



Competencia de dos diferentes cepas de un virus en un mismo huésped



Autores: Lucía de Urza Palomares, Alanna Garcia Navarro y Andrea Madrid Baixauli.

Tutores: Veronica Truniger Rietman (CEBAS-CSIC) y José María Caballero Fernández-Rufete (Juan Carlos I).

Introducción

- Hemos realizado este trabajo en colaboración con el Grupo de Patología Vegetal del Centro de Biología Aplicada y Edafología del Segura (CEBAS-CSIC).
- Hemos trabajado con CABYV (Cucurbit Aphid- Borne Yellows Virus) que es un virus de ARN monocatenario positivo (el ARN vírico, de cadena sencilla, es al mismo tiempo ARN mensajero). Fue detectado por primera vez en España en el campo de Cartagena (2003) en cultivos de pepino y melón. Los síntomas que se observan en plantas infectadas son el amarilleo de la hoja menos las venas, necrosis de hojas viejas y algo de enanismo.
- El objetivo científico de este trabajo es estudiar la capacidad de multiplicación de dos diferentes virus CABYV, que se diferencian tan solo en su 3'-CITE (60 nucleótidos) poniéndolos a competir en plantas de melón y pepino. Los dos CABYV son el CABYV español silvestre (E) y una variante de este en la que le hemos intercambiado su 3'-CITE por el 3'-CITE de un aislado asiático (X). Como objetivo de aprendizaje, conocer técnicas de biología molecular como la agroinfiltración, extracción ARN, RT-PCR, la hibridación molecular (no radioactiva) y separación de ADN y ARN por tamaño por electroforesis.
- Los dos aislados de CABYV tienen 3'-CITEs diferentes, y estas juegan un papel en la regulación de la traducción de las proteínas virales. Experimentos de traducción han mostrado que en presencia del 3'-CITE de los aislados asiáticos, la traducción es el doble de eficiente que en presencia del 3'-CITE del aislado español (tipo europeo). Por tanto, puede ser que el virus con el 3'-CITE asiático sea más eficiente a la hora de competir por la invasión de la planta. Ambos virus se diferencia en una secuencia de 60 nucleótidos.



Metodología

- Para realizar este proyecto hemos usado diversas técnicas de biología molecular, que son:

1. Infiltración de plantas

La infección con *Agrobacterium* se lleva a cabo por infiltración de cultivo en el envés de los cotiledones de melón o pepino. Se lleva a cabo con las dos formas del virus. Esperamos dos semanas para dar tiempo a que se produzca la infección.

2. Extracción de ARN

Se machacan las hojas en nitrógeno líquido. Se sigue un protocolo para extraer el ARN con diversos reactivos (Fenol, Isopropanol, Cloroformo,...) y procesos de centrifugado. Para determinar si la extracción se ha realizado correctamente, se lleva a cabo una electroforesis de ARN.

3. Detección del ARN vírico

Para la detección del ARN hemos usado la hibridación molecular, que es un proceso de unión de dos cadenas complementarias de ADN, ARN o ADN y ARN. El ARN vírico se hibridará con la secuencia complementaria añadida por nosotros.

4. Retrotranscripción

Mediante este proceso se fabrica una cadena de ácido desoxirribonucleico (cADN) complementario al ácido ribonucleico vírico. Para este proceso se utilizan unas enzimas llamadas retrotranscriptasas. El cADN se encuentra en muy poca cantidad, por lo que se amplifica mediante PCR.

5. PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Es una técnica con la que pueden generarse millones de moléculas idénticas, a partir de una mínima cantidad de ADN. Añadiendo los cebadores adecuados (pequeñas moléculas que actúan como punto de inicio para la formación de nuevas cadenas de ADN), podemos conseguir que se amplifique el cADN de una u otra forma del virus (E o X).



Resultados

De las plantas infiltradas, resultaron infectadas 8 plantas de pepino y 13 de melón. En estas plantas infectadas se han podido detectar por RT-PCR las siguientes variantes:

Pepino: 1-E
3-X
4-EX

Melón: 10-X
3-EX

- E -> español
- X -> asiático



Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que...

- Las 3'-CITE's pueden tener un papel importante en la regulación de la traducción, hasta tal punto que una pequeña diferencia en sus secuencias de nucleótidos también puede marcar diferencia en su capacidad infectiva y competitiva.
- El virus al que se le ha incorporado la 3'-CITE del aislado asiático muestra mayor capacidad de infección que la forma silvestre española.