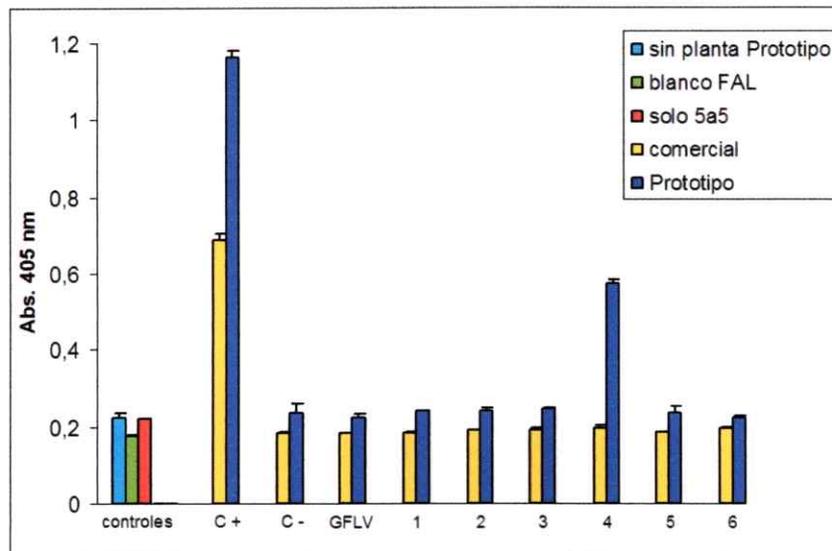


Figura 18. Diagnóstico de muestras problema mediante ELISA.

Se analizaron distintas muestras de vid de condición sanitaria conocida y desconocida (1 a 6) utilizando un kit comercial Bioreba y el kit prototipo. Se utilizó el aislado 279 como control positivo y el aislado 346 como control negativo. Igualmente se evaluó la respuesta a GFLV, sin planta, solo tampón FAL y solo el monoclonal 5A5. Cada muestra se analizó en duplicado y se indica la desviación estándar.

b. Diagnóstico por IC-RT-PCR

En este último ensayo se evaluaron las 6 muestras problema, además se comparó la eficiencia para inmunocapturar del anticuerpo policlonal comercial Bioreba contra GLRaV-3, con los anticuerpos obtenidos en este trabajo, para así poder evaluar la eficiencia de los anticuerpos, frente a uno comercial. Al realizar la inmunocaptura con el anticuerpo monoclonal 5A5 (Figura 19A), se observa la banda esperada de 546 pb en la planta 4, lo que concuerda con el resultado obtenido por ELISA, pero además esta banda aparece de manera más tenue para la planta 6. Es decir según este ensayo estarían infectadas la plantas 4 y 6. En la Figura 19B que muestra los resultados de la inmunocaptura con el anticuerpo policlonal A, se observa que solo en la planta 4 se amplificó la banda correspondiente al amplificado de 546 pb. Esto indica que solo esta planta estaría infectada. Por otra parte los controles positivos y negativo del PCR son concordantes. En ambos ensayos al capturar tanto con el policlonal A como con el monoclonal 5A5 no se detecta la banda de 546 pb en la planta sana (346), como era de esperarse. Solo hay detección positiva o amplificación del tamaño esperado en la planta infectada (279) con GLRaV-3. Sin embargo, debido a que este es un ensayo preliminar, se obtienen bandas inespecíficas en la mayoría de las muestras, que deberían desaparecer al optimizar y estandarizar el método. Asimismo se observa una mayor cantidad de estas bandas inespecíficas al utilizar un anticuerpo policlonal que cuando se utilizaron nuestros anticuerpos monoclonales. Las plantas 4 y 6 muestran además de la banda esperada, 2 bandas inespecíficas, de un tamaño mayor. Una de alrededor de 700 pb y la otra de alrededor de 1250 pb. La banda de 700 pb se purificó, clonó, secuenció y alineó contra la base de datos de GenBank. Los resultados indican que este amplificado de 700 pb corresponde a un amplificado en la región de la proteína de la cápside de GLRaV-3. La banda de mayor tamaño

no fue posible de clonar, pero también debería corresponder a un amplificado de GLRaV-3, ya que aparece solo en plantas infectadas. Esto confirmaría que estas bandas no corresponden a amplificados productos de una reacción cruzada con otros virus.

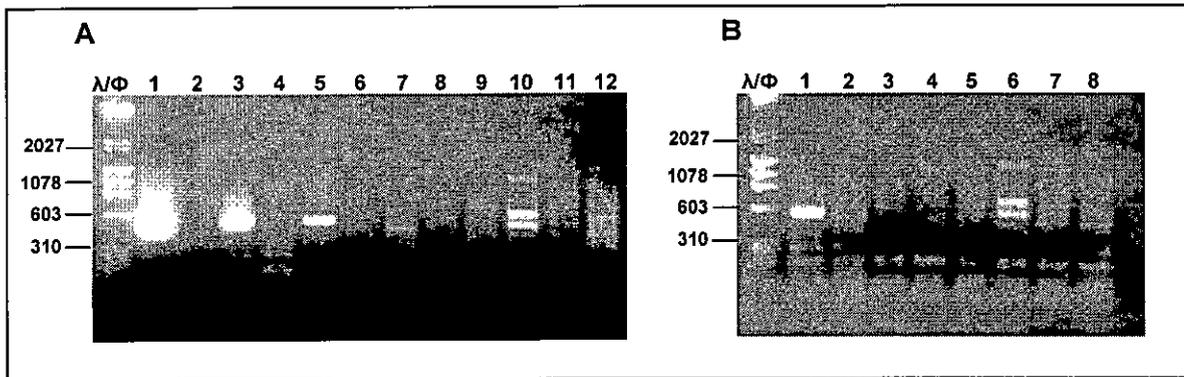


Figura 19. Diagnóstico de muestras problema por IC-RT-PCR.

Se analizaron las 6 muestras problema y muestras conocidas utilizadas como controles.

En **A** se analizan las muestras problema utilizando el anticuerpo monoclonal 5A5 para inmunocapturar. (1) y (2), controles positivo y negativo del PCR respectivamente; (3) y (4) anticuerpo policlonal comercial con planta 279 y 346 respectivamente; (5) y (6) monoclonal 5A5 con planta 279 y 346 respectivamente; (7) a (12) muestras problema de la 1 a la 6. En **B** se analizan las muestras problema utilizando el anticuerpo policlonal anti CP-766 para inmunocapturar. (1) y (2), policlonal con planta 279 y 346 respectivamente; (3) a (8) muestras desconocidas de la 1 a la 6. (λ/Φ), estándar de tamaño de ADN en pb.

Posteriormente, como prueba adicional, se realizó una extracción de ARN total seguido de un RT-PCR (ver Materiales y Métodos) con los mismos partidores utilizados en la IC-RT-PCR, para cada planta desconocida y además partidores para el gen que codifica la malato dehidrogenasa de vid (MDH), como control positivo de la extracción de ARN (Figura 20). Los controles positivo y negativo del ensayo utilizando la planta 279 y 346 respectivamente corresponden a lo esperado. Sin embargo, en ninguno de los RT-PCR para las muestras problema se obtuvo la banda de 546 pb correspondiente al fragmento A, es decir no se detectó el virus por este método, pero si en cambio se detecta para cada una de las muestras problema la banda de 196 pb correspondiente al gen de la MDH sin intrón, lo que indica que la

detección negativa para cada muestra no se debió a una extracción de deficiente ARN. Este resultado apoya la idea de usar un anticuerpo para inmunocapturar el virus previo al RT-PCR.

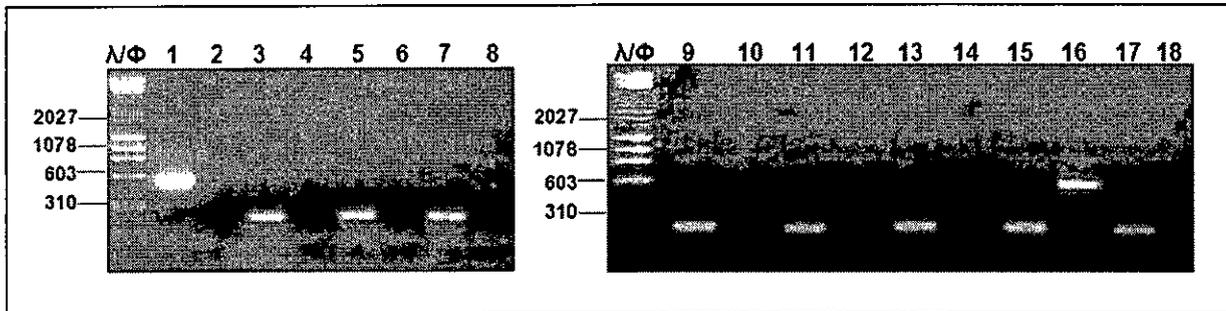


Figura 20. Diagnóstico de muestras problema mediante RT-PCR.

Se analizaron las 6 muestras problema y muestras conocidas utilizadas como controles. (1) y (2) controles positivo y negativo del PCR. (3), (5), (7), (9), (11) y (13) RT-PCR de muestras problema de la 1 a la 6 con partidores para la MDH. (4), (6), (8), (10), (12) y (14) RT-PCR con partidores para el fragmento A de GLRaV-3. (15) y (16) RT-PCR de la planta 279 con partidores para la MDH y el fragmento A respectivamente. (17) y (18) RT-PCR de la planta 346 con partidores para la MDH y el fragmento A respectivamente. (λ/Φ), estándar de tamaño de ADN en pb.

Finalmente estos resultados fueron comparados con los entregados por nuestro proveedor de material infectado, el Ing. Agr. Nicola Fiore. La Tabla 2 muestra el diagnóstico realizado previamente, mediante ELISA (kit Agritest) y RT-PCR directo, en la facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. Cabe destacar que en ambos sistemas utilizados la planta 4 mostró mayor carga viral que la planta 6, sea por una señal más intensa en el ELISA o por una banda más intensa en el RT-PCR (datos no mostrados). Nuestro diagnóstico realizado por IC-RT-PCR con el anticuerpo 5A5 concuerda plenamente con el diagnóstico previo realizado por el Ing. Agr. Nicola Fiore (Tabla 2), no así el resto de los ensayos, con los cuales, o no se detecta infección en las muestras problema o solo se detecta la infección en la planta 4 en el caso de utilizar el kit prototipo. En conclusión, el método más sensible para la detección de GLRaV-3 en vides sería IC-RT-PCR utilizando el anticuerpo monoclonal 5A5 para capturar la partícula viral. Por otra parte nuestros resultados no pueden ser atribuidos al reconocimiento de los

otros virus presentes en las plantas 4 y 6, ya que previamente se descartó reacción cruzada con estos.

Tabla 2. Virus presentes en las muestras problemas analizadas.

Muestra / Diagnóstico	1	2	3	4	5	6
Kit prototipo (ELISA)	Sana	Sana	Sana	Infectada con GLRaV-3	Sana	Sana
IC-RT-PCR	Sana	Sana	Sana	Infectada con GLRaV-3	Sana	Infectada con GLRaV-3
RT-PCR	Sana	Sana	Sana	Sana	Sana	Sana
Kit Bioreba (ELISA)	Sana	Sana	Sana	Sana	Sana	Sana
Diagnóstico previo ELISA (kit Agritest) y RT-PCR	Sana	Sana	Sana	Infectada con GLRaV-1 y GLRaV-3	Sana	Infectada con GLRaV-3 y GFkV

IV. DISCUSION

El virus del enrollamiento clorótico de la vid 3 (GLRaV-3) es un patógeno distribuido mundialmente (Rosciiglione y Gugerli, 1986) y causante de importantes pérdidas para la industria vitivinícola nacional. Estas pérdidas en algunos casos pueden llegar a una disminución de un 68% de la producción en los cultivos (Walter y Martelli, 1997). La principal forma de transmisión de este virus es a través de material vegetativo de propagación (Herrera, 2001), lo cual la hace una enfermedad de rápida diseminación. Por esta razón la manera más eficaz de combatir las enfermedades virales en la vid es la producción de material de propagación libre de virus. En este contexto, el gobierno de Chile ha impulsado una iniciativa de certificación del material de propagación, con el fin de disminuir la distribución de enfermedades en los cultivos (SAG, 2003). Poner en marcha un programa de certificación a nivel nacional requiere de la tecnología necesaria para hacer un diagnóstico más exhaustivo de la plantas madres, de donde se obtiene el material de propagación y que esté al alcance de los grandes y medianos productores. Hasta ahora el diagnóstico en los viveros se hace solo mediante inspección visual y/o realizando el demoroso indexaje, principalmente debido a que a pesar de que existen sistemas de diagnóstico (del tipo anticuerpos) comerciales, éstos deben importarse a un alto costo y no garantizan la detección de posibles variantes virales chilenas.

Dado que se ha descrito que en varios virus de plantas y que en particular dentro de un mismo serotipo de GLRaV existe variabilidad en regiones del genoma (Little y col., 2001) y que el acceso a los kits de detección de virus es limitado por su alto costo, se origina la hipótesis y objetivos de esta tesis, sobre la necesidad de estudiar el genoma de aislados chilenos de GLRaV-3 para el desarrollo de sistemas eficientes y de un menor costo para la detección de variantes endógenas del virus. Para este propósito se trabajó con 4 aislados procedentes de las

regiones Metropolitana y VI de nuestro país. En esta memoria, se secuenció completamente el aislado 766, el cual se eligió por su agresividad infectiva. Los demás aislados virales fueron secuenciados parcialmente y fueron comparados entre si y con aislados virales de otros países. Posteriormente se obtuvieron anticuerpos policlonales y monoclonales contra la proteína de la cápside de GLRaV-3 lo que permitió desarrollar métodos eficientes de detección para el virus. Debido a que el GLRaV-3 presenta una localización floemática (Carstens, 2002) se extrajo tejido floemático a partir de sarmientos lignificados de vid infectada. El ADNc viral se obtuvo por transcripción reversa del ARN total obtenido previamente a partir de tejido floemático de vid.

El genoma de GLRaV-3 tiene un tamaño de alrededor de 18 kb y corresponde a una hebra simple, de orientación positiva. En el extremo 5' posee un CAP metilado y no tiene poli A en el extremo 3' (Kai-Shu y col., 2004; <http://www.dpvweb.net>). Para amplificar el genoma del virus mediante PCR, se comenzó utilizando partidores descritos en la literatura (Ling y col., 1997; Minafra y Hadidi, 1994; Nassuth y col., 2000), otros diseñados en base a la secuencia del aislado NY1 (de USA) de GLRaV-3 disponible en GenBank (AF037268), pero la mayoría de los partidores se diseñaron en base a las secuencias del aislado 766 que se fueron obteniendo en esta memoria. Cabe destacar que la mayoría de los partidores utilizados, diseñados a partir del aislado disponible en GenBank y los obtenidos de la literatura, amplificaron las regiones esperadas en los distintos aislados chilenos. Este resultado estaría indicando que no existiría tanta variabilidad en el genoma de los aislados chilenos con respecto al estadounidense. Sin embargo, el aislado 817 presentó un grado mayor de dificultad para su amplificación, probablemente debido a la hibridación parcial de algunos partidores utilizados. De esta manera se obtuvo la secuencia completa de la zona codificante del aislado

766, faltando aún solo por secuenciar alrededor de 200 nucleótidos en la región 3'UTR. Cada clon obtenido se secuenció al menos dos veces en ambos sentidos y posteriormente se ensambló con un mínimo de solapamiento de las secuencias de 50 pb, usando el programa Vector NTI Suite 8 obtenido de Invitrogen. El genoma de GLRaV-3 posee 13 marcos de lectura abiertos, de acuerdo a la información disponible en GenBank (AF037268) para el único aislado secuenciado completamente hasta antes de esta memoria. Al analizar el estado de la secuencia completa del aislado 766 no se encontraron codones de término dentro de los distintos marcos de lectura abiertos, y cada gen tenía el tamaño esperado, según la secuencia de GLRaV-3 disponible en GenBank (AF037268).

Los resultados de nuestro análisis mediante InterPro y PSI-Blast para el aislado chileno 766, concuerdan con los descritos en la literatura. El ORF1a codifica para una poliproteína de 245,3 kDa, el cual es procesado post-traduccionalmente por una proteasa de tipo papaína codificada en este mismo péptido, dando origen a una metiltransferasa (MT) y a una helicasa (HEL) (Ling y col., 2004). El ORF1b se expresaría por un mecanismo de corrimiento +1 en el marco de lectura, dando origen a una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El ORF 2 codificaría para un pequeño péptido de 6 kDa, seguido de una larga región no codificante que podría corresponder a una secuencia controladora del proceso de traducción, hasta encontrar el ORF 3 que codifica para un péptido de 5 kDa. Cabe destacar que en otros closterovirus como CTV (Citrus tristeza virus), LIYV (Lettuce infectious yellows virus) y BYSV (Beet yellow stunt virus) se han encontrado proteínas de mayor tamaño (alrededor de 30 kDa) codificadas en la posición donde se ubica el ORF 2 (Ling y col., 1998). El ORF 4 codificaría para una proteína de la familia de las HSP70 de 59 kDa, el ORF 5 para una proteína de 55 kDa. El ORF 6 corresponde al gen de la proteína de la cápside, el ORF 7 correspondería a una proteína de la

cápside divergente (CPd) de 53 kDa, puesto que se encuentran los cuatro residuos conservados (N, R, G y D) en la porción C-terminal, característicos de las proteínas de la cápside en closterovirus (Ling y col., 1998). Los siguientes ORF 8 a 12 codificarían para proteínas de función aún desconocida (Ling y col., 1998). La organización del genoma de GLRaV-3 es consistente con la esperada para un closterovirus monopartito típico (Dolja y col., 1994). Nuestros estudios no revelaron nueva información concluyente para la mayoría de las proteínas desconocidas, salvo para el ORF 3, la cual se encontró que es similar a pequeñas proteínas hidrofóbicas encontradas en otros closterovirus, y el ORF 5 que codificaría para una proteína de movimiento homóloga a una HSP90 encontrada en otro miembro de la familia *Closteroviridae* (Sweet potato chlorotic stunt virus). Ambas proteínas se encuentran en una región del genoma homóloga a la zona donde se encuentran las proteínas de movimiento célula-célula en otros closterovirus. En Beet Yellow Virus (BYV), perteneciente al género closterovirus y con una organización genómica muy parecida a GLRaV-3 se ha descrito que en esta zona del genoma se encontrarían codificadas las proteínas que participan en el movimiento célula-célula, p6, HSP 70, p64 CPd y CP (Alzhanova y col., 2001).

Por otra parte, en Citrus Tristeza Virus CTV y BYV, ambos pertenecientes a la familia *Closteroviridae*, se han descrito proteínas de alrededor de 20 kDa que actúan como supresores del silenciamiento de ARN (Reed y col, 2003). Esta estrategia es el mayor mecanismo de defensa de las plantas contra los virus (Vance y Vaucheret, 2001). Es posible que la función supresora sea un requerimiento tan importante como la replicación, encapsidación y transporte en la infección viral (Reed y col, 2003). En este contexto podría postularse que algunas o al menos una de las proteínas desconocidas codifican para un supresor de silenciamiento de ARN. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito un patrón común a este tipo de

proteínas supresoras del silenciamiento génico, lo que limita el análisis bioinformático y el poder obtener resultados más concluyentes.

Finalmente, proteínas potenciadoras de la replicación (p21 y proteínasa líder) y proteínas de transporte a distancia (p20), se han descrito en BYV (Reed y col., 2003). Esto nos indica que aún quedan muchos estudios por realizar en cuanto a la determinación de función de proteínas, y no solo para las desconocidas sino que también para aquellas que ya se ha descrito una función, pudiéndose encontrar nuevas funciones para estas.

En cuanto a la variabilidad genética de los distintos aislados chilenos, no habría diferencias significativas entre los aislados de Chile y extranjeros. Los datos obtenidos de alineamientos nucleotídicos múltiples de las secuencias de la proteína de la cápside indican que los aislados 664, 766, 765 y el aislado NY1 de USA tienen un 98% de identidad. Así mismo, el alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida para aislado 766 con la secuencia completa del aislado de USA nos entregó una identidad de un 97%, resultado que indica que en el resto del genoma no se encontrarían regiones de alta variabilidad.

Pese a que en muchos virus de plantas se ha encontrado una importante variabilidad entre aislados provenientes de zonas geográficas alejadas (Rubio y col., 1999; Little y col., 2001; Shi y col., 2003), los resultados de esta memoria concuerdan con la reciente publicación de Turturo y col. (2005), en donde se describe al GLRaV-3 como una sola población casi indiferenciada. Este hecho, no deja de ser extraño dado el tamaño y lo complejo del genoma de este virus, además de que las infecciones por GLRaV-3 persisten por largo tiempo en los campos y por lo tanto las plantas están sometidas a infecciones repetidas por insectos y prácticas de cultivo. Sin embargo, la poca variabilidad encontrada es consistente con el rol predominante que tiene la transmisión por material vegetativo en la distribución de GLRaV-3.

La importancia que tiene la transmisión del virus por material de propagación en desmedro de la transmisión por vectores se ve reflejada en una distribución uniforme dentro de nuestro país. Al contrario, otros virus como Grapevine virus A (GVA) y Grapevine virus B (GVB) que dependen mayormente de vectores para su distribución, se encuentran con fuerte presencia en aquellos lugares donde sus vectores proliferan fácilmente.

Pese a no encontrarse una importante variabilidad entre aislados chilenos y extranjeros, el aislado 817 difiere en cierto grado de los demás aislados chilenos, como se observa en la Figura 6. Este aislado es el único que no proviene de una planta de variedad Merlot, sino que proviene de una Chardonnay. Esta posible relación de especificidad cepa/patógeno podría ser la explicación a este resultado, ya que aunque la población de GLRaV-3 se presenta como una variante predominante, pueden aparecer nuevas cepas frente a un cambio de hospedero. Asimismo, se ha descrito que en closterovirus ocurren eventos de recombinación intraespecíficos (Karasev, 2000), así como recientemente se encontraron eventos de recombinación en algunas zonas del genoma de GLRaV-3 (Turturo y col, 2005), lo que se constituye en otra posible explicación a las diferencias encontradas en el aislado 817. Estos eventos de recombinación se propician por la naturaleza del virus, ya que plantas infectadas pueden pasar largo tiempo con el virus, además de poder presentarse infecciones repetidas en ellas. Probablemente como consecuencia de la mayor variabilidad presentada por la variante 817 (con aproximadamente un 94% de identidad nucleotídica respecto al aislado 766), esta presentó un mayor grado de dificultad para su amplificación, hecho que valida nuestros resultados.

Asimismo, la mayor variabilidad encontrada en la región 5' del genoma del virus como también se ha descrito en GLRaV-1 (Little y col., 2000), podría corresponder a que la región

3' analizada contiene genes que codifican para proteínas estructurales y de movimiento, como lo son la CP, la CPd, y la HSP70. Estas proteínas cumplen un rol vital en la infección viral. Se ha descrito que las proteínas CP y HSP70 presentan alta presión selectiva (Turturo y col., 2005), lo que podría determinar la menor variabilidad presentada. Por el contrario la región 5' analizada comprendería solo los genes que codifican para la proteasa y para la metiltransferasa y una parte de la proteína de fusión, las cuales por su naturaleza pueden no estar sometidas a una alta presión selectiva.

De la misma manera, resulta interesante destacar que los resultados del análisis filogenético de los distintos aislados, concuerdan con los antes descritos en la literatura en cuanto a que GLRaV-3 estaría filogenéticamente más cerca de GLRaV-1 que de otros closterovirus (Fazeli y Rezaian, 2000). Ambos ampelovirus comparten una estructura del genoma muy similar, mayor que con otros representantes del género.

Además de los argumentos aquí expuestos para explicar la variabilidad genética encontrada en los aislados secuenciados, presente en la mayoría de los casos en el tercer nucleótido de cada codón, no se puede descartar que parte de esta variabilidad se deba al error producido por la *Taq* polimerasa. A pesar de que las condiciones utilizadas en cada PCR, principalmente la concentración de $MgCl_2$, son aquellas en las cuales se ha demostrado mayor fidelidad, se considera posible del orden de 1 error cada 2000 pares de bases (Eckert y Kunkel, 1990, Cline y col., 1996). Sin embargo, este grado de variación en las aproximadamente 18000 pares de bases secuenciadas es muy bajo, del orden de un 0,05%. Además cada uno de los amplicones obtenidos se secuenció al menos dos veces para descartar errores de secuenciamiento. Para disminuir aún más la posibilidad de error debido a la *Taq*, sería conveniente utilizar en el

futuro una polimerasa con capacidad de edición asociada a una actividad exonucleasa 3'→ 5', como así mismo secuenciar más de un clon para cada fragmento.

Una vez obtenida la secuencia que codifica la proteína de la cápside, se diseñaron partidores específicos para amplificar y clonar el gen en vectores de expresión, expresar esta proteína en bacteria y obtener anticuerpos que reconozcan la partícula viral. Esta proteína estructural es esencial en el ensamblaje de la partícula viral y en la protección del genoma (Alzhanova y col., 2001), por lo que se encuentra expuesta al medio, característica esencial que debe tener una proteína blanco para anticuerpos que puedan capturar una partícula viral. Además se ha descrito que la zona del genoma que codifica para esta proteína no presenta mayor variabilidad en otros closterovirus (Little y col., 2001) y ya se han desarrollado y probado anticuerpos contra esta proteína de GLRaV-3 en USA (Ling y col., 1997). Sin embargo no podemos tener la certeza de que estos anticuerpos desarrollados en el extranjero reconozcan específicamente aislados locales de GLRaV-3.

El gen que codifica para la proteína de la cápside se clonó en dos vectores los cuales produjeron la proteína fusionada a GST en el caso de pGEX-6P-1 y a TRX en el caso de pET 32a, lo que permitió posteriormente descartar la posibilidad de que los anticuerpos fueran inmunoreactivos contra la proteína de fusión. Se obtuvo una alta expresión de la proteína codificada en ambos vectores como se observa en la Figura 10. Posteriormente y después de estandarizar un protocolo adecuado, se logró purificar la GST-CP para inyectarla en conejo y ratón y la TRX-CP con el fin de utilizarla como antígeno para la evaluación de los anticuerpos obtenidos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos reconocieron específicamente la proteína recombinante de la cápside y presentaron un título de aproximadamente 1/4000 para el policlonal A y de 1/130000 para el monoclonal 5A5. Como

era esperable, el anticuerpo policlonal también reconoció la proteína GST en los ensayos realizados por *Western blot*. Sin embargo, la reactividad contra la CP fue mucho mayor (Figura 12B), lo que indica que la mayor parte de los anticuerpos del suero son específicos para la proteína de la cápside.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos se evaluaron con tejido infectado de vid. Los anticuerpos policlonales presentaron un título de aproximadamente 1/15000 y se descartó que exista reacción cruzada con los virus GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GFLV, GFkV y ToRSV (Tomato ringspot virus). A su vez, los anticuerpos monoclonales tampoco presentaron reacción cruzada con otros virus. El hecho de que no haya reacción cruzada con GLRaV-1 es un resultado interesante puesto que este fenómeno se ha descrito en anticuerpos desarrollados contra la proteína de la cápside de aislados franceses de GLRaV-1 y GLRaV-3, debido a que habría un epítipo común entre las CP de estos virus (Seddas y col., 2000). Esto indica que los anticuerpos obtenidos son específicos y sensibles como para ser utilizados en el desarrollo de métodos de diagnóstico específicos contra GLRaV-3.

La técnica de ELISA es hoy la más utilizada para la detección de plantas infectadas con virus. Sin embargo, la técnica de IC-RT-PCR se ha descrito como una herramienta mucho más sensible que el ELISA para el diagnóstico viral (Sefc y col., 2000). En este contexto se puso a prueba el método de IC-RT-PCR a través del cual también se analizaron nuestros anticuerpos. Es interesante analizar el resultado obtenido en la evaluación de los anticuerpos por IC-RT-PCR con tejido infectado (Figura 16A). Aquí se observó la tenue aparición de la banda esperada de 546 pb en un tubo donde no se había agregado anticuerpo para inmunocapturar, resultado que puede ser explicado por la propiedad intrínseca de las proteínas de adherirse al polipropileno (Rowhani y col., 1995), propiedad por la cual se adhieren también los

anticuerpos a estos tubos. Por otra parte, al evaluar la reacción cruzada del anticuerpo policlonal con GFLV mediante IC-RT-PCR se detectó una banda inespecífica de unos 1000 pb, que no correspondería a un amplificado de este virus, ya que se esperaba un amplificado de 814 pb. Este resultado se podría deber a que los partidores utilizados en este control eran degenerados, lo que aumenta la probabilidad de obtener amplificados inespecíficos, posibles falsos positivos, principalmente de regiones de otros virus con cierta similitud a la región donde amplifican estos partidores en GFLV o correspondientes al genoma de la vid. Este amplificado inespecífico no aparece al realizar la prueba utilizando el anticuerpo monoclonal, lo que da cuenta de la mayor especificidad de este último.

Una vez analizados y caracterizados los anticuerpos obtenidos mediante ELISA e IC-RT-PCR, se seleccionaron los anticuerpos policlonal A y el monoclonal 5A5 para el diagnóstico de plantas infectadas. Se analizaron 6 muestras de condición sanitaria desconocida por medio de tres sistemas de detección. ELISA, RT-PCR e IC-RT-PCR. Según los resultados obtenidos por ELISA resultó infectada con GLRaV-3 solamente la planta 4. Cabe destacar que este resultado se obtuvo solamente al utilizar nuestros anticuerpos, ya que con los anticuerpos comerciales obtenidos de Bioreba no se detectó la infección (Figura 18). Esto da cuenta de la calidad de los anticuerpos desarrollados ya que aparentemente la planta al poseer una carga viral muy baja no pudo ser detectada por los anticuerpos comerciales. La diferencia entre la señal obtenida para la planta 4 y el control positivo (planta 279), donde al utilizar los anticuerpos desarrollados en esta memoria se obtiene una señal aproximadamente 2 veces más intensa que al utilizar los anticuerpos del kit Bioreba avalan esta explicación. Sin embargo, la señal basal de los controles negativos entregada por el kit prototipo desarrollado en esta tesis, fue levemente mayor a la del kit Bioreba, la cual correspondía con el blanco FAL (Figura 18).

Este hecho podría deberse a la alta concentración del anticuerpo monoclonal 5A5 utilizada, 1:1000 siendo que su título era de 1:65000, lo que podría llevar a que una mayor cantidad de anticuerpos se adhiriera a las paredes de los pocillos de la placa sin haber capturado virus, ya que con el kit prototipo se detecta una señal muy similar al incubar, con extracto de planta sana, con el tampón de extracción de proteínas solamente, y al ensayo en el cual se agregó solo el monoclonal 5A5. En consecuencia, para futuros ensayos debería utilizarse una dilución mayor de este anticuerpo y adicionalmente podrían aumentarse los lavados en esta etapa del ELISA.

El diagnóstico por IC-RT-PCR confirmó los resultados obtenidos por ELISA. Al utilizar el anticuerpo policlonal para inmunocapturar la partícula viral se detectó la planta 4 como infectada con GLRaV-3. Sin embargo, al utilizar el anticuerpo monoclonal 5A5 no solo se detectó la infección en la planta 4, sino que también en la planta 6. Este resultado concuerda plenamente con el diagnóstico hecho previamente por nuestro proveedor (ver Tabla 2), donde se detectó infección en las plantas 4 y 6. Es importante mencionar que para el caso de la planta 6 aparece de manera muy tenue la banda de 546 pb que indica infección, esto puede deberse a que esta planta presentaba una carga viral aún mas baja que la planta 4, y por esta razón no pudo ser detectada por ELISA ni al inmunocapturar con el anticuerpo policlonal en la IC-RT-PCR. De la misma manera en algunos casos se detectó la aparición de amplificadores inespecíficos, dos bandas de mayor tamaño en cada una de las plantas infectadas y una banda también de mayor tamaño en el análisis de reacción cruzada con GFLV. Esto se debe principalmente a que este es un ensayo preliminar, el cual todavía debe optimizarse, por ejemplo subiendo las temperaturas de hibridación y utilizando partidores específicos y no degenerados en los ensayos de reacción cruzada con otros virus. Sin embargo, la banda de

mayor tamaño (de alrededor de 1250 pb) encontrada en las plantas infectadas, corresponde a la amplificación de 1244 pb del partidador LC1F con el LR3C629 remanente de la reacción de transcripción reversa donde fue utilizado. Así mismo, la banda de 700 pb que corresponde efectivamente a un amplificado en el gen que codifica para la proteína de la cápside, se generó por una amplificación inespecífica de los partidores LC2 y LR3C629. Por lo tanto, el triplete obtenido en las plantas infectadas analizadas por IC-RT-PCR corresponde efectivamente a amplificados de GLRaV-3. De todas maneras, sería recomendable a futuro utilizar un solo partidador para realizar la transcripción reversa en la IC-RT-PCR.

Estos resultados nos indican que el método más sensible para la detección de vides infectadas con GLRaV-3 es la inmunocaptura RT-PCR utilizando el monoclonal 5A5. Esto pese a que era de esperar que los sueros policlonales capturaran con mayor eficiencia la partícula viral puesto que son varios los epítomos que se estarían reconociendo. La diferencia entre la inmunocaptura con el suero policlonal y con el anticuerpo monoclonal puede deberse a una diferencia de título, puesto que la concentración de anticuerpos en el líquido ascítico es mucho mayor que la obtenida de un antisuero. Otra posible explicación de este resultado es que el epítomo que está reconociendo el anticuerpo monoclonal está más expuesto al medio externo que el reconocido por el suero policlonal, ya que hay que recordar que estos anticuerpos se desarrollaron contra la proteína viral recombinante desnaturalada.

Es interesante plantear una explicación por la cual se pueda argumentar la diferencia entre los resultados obtenidos por extracción de ARN y posterior RT-PCR y por IC-RT-PCR. El primer método se ha descrito como un método eficaz en la detección viral (Minafra y Hadidi, 1994), a pesar de ello, nosotros no pudimos detectar infección por esta técnica (Figura 20). Este resultado podría atribuirse a que este método requiere romper la partícula viral para extraer

ARN el cual es mucho más sensible a degradación que un virus intacto. En cambio al capturar la partícula viral completa el ARN está menos accesible a la acción de nucleasas. Además al realizar el paso de inmunocaptura se está concentrando el virus, en cambio al extraer ARN total, la concentración de ARN viral esta muy diluida dentro del extracto.

Por otra parte, el hecho de que los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas y con el uso de distintos anticuerpos no hayan coincidido totalmente con los obtenidos previamente en la Facultad de Agronomía puede deberse principalmente a que este material estuvo guardado por varios meses a 4°C antes de realizar la extracción de ARN y de proteínas, tiempo durante el cual puede haber bajado notablemente la carga viral, por la actuación de nucleasas y proteasas que fueron degradando el ARN y las proteínas virales. Es por esto que en futuros trabajos se recomienda trabajar con tejido fresco, sobretodo en el diagnóstico de plantas infectadas.

Los resultados presentados en esta tesis, si bien no avalan la hipótesis planteada en un principio, puesto que los aislados chilenos de GLRaV-3 no presentaron una importante variabilidad con respecto a aislados extranjeros, justifican plenamente el trabajo realizado puesto que se logró obtener anticuerpos altamente específicos contra el virus GLRaV-3, permitiéndonos desarrollar métodos efectivos, de gran sensibilidad (principalmente en el caso de la IC-RT-PCR), de menor costo y superior a kits comerciales disponibles para el diagnóstico de este virus. Sin embargo, aún se debe continuar trabajando en la puesta a punto y optimización del método de IC-RT-PCR, con el fin de poder contar con un producto comercializable, al que puedan acceder tanto productores como viveros con el fin de cumplir con los requisitos impuestos por el SAG a través del programa de certificación de plantas libres de virus.

V. CONCLUSIONES

- Utilizando genotecas construidas a partir del genoma de distintos aislados nacionales de GLRaV-3, se obtuvo la secuencia completa de la zona codificante del genoma de un aislado (766), y secuencias parciales de 3 aislados adicionales. Análisis de éstas revelaron una variabilidad mínima al compararlos entre ellos y con aislados de GLRaV-3 extranjeros. La población de GLRaV-3 se presenta como poco variable a excepción de un aislado, el 817, que presentó mayor variabilidad, respecto a los otros aislados virales chilenos y al aislado viral extranjero. Los distintos ORFs predichos por la secuencia del genoma de los aislados chilenos se corresponden perfectamente con los antes descritos para el aislado de USA.
- Después de clonar y expresar el gen que codifica para la proteína de la cápside del aislado 766 de GLRaV-3 en *E. coli*, se obtuvieron anticuerpos policlonales y monoclonales contra esta proteína. Estos anticuerpos mostraron una alta especificidad y un excelente título tanto contra la proteína purificada como con extractos de plantas infectadas por el virus.
- Se desarrollaron 2 métodos eficientes para la detección del virus mediante ELISA e IC-RT-PCR. Pese a que los protocolos para estas técnicas aún se deben optimizar y estandarizar, se puede concluir que el método más eficiente y sensible para la detección de vides infectadas con GLRaV-3 es la IC-RT-PCR.

VI. REFERENCIAS

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

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

Andersen, K. y 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*. *Virology*. 241: 304-311.

Arancibia, M. (1988). Identificación de los virus asociados al enrollamiento clorótico de la vid (*V. vinifera* L.) presentes en el cv. Black seedless y la obtención de plantas limpias de virus por termoterapia y cultivos de meristemos. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Chile.

Burzio, L. A., Saez, C., Pardo, J., Waite, J. H. y 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.

Carstens, R. (2002). Vineyard virusses. Leafroll overview. Winetech. <http://www.winetech.co.za/news-leafroll.php3>.

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

Clark, M. y Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Cline, J., Braman, J. y Hogrefe, H. (1996). PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucl. Acids. Res.* 24: 3546-3552.

Covarrubias, C., (1993). Virus en Frutales: aspectos económicos. Serie la Platina 49: 67-73. INIA, La Platina, Santiago de Chile.

Credi, R y Giunchedi, L. (1996). Grapevine leafroll-associated viruses and grapevine virus A in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy. *Plant Pathol.* 45:1110-1116.

Dolja, V., Karasev, A. y Koonin, E. (1994). Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 261-285.

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

Fazeli, C. y Rezaian, M. (2000). Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. J. Gen. Virol. 81: 605-615.

Frangioni, J. y Neel, B. (1993). Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. Anal. Biochem. 210:179-187.

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

Goheen, A. y Cook, J. (1959). Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality and yields. Amer. J. Enol. Viticult. 10: 173-181.

Gugerli, P. (2003). Grapevine leafroll and related viruses. 14th ICVG Conference, Locorotondo, Italia. Extended abstracts: 25-31.

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

Harlow E. y Lane D. (1988). Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory.

Herrera, G. (2001). Enfermedades de frutales causadas por virus en Chile. Boletín INIA 52: 46-50.

Hull, R. (2002). Matthew's Plant Virology. Fourth edition. Academic Press.

Jordan, R. (1990). Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies; monoclonal antibody applications for viruses. Serological methods for the detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual. Hampton R, Ball S, De Boer S. APS press. p389.

Karasev, A. (2000). Genetic diversity and evolution of closterovirus. Ann. Rev. Phytopathol. 38:293-324.

Kerschbaumer, R., Hirschl, S., Scwager, C., Ibl, M., Koenig, R. y Himmler, G. (1997). Singlechain Fv fusion proteins suitable as coating and detection reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Anal Biochem 249: 219-227.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. y Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Lillo, C. y Pérez Harvey, J. (2002). Resultados de análisis virológicos en vides (*Vitis vinifera* L.) de bloque de selección clonal agro UC colectadas en antiguos viñedos de Chile de las regiones: Metropolitana, VI y VII. Resúmenes presentaciones orales. XII Congreso Nacional de Fitopatología.

Ling, K., Zhu, H. y Gonsalves, D. (2004). Complete nucleotide sequence and genome organisation of the Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus Ampelovirus. *J. Gen. Virol.* 85: 2099-2102.

Ling, K., Zhu, H., Drong, R., Slightom, J., McFerson, J. y Gonsalves, D. (1998). Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus 3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. *J. Gen. Virol.* 79: 1299-1307.

Ling, K., Zhu, H., Alvizo, H., Hu, J., Drong, R., Slightom, J. y Gonsalves, D. (1997). The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Arch. Virol.* 142: 1101-16.

Little, A., Fazeli, C. y Rezaian, M.A. (2001). Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1. *Virus Res.* 80: 109-116.

Martelli, G. (2003). Grapevine virology highlights 2000-2003. 14th ICVG Conference, Locorotondo. Extended abstracts: 3-10.

Minafra, A. y Hadidi, A. (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected issue by cDNA amplification. *J. Virol. Methods* 47: 175-188.

Mulder, N., Apweiler, R., Attwood, T., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Cerutti, L., Copley, R., Courcelle, E., Das, U., Durban, R., Fleischmann, W., Gough, J., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lonsdale, D., Lopez, R., Letunic, I., Madera, M., Maslen, J., McDowall, J., Mitchell, A., Nikolskaya, A., Orchard, S., Pagni, M., Ponting, C., Quevillon, E., Selengut, J., Sigrist, C., Silventoinen, V., Studholme, D., Vaughan, R. y Wu, C. (2005). InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Res.* 33: 201-205.

Nassuth, A., Pollari, E., Helmeczy, K., Stewart, S. y Kofalvi, S. (2000). Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods* 90: 37-49.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2005). Estadísticas de la agricultura chilena/Catasro fútilcola. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago de Chile www.odepa.gob.cl.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2003). Estadísticas de la agricultura chilena/Catasro fútilcola. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago de Chile www.odepa.gob.cl.

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

Prodan, S., Montealegre, E., Aballay, A.M., Pino, A.M., Fernández, R., Reyes, R. y Fiore, N. (2003). Report of new viral diseases in Chilean grapevines. 14th ICVG Conference.

Reed, J., Kasschau, K., Prokhnevsky, A., Gopinath, K., Poque, G., Carrington, J. y Dolja, V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellow virus. *Virology* 306: 203-209.

Rosciglione, B. y Gugerli, P. (1986). Maladies de l'enroulement et bois strié, de la vigne: analyse microscopique et serologique. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic* 18: 207-211.

Rowhani, A., Maningas, M., Lile, L., Daubert, S. y Golino, D. (1995). Development of a Detection System for Viruses of Woody Plants Based on PCR Analysis of Immobilized Virions. *Phytopathology* 85: 347-352.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 6463-5467.

Seddas, A., Haidar, M., Greif, C., Jacquet, C., Cloquemin, G. y Walter, B. (2000). Establishment of a relationship between grapevine leafroll closteroviruses 1 and 3 by use of monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 49: 80-85.

Sefc, K., Leonhardt, W. y Steinkellner, H. (2000). Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *J. Virol. Methods* 86: 101-106.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Catastro vitícola 2003. www.sag.cl

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

Shi, B., Habili, N. y Symons, R. (2003). Nucleotide sequence variation in a small region of the Grapevine fleck virus replicase provides evidence for two sequence variants of the virus. *Ann. Appl. Biol.* 142: 349-355.

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

Sit, T. L., Haikal, P. R., Callaway, A. S. y 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.

Stewart, S. and Nassuth, A. (2001). RT-PCR Based Detection of *Rupestris stem pitting associated virus* Within Field-Grown Grapevines Throughout the Year. *Plant Dis.* 85: 617-620.

Szilazy, D., Salánky, K. y 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.

Turturo, C., Saldarelli, P., Dong, Y., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G. (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J. Gen. Virol.* 86: 217-224.

Vance, V. y Vaucheret, H. (2001). RNA Silencing in Plants-Defense and Counterdefense. *Science* 292:2277-2280.

Walter, B. y Martelli, G.P. (1997). Clonal and sanitary selection of the grapevine. In: Walter, B. (Ed.), *Sanitary Selection of the Grapevine: Protocols for Detection of Viruses and Virus-like Diseases*. Les Colloques 86: 43-95. INRA. France.

Weber, H., Schultze, S. y 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.

<http://www.dpvweb.net/notes/showgenus.php?genus=Ampelovirus>.