

Tesis de Posgrado

Clonado molecular del gen de la proteína de cubierta del PepSMV y obtención de plantas transgénicas resistentes

Rabinowicz, Pablo Daniel

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rabinowicz, Pablo Daniel. (1995). Clonado molecular del gen de la proteína de cubierta del PepSMV y obtención de plantas transgénicas resistentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2777_Rabinowicz.pdf

Cita tipo Chicago:

Rabinowicz, Pablo Daniel. "Clonado molecular del gen de la proteína de cubierta del PepSMV y obtención de plantas transgénicas resistentes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2777_Rabinowicz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

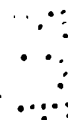
Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CLONADO MOLECULAR DEL GEN
DE LA PROTEINA DE CUBIERTA DEL
PepSMV Y OBTENCION DE PLANTAS
TRANSGENICAS RESISTENTES**

PABLO DANIEL RABINOWICZ

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



DIRECTOR: DR. ALEJANDRO MENTABERRY

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR (INGEBI-CONICET)**

1995

Nº 2.77

INDICE

1. Agradecimientos	1
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	4
3.1 El género <i>Potyvirus</i>	4
3.2 La secuencia nucleotídica de la CP como criterio taxonómico para la clasificación del género <i>Potyvirus</i>	10
3.3 El pimiento y el pepper severe mosaic virus (PepSMV)	11
3.4 Aplicaciones de la transformación de plantas	12
3.5 Resistencia antiviral	14
4. Objetivos	23
5. Materiales y Métodos	24
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	24
5.2 Aislados virales	24
5.3 Variedades vegetales	25
5.4 Plásmidos	25
5.5 Purificación de virus	26
5.6 Microscopía electrónica	27
5.7 Purificación del ARNg viral	27
5.8 Purificación de ADN plasmídico	27
5.9 Purificación de ADN genómico de tabaco	28
5.10 Purificación de ARN total de tabaco	29
5.11 Marcación de sondas por iniciación al azar de la polimerización	29
5.12 Electroforesis	30
5.13 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	31
5.14 Aislamiento de fragmentos de ADN por electroelución	31
5.15 Síntesis de ADNc de doble cadena	32
5.16 Subclonado de fragmentos de ADN en el vector M13	33
5.17 Preparación de ADN de cadena simple a partir de fagos M13	34
5.18 Preparación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	35
5.19 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	36
5.20 Transferencia de ADN a membranas de <i>nylon</i> (<i>Southern-blot</i>)	36
5.21 Transferencia de ARN a membranas de <i>nylon</i> (<i>Northern-blot</i>)	37
5.22 Hibridación	37
5.23 Deleciones anidadas de fragmentos de ADNc clonados en pUC13	38
5.24 Secuenciación de ADN	38
5.25 Electroporación de <i>A. tumefaciens</i>	39
5.26 Transformación de discos de hoja de tabaco	40
5.27 Rusticación de plantas	40
5.28 Ensayo de actividad β -glucuronidasa	41
5.29 Ensayo de actividad de NPT II	41
5.30 Selección de las plantas transgénicas por germinación	42
5.31 Inoculación de plantas con virus	42
5.32 Ensayos de ELISA	43
5.33 Programas de computación	44
5.34 Acelerador de micropartículas	44
6. Resultados	45
6.1 Clonado y secuenciación del gen de la CP de PepSMV	45
6.2 Construcción de genes quiméricos de la CP de PepSMV para ser expresados en plantas	50
6.3 Transformación de plantas de tabaco	51
6.4 Ensayos para evaluar el nivel de resistencia antiviral	53

7. Discusión	62
7.1 Secuencia nucleotídica de la CP del PepSMV e implicancias en su ubicación taxonómica	62
7.2 Producción de plantas transgénicas	64
7.3 Resistencia antiviral	65
7.4 Avances hacia la transformación de pimiento	72
8. Bibliografía	74

La primera parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron publicados como *cDNA Sequence of the Pepper Severe Mosaic Virus Coat Protein Gene*. Pablo D. Rabinowicz, Fernando F. Bravo-Almonacid and Alejandro N. Mentaberry, 1993, *Plant Physiology* **103**: 1023.

El manuscrito correspondiente a la publicación de la segunda parte de este trabajo se encuentra en preparación, para ser remitido a *Plant Cell Reports* como *Transgenic Plants Expressing the PepSMV CP Gene Are Resistant to the Virus*.

Paralelamente a este trabajo, el autor participó en el trabajo que será remitido a *Phytopathology* como *cDNA Sequence of the Onion Yellow Dwarf Virus Coat Protein Gene and Immunological Characterization of the Coded Protein*.

1. AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Alejandro Mentaberry, por permitirme realizar este trabajo de tesis en su grupo de investigación y por enseñarme, entre muchas otras cosas, que no existen soluciones mágicas.
- Al Dr Héctor Torres y a la Dra. Mirtha Flawiá por permitirme trabajar en el INGEBI y apoyarme desde mucho antes y durante la realización de mi tesis.
- A la Universidad de Buenos Aires por otorgarme la beca que me sustentó durante este período.
- Al Dr. Alberto Kornblihtt por su ayuda para comenzar a trabajar en el INGEBI, ayuda que me sigue brindando cada vez que la necesito.
- A los Drs Gerardo Glikin, María Teresa Téllez Iñón, Mariano Levin, Alejandro Paladini, Norberto Judewicz, Luis Jiménez de Azúa, Carmen Rivas, quienes me enseñaron algo, hace mucho o hace poco.
- A la Ing. Agr. Olga Gracia y su grupo del INTA-Luján de Cuyo, por su buena voluntad y su gran ayuda en el trabajo de invernadero.
- Al Dr. Esteban Hopp y su grupo del INTA-Castelar, por su desinteresada ayuda, siempre que fue necesaria.
- Al Dr. José La Torre, por su gentileza en permitirme realizar microscopías electrónicas en el instituto que él dirige.
- Al Dr. Christophe Robaglia y su grupo del INRA-Versailles, por su invaluable colaboración.
- A los amigos y compañeros del "papa's group", Fernando Bravo-Almonacid (mi segundo jefe), Gaby Calamante, Liliana Haim, Ximena Ares, Florencia Rodríguez, Silvia Cabral, Betina Orman, Rosana Celnik, Pablito Zaltz, Ken Kobayashi, Alejandra Mandel, Sonia Lafon, Luciana Molinero, Bárbara Rattner, a todos y cada uno por ser como es, porque si no fueran como son, el grupo no sería lo que es.
- A los pioneros del 211, Raúl Andino, Gabriel Aisemberg, Guillermo Taccioli, Erich Grotewold, y en particular a Danny Altschuler y Ricky Attar, que me iniciaron en esto y espero alguna vez poder retribuirles.
- A los amigos y compañeros que estuvieron y algunos que ya pronto estarán de vuelta, trabajando codo a codo (voy a hacer un poco de historia, y espero me perdonen si alguno se me olvida) Jorge Muschietti, Horacio Martinetto, Omar Coso, Andrés Muro, Alejandro Gutmann, Javier Cáceres, Patricia Levi-Yeyati, Mercedes Goin, Graciela Bianchini, Clarita Rubinstein, Facundo Batista, Leo Erijman, Gabriela Levitus, Enrique Mesri, Anabella Srebrow, Malala Gómez, Claudia Ochatt, Sandra Ogueta, Nora Paños, Viviana Bernath, Diego Fraidenaich, Alfredo Panebra, Judith Fridman, Laura Pregliasco, Marcela Ortiz, Cristina Michailof y Adriana Urman.
- A los amigos y compañeros de ahora, Albertito, Marisa, Gustavo (el "Pes"), Gustavito Melen, Susana, Cristina, Gustavo Macintosh, Rita, Santiago, el negro Claudio, Adolfo, Guillermo, Alejandro Schijman, Dan, Claudia, Martín, Paulita Cramer, Andrea, Inés, Pablo López Bergami, Claudio

Pereira, Joaquín, Marcelo Cerdán, Marcelo Rubinstein, Verónica, Marcelita, Larisa, Juan, Liliana, Pablo y Silvia Arteman, Eliana, Tomás, Paula Duek, Gabriel, Tito, Irma, Norberto Malandra, Mari, Nené, Mónica, Leonor, Marta y Marianito.

A los viejos, a Sergio, a Eve, a Silvia, a María, a Esteban (además de todo por la maravillosa compu) y por supuesto a Lucía y Ana Laura, por todo el cariño y apoyo que me brindan.

Y más que a nadie a Corina, que me ayudó y soportó desde "Introducción" hasta la plasticola.

2. ABREVIATURAS

aa: aminoácido

AcO: acetato

BPB: azul de bromo fenol

DIECA: ácido dietilditiocarbámico

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GUS: β -glucuronidasa

IPTG: isopropil tiogalactósido

MES: ácido (2-[N-morfolino] etanesulfónico

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanesulfónico

nt: nucleótidos

PAES: ácido polietanolensulfónico

pb: pares de bases

PEG: polietilenglicol

TBE: Tris-borato-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletileneamina

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

X-Glu: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

3. INTRODUCCION

3.1 El género *Potyvirus*

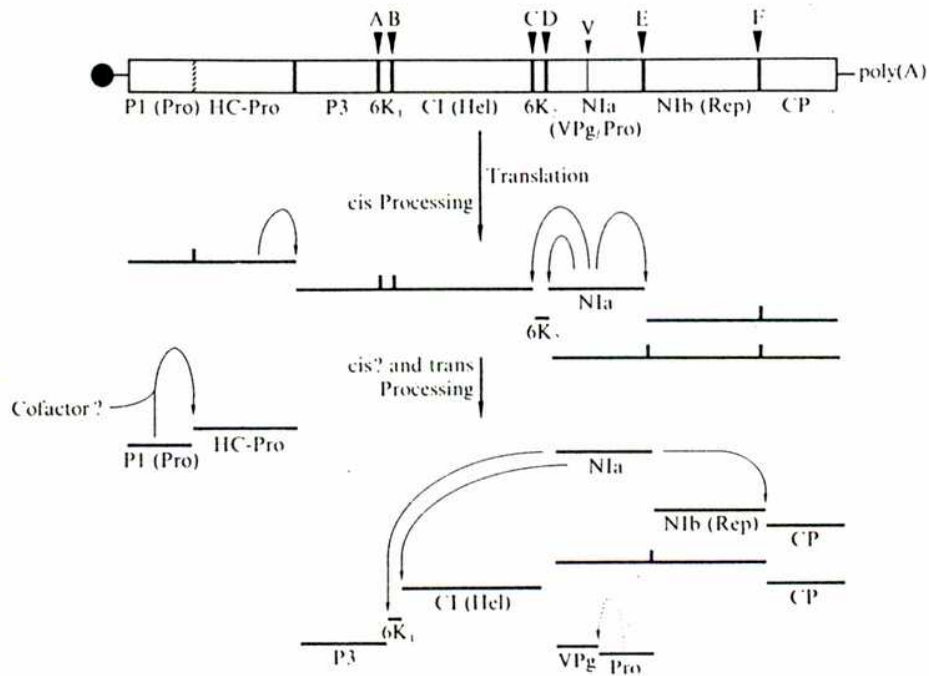
Anteriormente, se incluían en el "grupo de los potyvirus" a todos los miembros de la familia Potyviridae y se proponía una subclasificación basada en grupos según el vector de transmisión involucrado (Francki *et al.*, 1991) o según el tipo de inclusión cilíndrica que sus miembros producían en el huésped (ver más abajo, Hollings y Brunt, 1981a y b). Actualmente, se divide a la familia Potyviridae en tres géneros definitivos y un posible género (Hari, 1995). Los nombres aprobados de los tres géneros definitivos son: *Potyvirus*, cuyo miembro tipo es el potato virus Y (PVY) e incluye a los virus transmisibles por áfidos; *Bymovirus*, que comprende a los virus transmitidos por hongos y cuyo miembro tipo es el barley yellow mosaic virus (BaYMV), y *Rymovirus*, cuyo miembro tipo es el ryegrass mosaic virus (RGMV) e incluye virus transmitidos por ácaros. El posible género dentro de la familia Potyviridae es *Impovirus*, del que el sweet potato mild mottle virus (SPMMV) es el miembro tipo y son transmitidos por la mosca blanca. Recientemente, el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) publicó la lista actualizada de los nombres de todos los virus vegetales (Fauquet y Martelli, 1995) donde se detallan los miembros definitivos y posibles de la familia Potyviridae que es la más amplia entre las familias de virus de plantas y es responsable de cuantiosas pérdidas en todo tipo de cultivos comerciales (Ward y Shukla, 1991). Los miembros del género *Potyvirus* tienen partículas filamentosas ligeramente flexibles, que miden entre 11 y 15 nm de ancho y aproximadamente 750 nm de largo. Las partículas contienen un 5% de ácido nucleico y un 95% de proteína. El genoma viral está constituido por una sola molécula de ARN (ARNg) de polaridad positiva y de 3000 a 3500 kDa (aproximadamente 10000 nt). Esta molécula de ARN se encuentra poliadenilada en su extremo 3' y lleva una proteína VPg unida covalentemente a su extremo 5' (Hari, 1981; Riechmann *et al.*, 1989). La cápside viral está compuesta por aproximadamente 2000 subunidades proteicas de un único polipéptido de alrededor de 30 kDa, que se disponen en forma helicoidal recubriendo a la molécula de ARNg, para formar un cilindro. Una de las características más

conspicuas del género *Potyvirus* es la inducción de cuerpos de inclusión cilíndricos (en forma de molinete) en el citoplasma (Hollings y Brunt, 1981b; Ward y Shukla, 1991). Estas inclusiones están formadas por la proteína de las inclusiones cilíndricas (CI) codificada por el virus. Muchos potyvirus inducen la formación de inclusiones citoplásmicas amorfas y algunos inducen inclusiones nucleares. Los potyvirus se transmiten por áfidos y, experimentalmente por inoculación mecánica. La especificidad de huésped de los miembros de este género evita la competencia interespecífica entre ellos. En general, los síntomas de la infección por potyvirus en dicotiledóneas consisten en la aparición de mosaico, rugosidad o motas en las hojas, clorosis de nervaduras, disminución en la producción y deformación de frutos, necrosis, enanismo, etc. (Hollings y Brunt, 1981a y b).

El ARNg de los potyvirus actúa como mensajero y se traduce como una poliproteína precursora de entre 340 y 370 kDa (Allison *et al.*, 1986) que es procesada mediante proteasas específicas codificadas por el mismo virus (Carrington *et al.*, 1990). Este clivaje da lugar a ocho polipéptidos que, ordenados según su ubicación en la poliproteína precursora desde el amino al carboxilo terminal son: la proteína P1 (20 a 30 kDa) que tiene actividad de proteasa y está involucrada en la replicación; el componente auxiliar para la transmisión por áfidos que tiene también actividad de proteasa (HC-Pro, de aproximadamente 55 kDa); la proteína P3 (de 40 a 50 kDa); la proteína CI (de aproximadamente 70 kDa), que tiene actividad helicasa; un péptido de 6 kDa (6K; en el plum pox virus [PPV] se describe un segundo posible péptido de 6 kDa ubicado entre la CI y la P3), cuya función estaría también relacionada con la replicación; la proteína "a" de la inclusión nuclear con actividad de proteasa y de VPg (NIa, de alrededor de 50 kDa); la proteína "b" de la inclusión nuclear con presunta actividad de ARN replicasa (NIb, de entre 50 y 60 kDa) y la proteína de cubierta (CP, de alrededor de 30 kDa). La región 5' no codificante de los potyvirus comprende entre 130 y 200 nt, mientras que la región 3' no codificante es más variable en largo (alrededor de 200-400 nt) y en general contiene secuencias ricas en UA (Fig. 3.1).

Existen evidencias sobre la activación de la traducción por parte de la región 5' no traducida del tobacco etch virus (TEV) y del pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) (Carrington y Freed, 1990; Nicolaisen *et al.*, 1992). Esta activación resultó ser independiente del *Cap* en el extremo 5' y es

FIGURA 3.1: Diagrama del procesamiento de la poliproteína de PPV. Hel: helicasa; Rep: replicasa; A-F: sitios de reconocimiento para la proteasa N1a; V: sitio de reconocimiento para la proteasa N1a que daría origen a la VPg; ver más detalles en el texto (reproducido de Riechmann *et. al.*, 1992).



debida, presumiblemente, a un sitio interno de entrada para el ribosoma (Basso *et al.*, 1994). La poliproteína producida es autoproteolizada en 5 sitios por la serin-proteasa N1a, liberando a las CP, N1b, N1a, 6K y CI (Ghabrial *et al.*, 1990; Carrington y Dougherty, 1987a; Hellmann *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1988; García *et al.*, 1989b;). La P3 es clivada de la HC-Pro por la actividad cistein-proteasa de esta última (Carrington *et al.*, 1989a; Carrington *et al.*, 1989b). La serin-proteasa P1 se separa por autoproteólisis de la HC-Pro (Carrington *et al.*, 1990; Verchot *et al.*, 1991).

Procesamiento de la poliproteína. Los sitios de reconocimiento para la proteasa N1a han sido caracterizados mediante diferentes enfoques experimentales, como el análisis de los productos de proteólisis *in vivo*, *in vitro* o en *E. coli* (Carrington y Dougherty, 1987a; Carrington y Dougherty, 1988; Carrington *et al.*, 1988; Dougherty *et al.*, 1988; Dougherty *et al.*, 1989a; García *et al.*, 1989a) o por análisis de secuencias (Robaglia *et al.*, 1989; Allison *et al.*, 1986). Estos trabajos permitieron definir que el sitio de reconocimiento para N1a corresponde a siete aminoácidos y el clivaje se produce entre el sexto y séptimo. El reconocimiento de dichos sitios de clivaje en un determinado virus es específico para la proteasa de ese mismo virus (García *et al.*, 1989a; García y Laín, 1991; Parks y Dougherty, 1991). Sin embargo, dentro de un mismo virus, los sitios de reconocimiento difieren en la susceptibilidad a la proteólisis por N1a (Carrington y Dougherty, 1987a; Hellmann *et al.*, 1988; Carrington y Dougherty, 1987b; Carrington *et al.*, 1988; García *et al.*, 1990; Dougherty *et al.*, 1989a; Dougherty y Parks, 1989). Dado que los potyvirus no pueden regular su expresión génica variando los niveles de transcripción o traducción, éste podría ser un mecanismo de regulación de la expresión de los productos génicos ya que posiblemente las proteínas inmaduras no son funcionales o tienen una función diferente.

La HC-Pro es necesaria para la transmisión por áfidos y para la movilización sistémica (ver más abajo) y también es responsable de su autoproteólisis en su extremo carboxilo (Carrington *et al.*, 1989a; Carrington *et al.*, 1989b). Su sitio de clivaje corresponde a una secuencia G-G en un consenso adecuado e, *in vitro*, no es capaz de actuar en *trans*.

Carrington *et al.* (1990) demostraron que la proteólisis del extremo carboxilo de la P1 no es llevada a cabo por la N1a ni por la HC-Pro. Una

poliproteína que incluye la P1 no cataliza esta reacción *in vitro* pero sí *in vivo* en plantas transgénicas. Por otro lado se ha demostrado que en la secuencia de P1 existen motivos conservados en serin-proteasas que son indispensables para la actividad de esta proteína (Verchot *et al.*, 1992). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la P1 está involucrada en su autoprosesamiento, pero que necesita de un factor presente en la planta o en el mismo virus.

Replicación. Aún no se han determinado con precisión de qué manera actúan los factores que participan en el proceso replicativo de los potyvirus. Por similitud de secuencias se asignó la función de ARN polimerasa ARN dependiente a la proteína N1b (Domier *et al.*, 1987; Laín *et al.*, 1989a; Robaglia *et al.*, 1989; Poch *et al.*, 1989) y más recientemente, se encontró que virus mutagenizados en la región que codifica la N1b son deficientes para la replicación (Klein *et al.*, 1994). Li y Carrington (1995) demostraron que la N1b aportada en *trans* puede complementar virus mutados en esa proteína y defectivos para la replicación. Se ha demostrado que la P1 también está involucrada en este proceso, ya que virus mutantes a los que se les deletó la P1 son defectivos para la replicación, y que la expresión de esta proteína en protoplastos transgénicos es capaz de actuar en *trans* para aumentar el nivel de replicación de los virus mutantes (Dolja *et al.*, 1993; Verchot y Carrington, 1995). La presencia de un dominio de unión a nucleótidos (Gorbalenya y Kooning, 1989) en la proteína CI fue reportada en varios del género *Potyvirus* (Domier *et al.*, 1987; Laín *et al.*, 1989a; Robaglia *et al.*, 1989). La función asignada a esta proteína a partir de la comparación de secuencias es la de helicasa. Estos datos la relacionan con el proceso de replicación (Gorbalenya *et al.*, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1989; Hodgman, 1988; Laín *et al.*, 1989b; Company *et al.*, 1991). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que la CI posee actividad de helicasa dependiente de la hidrólisis de nucleósidos trifosfato (Lain *et al.*, 1990; Laín *et al.*, 1991) y se encontró que la proteína purificada estaba asociada a una actividad de ATPasa inducida por ácidos nucleicos (Lain *et al.*, 1991). Otras evidencias que relacionan a la CI con la replicación son las aportadas por los trabajos de Klein *et al.* (1994), en los que virus mutantes para la CI no son capaces de replicarse. Estos trabajos también sugieren que la P3, la NIa y la VPg participan del proceso de replicación. Debido a que la CI también se encontró asociada a las inclusiones citoplasmáticas

cilíndricas y a que éstas se han detectado, mediante microscopía electrónica, libres en el citoplasma o asociadas a membranas celulares y a los plasmodesmos, se la relacionó con la función de movilización (Lawson y Hearon, 1971; Langenberg, 1986; Calder e Ingerfeld, 1990; Baunoch *et al.*, 1991). Sin embargo, al descubrirse la actividad de helicasa de la CI se asoció a las inclusiones cilíndricas a la replicación, lo cual fue apoyado por experimentos que demuestran que la P3 y la CP también están asociadas a estas inclusiones (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993; Ammar *et al.*, 1994b). Se ha demostrado que las VPgs de varios potyvirus son proteínas de aproximadamente 24 kDa (Shahabuddin *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1990) y corresponden a la porción aminoterminal de la NIa. Existe un sitio subóptimo de clivaje para la proteasa NIa que separa la VPg del resto de esta proteína (Dougherty y Parks, 1991). La porción carboxilo-terminal de NIa sería responsable de esta autoproteólisis (Dougherty *et al.*, 1989b; García *et al.*, 1990; Ghabrial *et al.*, 1990). La VPg del tobacco vein mottling virus (TVMV) está unida al ARNg por un residuo de tirosina, en un contexto de secuencias que está conservado en varios potyvirus (Murphy *et al.*, 1991). En poliovirus, la VPg también se halla unida al genoma por una tirosina (Ambros y Baltimore, 1978; Rothberg *et al.*, 1978) y se postula que esta proteína participa de la replicación como cebador y/o clivando la forma replicativa del virus (Takeda *et al.*, 1986; Tobin *et al.*, 1989). Restrepo-Hartwig y Carrington (1994) demostraron que la proteína 6K de TEV está asociada a membranas y participa en la replicación. Finalmente, se demostró también que la HC-Pro es necesaria para la amplificación del genoma viral, aunque no se puede descartar que esta proteína actúe en forma indirecta, siendo sólo requerida su actividad de proteasa en *cis* para que la replicación no se vea disminuida (Kasschau y Carrington, 1995; Cronin *et al.*, 1995).

Las proteínas NIa y NIB se agregan en cantidades equimolares en el núcleo donde forman las inclusiones inducidas por varios de los miembros del género *Potyvirus* (Knuhsen *et al.*, 1974; Dougherty y Hiebert, 1980; Dougherty y Carrington, 1988) y para lo cual se ha demostrado que poseen señales de transporte (Restrepo *et al.*, 1990; Baunoch *et al.*, 1991; Carrington *et al.*, 1991). Hasta el momento, no existe mejor explicación para la funcionalidad del transporte al núcleo de estas proteínas que la de constituir un medio para regular el exceso de las mismas en el citoplasma. Se han reportado algunas evidencias que indicarían que el complejo

replicativo se asocia a estructuras membranosas celulares. Gadh y Hari (1986) encontraron la cadena negativa de TEV asociada a la membrana de cloroplastos de plantas infectadas y Martín y García (1991) detectaron actividad de síntesis específica de ARN de PPV en una fracción cruda de membranas de plantas infectadas.

Movilización viral. La función de movilización de célula a célula de los potyvirus fue atribuida inicialmente a la P1, debido a que en el TVMV y en el turnip mosaic virus (TuMV) esta proteína tiene actividad de unión a ARN, y a que se encontró similitud de secuencias entre la P1 de TVMV y la proteína de 30 K, que es la proteína de movilización del tobacco mosaic virus (TMV, Domier *et al.*, 1987; Brantley y Hunt, 1993; Soumounou y Laliberté, 1994). Sin embargo, esta hipótesis perdió relevancia debido a las evidencias obtenidas recientemente en TEV, las que relacionan a esta proteína con el proceso de replicación viral. Experimentos recientes proveyeron fuertes evidencias de que la HC-Pro está involucrada en la movilización sistémica de TEV. Un mutante de TEV que presentaba una alteración en la región central de la HC-Pro y que era defectivo para la movilización sistémica fue complementado en *trans* en plantas transgénicas que expresaban esta proteína (Cronin *et al.*, 1995). La CP también participa en la movilización sistémica, siendo relevantes para esta función las regiones carboxilo y amino terminales. La región central de esta proteína está específicamente relacionada con la movilización de célula a célula, como así también con la encapsidación (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995). Ensayos en protoplastos, realizados por estos autores, demuestran que la CP es prescindible para la replicación.

Transmisión vectorial. Para transmitirse de una planta a otra, los miembros del género *Potyvirus* necesitan generalmente de vectores, que en el caso de este género, son áfidos. La proteína HC-Pro es necesaria para la transmisión de planta a planta y debe ser adquirida por el insecto junto con el virus (Thornbury *et al.*, 1985; Thornbury y Pirone, 1983; Hiebert *et al.*, 1984; Berger y Pirone, 1986; Berger *et al.*, 1989). Se cree que la forma activa de la HC-Pro es un dímero (Thornbury *et al.*, 1985; Hellmann *et al.*, 1983) que funciona como intermediario en un mecanismo de unión del virión a la cutícula de los maxilares y al intestino del insecto (Berger y Pirone, 1986;

Ammar *et al.*, 1994a). Como se mencionó más arriba, la región carboxilo terminal de la HC-Pro está involucrada en la función de proteólisis, por lo que se supone que la función de transmisibilidad por áfidos radicaría en la porción aminoterminal. Refuerzan esta hipótesis las observaciones de que las secuencias de las proteínas HC-Pro de cepas del PVY y del zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) que no son transmisibles por áfidos, difieren de las correspondientes a las cepas transmisibles por áfidos en la región aminoterminal (Thornbury *et al.*, 1990; Granier *et al.*, 1993). Estos resultados fueron confirmados por Atreya *et al.* (1992) utilizando transcriptos infectivos sintetizados *in vitro*. Los cambios observados corresponden a aminoácidos altamente conservados en las proteínas HC-Pro de potyvirus (Thornbury *et al.*, 1990). Se ha demostrado que la CP está involucrada también en la transmisión de planta a planta (Atreya *et al.*, 1990). Una secuencia aminoacídica específica (DAG), presente en la CP, es la responsable de la participación de esta proteína en dicha función. Una mutación de esta secuencia en un clon de ADNc correspondiente a la copia completa del genoma de TVMV, dio como resultado un transcripto infectivo no transmisible por áfidos (Atreya *et al.*, 1991). En forma inversa, en una cepa de ZYMV no transmisible por áfidos debido a una mutación que altera el motivo "DAG" de su CP, se restaura la transmisibilidad por áfidos si se regenera el motivo "DAG" (Gal-On *et al.*, 1992). La CP ha sido caracterizada por secuencia nucleotídica en muchos potyvirus y los abundantes datos de secuencia permitieron utilizar este gen como criterio taxonómico.

3.2 La secuencia nucleotídica de la CP como criterio taxonómico para la clasificación del género *Potyvirus*

La virología clásica emplea como criterios taxonómicos características tales como el rango de huésped, la protección cruzada, la morfología de las inclusiones celulares, el vector de transmisión entre plantas, la serología, etc. (Milne, 1988). Sin embargo, estos criterios dan lugar con frecuencia a ambigüedades e imprecisiones en la clasificación de determinados virus. La creciente cantidad de publicaciones que contienen datos de secuencias de genes virales, permitió que Shukla y Ward (Shukla y Ward, 1989; Ward y Shukla, 1991) propusieran nuevos criterios taxonómicos utilizando parámetros moleculares, tales como estructura

genómica, secuencia nucleotídica del genoma (Puurand *et al.*, 1994; Allison *et al.*, 1986; Domier *et al.*, 1986; Maiss *et al.*, 1989; Lain *et al.*, 1989a; Robaglia *et al.*, 1989; Gunasinghe *et al.*, 1994; Nicolas y Laliberté, 1992), hibridación de ácidos nucleicos y secuencias de las CPs. La utilidad de este último parámetro aumenta junto con el número creciente de secuencias de CPs de potyvirus (y sus diferentes cepas) que van siendo reportadas en la literatura (Bateson *et al.*, 1994; Pappu *et al.*, 1994; Teicheney y Dietzgen, 1994; Rabinowicz *et al.*, 1993; Hidaka *et al.*, 1992; Johansen *et al.*, 1991; Bravo-Almonacid y Mentaberry, 1989; Kobayashi *et al.*, datos no publicados; ver también referencias citadas en la Tabla 1 de Ward y Shukla, 1991). A partir de estos datos se propuso que, en general, hay grandes diferencias tanto en la secuencia como en la longitud de la región aminoterminal de la proteína y que la mayor homología de secuencia se encuentra en los dos tercios carboxiterminales de la misma (Shukla *et al.*, 1988). Shukla y Ward (1988) también demostraron que se pueden identificar distintas especies y cepas dentro del género *Potyvirus* usando la secuencia nucleotídica de los respectivos genes de las CPs. Analizando 17 cepas de 8 especies de *Potyvirus* diferentes, se encontró una distribución bimodal de los porcentajes de homología de secuencia. Así, entre distintas especies del género la homología de secuencia varió entre 38 y 71% (con un promedio de 54,7%), mientras que entre las cepas de una misma especie de *Potyvirus* la homología varió entre 90 y 99% (con un promedio de 95,4%).

3.3 El pimiento y el pepper severe mosaic virus (PepSMV)

El pimiento es una producción importante en los países sudamericanos. Es una planta solanácea originaria de la zona de Perú y Bolivia, de donde se expandió al resto de América del Sur y Central. Con la colonización de América, el pimiento fue llevado a Europa, Asia y Africa. La mayor parte de las especies cultivadas pertenecen a la especie *Capsicum annum* (Marotto, 1983). El fruto se comercializa fresco o industrializado para encurtido o condimentos. En Argentina (particularmente en las provincias de San Juan y Mendoza) esta producción es seriamente afectada por infecciones virales. Entre éstas, las más importantes son causadas por el PepSMV, el cucumber mosaic virus (CMV) y el PVY. Otros virus que afectan a esta planta en Argentina son el TMV, el tomato mosaic virus

(ToMV), el tomato spotted wilt virus (TSWV), el tobacco streak virus (TSV), el broad bean wilt virus (BBWV) y el alfalfa mosaic virus (AMV) (Gracia y Gutiérrez, 1982; Feldman y Gracia, 1977; Gracia *et al.*, 1968). En otros países se han detectado aproximadamente 30 virus que infectan pimiento (Nelson y Wheeler, 1978; ver referencias citadas en Tablas I y II de Feldman y Gracia, 1985). Una investigación llevada a cabo por el INTA en la Argentina entre 1971 y 1974, mostró que el PepSMV se encuentra en el campo en todas las principales áreas productoras de pimiento provocando cuantiosas pérdidas en la producción (Gracia y Feldman, 1977). Este virus fue aislado por primera vez en la provincia de San Juan en la década del 70 y fue estudiado por la Ing. Agr. Olga Gracia en el INTA-Luján de Cuyo mediante técnicas serológicas y de microscopía electrónica. Los resultados obtenidos permitieron clasificar al PepSMV dentro del género *Potyvirus* (Feldman y Gracia, 1977). La mayoría de los aislados de este virus son transmisibles por el áfido *myzus persicae*, aunque se han descrito aislados no transmisibles. Por ensayos de inmunodifusión se determinó que PepSMV está poco relacionado con PVY y TEV y no mostraba reacción cruzada con TuMV ni con pepper veinal mottle virus (PVMV).

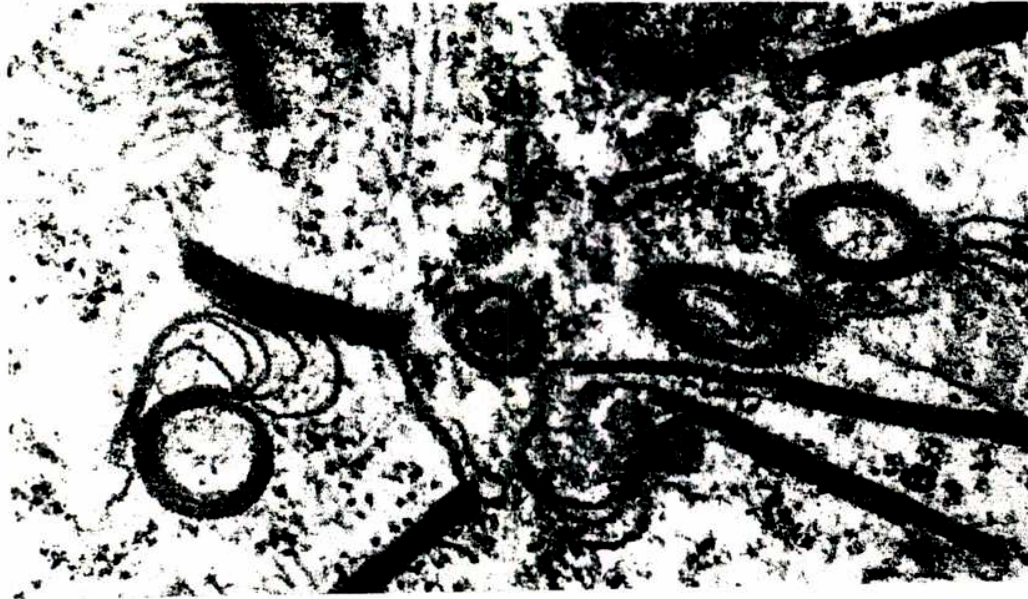
Los síntomas característicos de este virus en los cultivos de pimiento son mosaico severo, puntos y estrías necróticas, abscisión foliar prematura y drástica reducción en la producción de frutos. A nivel citológico el PepSMV produce las típicas inclusiones citoplásmicas cilíndricas, comunes en el género *Potyvirus* (Fig. 3.2).

3.4 Aplicaciones de la transformación de plantas

Las técnicas de introducción de genes foráneos en el genoma vegetal han evolucionado a un punto tal que, en principio, es posible introducir cualquier secuencia exógena en una gran variedad de plantas. A diferencia del mejoramiento clásico, estas técnicas permiten la transferencia de material genético entre organismos pertenecientes a distintas especies.

Entre las diferentes técnicas de transformación, la más comúnmente usada es la que emplea a *Agrobacterium tumefaciens* (Hooykaas y Schilperoort, 1992). Entre otras cosas, esto se debe a su simplicidad y bajo costo, ya que sólo se requieren condiciones para trabajar en microbiología

FIGURA 3.2: Micrografía electrónica de plantas de tabaco White Burley infectadas con PepSMV, mostrando las típicas inclusiones cilíndricas citoplasmáticas. Aumento: 54000x (reproducido de Feldman y Gracia, 1977).



y cultivo de tejidos vegetales. Recientemente se han reportado métodos alternativos de transformación de *Arabidopsis* utilizando esta bacteria, en los que el paso de regeneración se evita mediante la inoculación de tallos cortados y la recuperación de semillas transgénicas de tallos secundarios formados a partir de la planta inoculada (Chang *et al.*, 1994).

Agrobacterium rhizogenes no ha sido muy usada en la transformación de plantas debido al fenotipo "transformado" que produce (Durand-Tardif *et al.*, 1985). Sin embargo existen reportes recientes de su uso para transformar plantas ornamentales (Pellegrineschi *et al.*, 1994; Firoozabady *et al.*, 1994).

Si bien existen reportes del uso de *Agrobacterium* para transformar ciertas plantas monocotiledóneas (Hiei *et al.*, 1994; Gould *et al.*, 1991; May *et al.*, 1995), su uso con ese fin no está muy difundido. La técnica más usada para transformar monocotiledóneas es la aceleración de micropartículas recubiertas de ADN (Christou *et al.*, 1992). Básicamente, esta técnica utiliza una fuerza impulsora para acelerar micropartículas de oro o tungsteno e introducir las en las células vegetales pertenecientes a explantos o a cultivos *in vitro*. La fuerza impulsora puede generarse por una explosión de pólvora, gas comprimido o un arco voltaico. Distintos dispositivos permiten regular el diámetro de la zona del tejido impactada y la profundidad de penetración de las partículas (Christou *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1992; Sautter *et al.*, 1991). Otra técnica que también se utiliza para la transformación de especies recalcitrantes es la electroporación. La electroporación de protoplastos es relativamente común (Chupeau *et al.*, 1989) y recientemente se comenzó a ensayar la electroporación de tejidos organizados para obtener plantas transgénicas (Laursen *et al.*, 1994).

Recientemente, se ha reportado una técnica simple para la transformación de maíz utilizando fibras (*whiskers*) de carburo de silicio. La técnica consiste en agitar durante unos segundos una suspensión de células en cultivo junto con las fibras de carburo de silicio y el ADN. Luego de la regeneración se obtienen plantas transgénicas fértiles (Frame *et al.*, 1994).

La aplicación de estas técnicas permite desarrollar estudios básicos sobre biología molecular vegetal y encarar el mejoramiento agronómico de variedades económicamente importantes. A título de ejemplo, la Tabla 3.I resume algunos empleos recientes de estas técnicas en proyectos aplicados.

TABLA 3.I

GEN UTILIZADO EN LA TRANSFORMACION	OBJETIVO	RESULTADO	CITA
Genes bacterianos de enzimas de la síntesis de lisina, no inhibibles por producto.	Modificar el metabolismo para aumentar el valor nutricional del cultivo.	Semillas de soja y <i>Brassica napus</i> con elevado contenido de lisina.	Falco <i>et al.</i> , 1995.
Genes de enzimas bacterianas para la síntesis de polihidroxitirato.	Producir en plantas termoplásticos biodegradables de uso industrial.	Plantas de <i>Arabidopsis</i> que producen altas cantidades de polihidroxitirato.	Nawrath <i>et al.</i> , 1994
Genes de enzimas de la síntesis de aceites vegetales para ser expresado como antisentido.	Inhibir determinados pasos metabólicos de manera tal de producir la acumulación de metabolitos inintermedarios de una determinada vía metabólica.	Plantas de <i>Brassica</i> que acumulan altos niveles de aceites saturados.	Knutzon <i>et al.</i> , 1992
Gen de la polifenol oxidasa para ser expresado como antisentido.	Aumentar la durabilidad de la papa durante el almacenamiento.	Inhibición del ennegrecimiento de las papas durante el almacenamiento.	Bachem <i>et al.</i> , 1994
Genes de enzimas de la síntesis de hormonas vegetales.	Mejorar el contenido nutricional del tomate.	Plantas de tomate con niveles incrementados de citoquininas y consecuentemente, elevados niveles de azúcar y ácidos orgánicos en el fruto.	Martineau <i>et al.</i> , 1995
Gen quimérico de la lisozima del fago T4 fusionado a la señal de secreción al espacio intercelular.	Obtener plantas de papa resistentes a la infección por bacterias.	Plantas de papa cuyos tubérculos muestran una gran reducción de la necrosis ante la infección por <i>Erwinia carotovora</i> .	During <i>et al.</i> , 1993
Genes de toxinas de las esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	Plantas resistentes a lepidópteros.	Plantas de tabaco y tomate resistentes a <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Heliothis virescens</i> y <i>Manduca sexta</i> .	van der Salm <i>et al.</i> , 1994
Gen del inhibidor de la α -amilasa del poroto común.	Plantas resistentes a coleópteros.	Diferentes variedades de poroto resistentes a coleópteros.	Shade <i>et al.</i> , 1994
Gen bacteriano de la fenmedifam carbamato hidrolasa.	Liberar de las malezas sin afectar a los cultivos.	Plantas resistentes a altas concentraciones de carbamatos.	Streber <i>et al.</i> , 1994
Gen de la metalotioneína de ratón.	Obtener plantas capaces de detoxificar el suelo contaminado con metales pesados.	Plantas de tabaco resistentes a altas concentraciones de cadmio.	Pan <i>et al.</i> , 1994
Genes de la síntesis del manitol.	Expresar el osmolito en la planta para evitar la deshidratación.	Plantas resistentes a la salinidad del suelo.	Tarkzynski <i>et al.</i> , 1993
Gen de una ribonucleasa dirigido por un promotor específico de tapetum (tejido que rodea al saco polínico, necesario para la maduración del polen).	Obtener plantas útiles para la producción de híbridos.	Plantas de tabaco y colza que presentan esterilidad masculina, incapaces de llevar a cabo autofecundación.	Mariani <i>et al.</i> , 1990
Gen quimérico de la β -glucuronidasa fusionado al gen de la oleosina de <i>Arabidopsis</i> .	Producir un sistema de expresión de proteínas exógenas en plantas y obtener un sistema de inmovilización de enzimas.	Plantas de <i>Brassica napus</i> que acumulan β -glucuronidasa fácilmente purificable, en la superficie de los cuerpos grasos de almacenamiento de lípidos. Los cuerpos grasos mantienen la actividad de GUS, funcionando como sistema de inmovilización enzimática.	van Rooijen y Moloney, 1995

Dos objetivos particularmente importantes de la manipulación genética de plantas son el reemplazo génico (Morton y Hooykaas, 1995) y la transformación libre de genes marcadores de selección (Yoder y Goldsbrough, 1994). El reemplazo génico no se ha ensayado muy a menudo en plantas debido a que la frecuencia con la que se produce mediante las técnicas actuales es muy baja (10^{-6}). El aumento de estas frecuencias permitirá avanzar en el mejoramiento vegetal mediante la eliminación de caracteres indeseables de los cultivos o la modificación dirigida de genes endógenos. En el terreno de la experimentación básica será una herramienta sumamente útil para identificar, mediante genética reversa, funciones de genes aislados cuya actividad se desconoce. La eliminación de los genes marcadores o de otras secuencias distintas de las estrictamente relacionadas con la función que se desea conferir a las plantas transgénicas, cobró interés al intentarse introducir en el mercado las primeras plantas genéticamente modificadas. La tendencia a minimizar el riesgo biológico lleva a la necesidad de eliminar genes que son necesarios durante el proceso de transformación pero prescindibles en el campo.

3.5 Resistencia antiviral

Resistencia mediada por la CP. El fenómeno de la protección cruzada fue reportado por primera vez por McKinney en 1929 (como revisiones ver Ponz y Bruening, 1986 y Fulton, 1986). Este fenómeno fue originalmente descrito en plantas de tabaco, en las que la superinfección con una cepa atenuada de TMV impedía la infección de las mismas con una cepa más severa de este virus. La práctica de la protección cruzada aún se utiliza para reducir pérdidas debidas a infecciones virales (Wang *et al.*, 1987), aunque los resultados no son siempre satisfactorios (Tennant *et al.*, 1994). La protección cruzada fue señalada por Sanford y Johnston (1985) como un ejemplo natural de lo que ellos llamaron hipótesis de la "resistencia derivada del parásito" (posteriormente referida como resistencia derivada del patógeno), que propone que la expresión de ciertos genes de un patógeno en un huésped perturbaría el balance normal de los componentes del mismo interfiriendo así con su ciclo replicativo. En el caso de un virus, un resultado esperable consiste en la prevención de la replicación y/o la movilización del mismo, pero a veces sólo se observa una modulación

(atenuación o retardo) de los síntomas de la infección. Inicialmente se propuso que la CP viral era la responsable de la resistencia observada. También se propuso que el ARNg viral funcionaba como antisentido inhibiendo algún paso en la replicación del virus desafiante. Con el advenimiento de las técnicas de transformación de plantas mediante el uso de *A. tumefaciens* (Horsh *et al.*, 1985) fue posible probar la teoría de la resistencia derivada del patógeno. La primera publicación sobre la obtención de esta clase de resistencia provino de una colaboración entre la compañía Monsanto y la Universidad de Washington, donde se obtuvo resistencia contra el TMV mediante la expresión de la CP de este virus en plantas de tabaco. En tales plantas se puede observar una ausencia o retardo en la aparición de los síntomas con respecto a plantas control no transgénicas (Powel-Abel *et al.*, 1986). Posteriormente, se reportaron muchos casos de resistencia derivada del patógeno para una amplia variedad de sistemas virus-planta huésped. Algunos de estos casos involucran plantas transgénicas de tabaco, alfalfa, papa y tomate que expresan las proteínas de cubierta del AMV (Loesh-Fries *et al.*, 1987), el potato virus X (PVX, Hemenwey *et al.*, 1988), el CMV (Cuozzo *et al.*, 1988), el PVY (Lawson *et al.*, 1990) potato leafroll virus (PLRV, Kawchuk *et al.*, 1990), potato virus S (PVS, MacKenzie y Tremaine, 1990), entre otros (ver Tabla 1 en Fitchen y Beachy, 1993). El éxito de esta estrategia para obtener resistencia dio lugar a la denominación de este fenómeno como "resistencia mediada por la CP". Dado que los virus involucrados en los ejemplos anteriores pertenecen a distintas familias, se considera que la protección mediada por cápside es una estrategia generalizable a otros virus y huéspedes. Ello significaría disponer de una herramienta poderosa en el mejoramiento vegetal.

Estudios en los que se utilizó al TMV permitieron demostrar que la acumulación de la CP era la responsable del fenómeno de resistencia y no el ARN que la codificaba (Powel *et al.*, 1990). Estos autores demostraron también que la presencia de la región 3' no codificante reduce el nivel de traducción del ARNm producido por el transgen. En el género monotípico del AMV (Loesch-Fries *et al.*, 1987) se observó, al igual que con TMV (Nelson *et al.*, 1987), que existía correlación entre el nivel de acumulación de CP y el grado de resistencia observado, y que esta resistencia era superada si se infectaba con ARNg de AMV. Sin embargo, la infección sistémica se ve demorada en plantas transgénicas para la CP del TMV infectadas tanto con

virión como con ARNg viral. También se pudo correlacionar el nivel de resistencia antiviral con el número de copias del transgen incorporadas por la planta y con la fuerza del promotor utilizado para dirigir la transcripción del mismo. Van Dun *et al.* (1988a) confirmaron lo observado en el TMV, demostrando que un ARNm no traducible correspondiente a la CP de AMV no es capaz de proteger a plantas de tabaco contra la infección por este virus. Utilizando otro enfoque para el estudio de la resistencia contra AMV, Tumer *et al.* (1991) obtuvieron resultados que apoyan esta hipótesis al demostrar que el segundo aminoácido de la CP es indispensable para la obtención de protección en plantas transgénicas. Otro factor que influye en el grado de resistencia, observado en experimentos realizados en invernadero, es el de la concentración de virión en el inóculo utilizado. Powel-Abel *et al.* (1986) observaron que, a una concentración de 0,4 µg/ml de TMV, había un retardo de 10 días en la aparición de síntomas en las plantas transgénicas con respecto a plantas control, pero que con una concentración de 2 µg/ml, ese retardo se reducía a 2 días. Sin embargo se han reportado casos de inmunidad contra la infección viral con inóculos aún más concentrados utilizando sistemas de protección mediada por la CP, como son los casos del PVX (Hemenway *et al.*, 1988), del soybean mosaic virus (SMV, Stark y Beachy, 1989), etc. Experimentos realizados por Register y Beachy (1988) utilizando protoplastos de plantas que expresan la CP del TMV, mostraron que el número de protoplastos infectados provenientes de plantas transgénicas es mucho menor que el de los provenientes de plantas normales. Sin embargo, el nivel de virus alcanzado en los protoplastos que resultaban infectados era similar al de los controles. Por otro lado, si se realiza el mismo experimento infectando con el ARNg en vez de viriones, no se observan diferencias entre los protoplastos que expresan el transgen y los que no lo expresan. En ensayos de resistencia en plantas transgénicas para la CP de TMV se utilizaron tanto otros tobamovirus como virus de otros géneros. La resistencia obtenida contra tobamovirus muy relacionados a TMV fue comparable a la obtenida contra dicho virus. Sin embargo, en los ensayos en los que se usaron tobamovirus menos relacionados, la resistencia obtenida fue más variable. Los niveles de resistencia obtenidos con virus de otros grupos fueron muy bajos o inexistentes (Anderson *et al.*, 1989; Nejidat y Beachy, 1990). El o los mecanismos responsables de la resistencia mediada por la CP de TMV difieren, al menos en parte, de aquellos que actúan en PVX, dado que en

este caso, plantas que resisten la infección con viriones también lo hacen al inocularlas con el ARNg (Hemenway *et al.*, 1988).

Los mecanismos por los que opera la resistencia en los diferentes casos ejemplificados son posiblemente distintos y, probablemente, más de un mecanismo podría estar involucrado en cada caso. Además, es posible que el transgen no sea el único responsable de la resistencia, pudiendo estar involucrado un factor del huésped. En el caso del TMV, se postula que la expresión de la CP impediría un evento temprano en la infección, debido a que el número de focos infecciosos es menor en las plantas transgénicas que en las control (Nelson *et al.*, 1987). Este mecanismo temprano podría ser la descapsidación del virus, ya que la resistencia es superada al infectar con ARNg viral. Se obtuvieron evidencias indirectas en favor de esta hipótesis, con experimentos *in vitro* en los que el ARNm de una enzima se recubrió artificialmente con CP del TMV y se introdujo en protoplastos. El nivel de actividad de la enzima fue 100 veces menor en protoplastos transgénicos para la CP que en protoplastos no transgénicos (Osbourn *et al.*, 1989). El mecanismo responsable del retardo en la aparición de síntomas sistémicos en plantas infectadas con TMV podría deberse a alguna interferencia en el proceso de replicación o de movilización viral. En los casos del PVX y del CMV, el mecanismo involucrado en la resistencia mediada por la expresión de la CP (Hemenway *et al.*, 1988; Cuzzo *et al.*, 1988) parece involucrar la presencia de la misma.

En el caso de los potyvirus, a diferencia de los casos mencionados anteriormente, no se pudo determinar una correlación entre el nivel de expresión de la CP y el nivel de resistencia. En algunos casos se obtuvo resistencia contra el PVY con una acumulación de la CP equivalente al 0,01-0,05% de la proteína total, y en otros con niveles no detectables de proteína (Kaniewsky *et al.*, 1990; Lawson *et al.*, 1990). En ciertos casos, esta estrategia ha demostrado ser también efectiva en la protección contra otros virus relacionados. Stark y Beachy (1989) obtuvieron altos niveles de resistencia contra el PVY y el TEV en plantas de tabaco transformadas con el gen de la CP de SMV. Persiguiendo el objetivo de conferir a una misma planta resistencia a diferentes virus, Lawson *et al.* (1990) transformaron plantas de papa con las CPs del PVX y del PVY y obtuvieron resistencia contra ambos virus. Namba *et al.* (1992) realizaron un estudio sistemático para evaluar la eficacia de la resistencia contra virus de diferentes grados de relación utilizando plantas transgénicas para las CPs de dos potyvirus

distintos que infectan cucurbitáceas (watermelon mosaic virus 2 [WMV-2] y ZYMV). La resistencia específica resultó ser mejor que la heteróloga (probada para WMV-2). Sin embargo, se obtuvieron niveles de resistencia contra el TEV casi tan elevados como contra el WMV-2, y diferentes grados de resistencia contra otros miembros del género *Potyvirus*.

Lindbo y Dougherty (1992a; 1992b) demostraron que es posible obtener altos niveles de resistencia antiviral expresando en plantas de tabaco un transcripto de ARN derivado del gen de la proteína de la cápside del TEV al que se le introdujeron mutaciones para que presentara codones de terminación de la traducción en los tres marcos de lectura posibles. Este gen quimérico resultó conferir mejores niveles de resistencia en plantas transgénicas que el gen que expresa la CP del TEV. Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que el ARNm, y no la proteína, es el responsable del fenómeno de resistencia observado. A diferencia de las plantas transgénicas que expresan la CP del TMV, en este caso la resistencia obtenida resultó ser muy específica. Al estudiarse estos transgenes en protoplastos, se demostró que el transcripto no traducible actúa inhibiendo la replicación. La expresión en protoplastos de otros transgenes que expresan la CP del TEV o una versión mutada de la misma carente de la porción carboxilo terminal, no afectó la replicación del virus. Sin embargo, algunas plantas transgénicas que expresaban la CP del TEV, que inicialmente eran sensibles a la infección, adquirieron un estado de inmunidad luego de varias semanas de crecimiento (Lindbo *et al.*, 1993b). En contraposición a estos resultados, plantas transgénicas que expresaban versiones truncadas de la CP del ZYMV no fueron tan resistentes a la infección como las utilizadas en experimentos comparables realizados con la CP del TEV (Fang y Grumet, 1993). También se realizaron experimentos similares para el PVY, en los que al gen de la CP se le introdujo una mutación tal que eliminara el codón de iniciación. Las plantas que contenían este gen mutante producían el transcripto correspondiente pero no la CP, y resultaron ser resistentes en un ensayo de infección con el PVY (van der Vlugt *et al.*, 1992). Smith *et al.* (1994) profundizaron los estudios de protección mediada por ARN en el PVY y observaron una correlación inversa entre el nivel de ARN mensajero correspondiente a un transgen no traducible de la CP y el grado de resistencia a dicho virus. También en luteovirus la resistencia antiviral obtenida parece ser mediada por el ARNm

y no por la proteína, como lo sugieren los experimentos realizados con PLRV (Kawchuk *et al.*, 1991).

La expresión de ARNs complementarios, o antisentido, para la CP ha sido usada con el objeto de obtener resistencia, pero los resultados fueron menos satisfactorios que con el uso de la secuencia codificante (Fang y Grumet, 1993; Lindbo y Dougherty, 1992a; Hemenway *et al.*, 1988; Rezaian *et al.*, 1988).

La mayoría de los reportes de resistencia mediada por la CP o su ARN se refieren a virus a ARN de polaridad positiva. Sin embargo, también se ha obtenido resistencia contra virus a ARN de polaridad negativa, como por ejemplo el TSWV, un virus envuelto, perteneciente al género *Tospovirus*, cuyo genoma consiste en tres moléculas de ARN, una de polaridad negativa y dos ambisentido. Utilizando plantas transgénicas que expresaban la proteína de la nucleocápside, Pang *et al.* (1992) obtuvieron resistencia específica contra el TSWV y contra virus menos relacionados. Al igual que lo que ocurre con virus a ARN de polaridad positiva, usando plantas que expresaban una versión no traducible del ARN de la misma proteína, este grupo de investigadores obtuvo resistencia específica sólo contra TSWV (Pang *et al.*, 1993). En función de estos resultados, los autores propusieron que la presencia del ARNm conferiría resistencia contra virus muy relacionados y la expresión de la CP podría actuar contra virus menos relacionados.

En los últimos años se han comenzado a realizar estudios a campo para probar la resistencia antiviral en la situación en la que se encontrarán las plantas cuando sean liberadas para su explotación comercial (Malnoë *et al.*, 1994; Gonsalves *et al.*, 1992; Jongedijk *et al.*, 1992; Kaniewsky *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1992). Los resultados fueron satisfactorios, con lo que la aplicabilidad de esta estrategia se torna más plausible, si se considera que en muchos casos se obtiene resistencia de amplio espectro con un único transgen.

Resistencia mediada por genes no estructurales. Se obtuvo también resistencia utilizando genes virales no estructurales. Plantas que contenían el gen de la proteína de 54 kDa del TMV (que se cree involucrada en la replicación) expresaron altos niveles de resistencia a inóculos de viriones o de ARN viral, siendo la misma muy específica para este virus (Carr y Zaitlin,

1991; Golemboski *et al.*, 1990). Más tarde, se demostró que la proteína era necesaria para conferir resistencia específica para el virus (Carr *et al.*, 1992). El cistrón equivalente en el pea early browning virus (PEBV) también confiere resistencia específica, pero ésta no se observa si se expresan versiones truncadas de la misma (MacFarlane y Davies, 1992). Si bien estos resultados refuerzan aquellos obtenidos con el TMV, en trabajos realizados con plantas que expresan los genes de las replicasas del brome mosaic virus (BMV) y del AMV, no se observó resistencia a la infección, aún cuando son capaces de complementar en *trans* la función de replicación (van Dun *et al.*, 1988b; Taschner *et al.*, 1991; van der Kuyl *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1992). Fue necesario mutar la replicasa del AMV para obtener resistencia (Brederode *et al.*, 1995). La transformación de plantas con el gen salvaje de la replicasa de 183 kDa del TMV no confirmó resistencia, mientras que una versión mutada de este gen produjo un amplio espectro de resistencia antiviral (Donson *et al.*, 1993). Braun y Hemenway (1992) obtuvieron un moderado grado de resistencia introduciendo el gen de la replicasa del PVX en plantas de tabaco y no hallaron protección al expresar fragmentos carboxilo terminales de la misma. Posteriormente, se demostró que plantas transgénicas que expresaban variantes del gen de la replicasa del PVX mutada en el motivo "GDD" eran extremadamente resistentes a la infección con este virus (Longstaff *et al.*, 1993). El análisis exhaustivo de estas plantas permitió demostrar que la resistencia se debía al RNA y no a la proteína (Mueller *et al.*, 1995). Recientemente, se obtuvieron altos niveles de resistencia en plantas transgénicas que expresan la replicasa del PVY, pero no una versión mutada de la misma (Audy *et al.*, 1994), a diferencia de los casos en que se emplearon versiones mutadas de las replicasas del cymbidium ringspot virus (CymRSV, Rubino *et al.*, 1993) y del CMV (Carr *et al.*, 1994; Zaitlin *et al.*, 1994).

Berger *et al.* (1989) transformaron plantas con la porción aminoterminal de la poliproteína del TVMV, que incluía los tres primeros genes (P1, HC-Pro y P3). Dado que en esos tres cistrones están presentes las actividades proteolíticas necesarias para producir las proteínas maduras, las plantas transgénicas expresaron una HC-Pro funcional. En ensayos de resistencia al TVMV, estas plantas no mostraron ninguna diferencia con los controles de plantas no transgénicas (Lindbo *et al.* 1993a).

La proteasa N1a del TVMV y una fusión de ésta con una proteína bacteriana también fueron usadas para transformar plantas de tabaco, las

cuales desarrollaron altos niveles de resistencia específica contra el TVMV (Hunt, resultados no publicados). También la NIa del PVY en conjunto con parte o toda la NIb y la CP confirió resistencia (Vardi *et al.*, 1993). Silva-Rosales y Dougherty (resultados no publicados) encontraron que la transformación de plantas con el gen de la NIa del TEV confirió resistencia específica, mediada por el ARN y no por la proteína. En contraste, experimentos preliminares con una planta transgénica para la proteína CI de TVMV no mostraron resistencia antiviral (Hunt, resultados no publicados). Carrington (resultados no publicados) tampoco obtuvo resistencia contra el TEV en plantas transgénicas que expresaban las proteínas NIa, NIb o HC-Pro del mismo virus.

Otras estrategias de resistencia. Se han probado otras estrategias para obtener resistencia a las infecciones virales en plantas. Por ejemplo, la expresión de copias de satélites avirulentos del CMV en plantas transgénicas confirió resistencia al virus (Yie *et al.*, 1992). La expresión en plantas de anticuerpos monoclonales contra epitopes presentes en los viriones del TMV (Voss *et al.*, 1995) disminuyó la infectividad del virus. Asimismo, una proteína de fusión compuesta de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas por un péptido (scFv), que reconoce al artichoke mottled crinkle virus (AMCV) protegió a plantas transgénicas contra la infección por el mismo (Tavladoraki *et al.*, 1993).

Los ARNs catalíticos o ribozimas, fueron descubiertos por el grupo de Cech en 1982 (Kruger *et al.*, 1982) y aportaron importantes datos para la discusión sobre el origen de la vida. Mediante el uso de la ingeniería genética, se pueden modificar secuencias de ADN que codifican para ARNs catalíticos, agregándoles secuencias complementarias a transcritos cuya traducción se desea evitar. La expresión de ribozimas así modificadas en plantas permite degradar específicamente un determinado transcripto o ARN. Usando esta clase de genes quiméricos se logró abolir la expresión de un gen reportero en protoplastos (Steinecke *et al.*, 1992). Estos resultados abren una posibilidad para la búsqueda de resistencia mediante el uso de ribozimas específicas contra virus. El aislamiento de promotores subgenómicos (Marsh *et al.*, 1988) permite producir sistemas de expresión específicamente dirigidos por proteínas virales. La manipulación de estas secuencias permitiría transformar plantas con genes de toxinas cuya expresión estuviera dirigida por dicho promotor subgenómico, con lo que

ésta se produciría sólo en las células infectadas, causando su muerte y evitando así la reproducción del virus.

Los mecanismos naturales de resistencia que se conocen en las plantas actúan indistintamente contra patógenos no relacionados e implican generalmente procesos de transducción de señales. A menudo, la defensa de las plantas contra diferentes patógenos corresponde a una respuesta de hipersensibilidad (HR). Aunque las causas de la resistencia no se conocen, se han descrito algunas características de la HR que son comunes a la infección por distintos patógenos, por ejemplo la muerte celular en el lugar de la infección, el reforzamiento de la pared celular por entrecruzamiento de los polímeros que la componen, el aumento de reacciones oxidativas, la producción de antibióticos llamados fitoalexinas y la inducción de la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) como quitinasas y glucanasas (Lamb *et al.*, 1989; Lamb, 1994). Generalmente la HR dispara un importante mecanismo de respuesta inespecífica llamado "resistencia sistémica adquirida" (SAR), la que resulta en la disminución de la severidad de la enfermedad en toda la planta, en la cual está involucrada la producción de ácido salicílico (Enyedi *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995). La hipótesis del "gen-por-gen" postula que la resistencia de una planta a un determinado patógeno depende de la presencia en éste último de un gen de avirulencia, para el cual la planta poseería un gen de resistencia que funcionaría como receptor del producto del gen de avirulencia (Keen, 1990). Varios genes naturales de resistencia contra distintos patógenos ya fueron clonados (Johal y Briggs, 1992; Dangl, 1995). Whitham *et al.* (1994) clonaron el gen que confiere resistencia al TMV por HR en tabaco, y su introducción en variedades de tabaco sensibles a este virus le confirió el mismo tipo de resistencia. El clonado de nuevos genes naturales de resistencia antiviral es una alternativa promisoriosa en la búsqueda de resistencia a las enfermedades virales.

4. OBJETIVOS

a) Como primer objetivo nos propusimos realizar el clonado y secuenciación de la CP del PepSMV para aportar al conocimiento de este patógeno local y asimismo para disponer de datos que nos permitieran determinar unívocamente la pertenencia de este virus al género *Potyvirus*.

b) Dado que el PepSMV, junto con otros virus, constituye un serio problema para los productores de pimiento fundamentalmente del noroeste argentino, se planteó el objetivo de obtener resistencia antiviral mediante estrategias que utilizan el gen de la CP. Una de ellas consiste en expresar la proteína y la otra, en expresar un ARN que presenta un corrimiento en el marco de lectura, tal que no es capaz de producir la proteína. Como el pimiento presenta serios problemas para la aplicación de técnicas de regeneración de tejidos (y ésta es una técnica indispensable para la obtención de una planta transgénica) se eligió el tabaco como modelo experimental para probar los genes quiméricos producidos mientras se proseguía en paralelo con los ensayos para lograr la regeneración y transformación de plantas de pimiento.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Escherichia coli: Se utilizaron las cepas JM101, NM522 y DH5 α . Todos los cultivos fueron hechos en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l). En el caso de medios sólidos se agregó agar hasta una concentración final de 1,5%. Algunos de los suplementos utilizados fueron los siguientes: ampicilina (100 μ g/ml), kanamicina (100 μ g/ml), IPTG (0,5%) y X-Gal (100 μ M). Se partió siempre de una colonia crecida en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, MgSO₄ 2 mM, glucosa 0,2%, CaCl₂ 0,1 mM), suplementado con tiamina 0,5 μ g/ml. Todos los crecimientos bacterianos fueron llevados a cabo en Erlenmeyers conteniendo un volumen de medio de cultivo equivalente a aproximadamente el 25% de su capacidad total. La temperatura de crecimiento fue de 37°C y la agitación de alrededor de 200 rpm.

Agrobacterium tumefaciens: Se utilizó la cepa C-58 portando el plásmido pMP90 que confiere resistencia a los antibióticos rifampicina y gentamicina (Koncz y Schell, 1986). La temperatura de crecimiento fue de 28°C en medio LB.

5.2 AISLADOS VIRALES

Se utilizaron los siguientes aislados virales:

La cepa ordinaria del potato virus Y (PVY^o), aislada y caracterizada en el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú). La cepa fue propagada en la EEA-INTA-Luján de Cuyo, Mendoza. El virus se inoculó mecánicamente en hojas de plantas jóvenes de *Nicotiana occidentalis*. Al cabo de 4-5 semanas, de acuerdo con los síntomas observados, se cosecharon las hojas infectadas.

La cepa necrótica del potato virus Y (PVYⁿ), gentilmente cedida por el Dr. Christophe Robaglia del INRA-Versailles, Francia.

El aislado S-163 del PepSMV, que no presenta transmisibilidad por áfidos. Se lo propagó en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. White Burley en el INTA-Luján de Cuyo.

5.3 VARIEDADES VEGETALES

Para los experimentos de transformación se utilizó *N. tabacum* cv. Xanthi D8 producida en el INRA-Versailles. Las variedades utilizadas para propagar aislados virales se indican en cada caso.

5.4 PLASMIDOS

El plásmido **pBS8** (Fig. 6.12) es un vector *pBlueScript* (Stratagene, USA) que contiene un fragmento comprendiendo el gen de la CP, la región 3' no codificante y el extremo 3' del gen de la Nib de PVY^o. Este plásmido fue utilizado como sonda.

El plásmido **p8+80** (Fig. 6.12) es un vector *pBlueScript* que contiene 2 fragmentos de ADNc de PVY. Uno de estos fragmentos comprende 80 nucleótidos de la región 5' no codificante del genoma y los primeros 5 codones de la proteína P1 de este virus. Este fragmento incluye al codón de iniciación de la poliproteína codificada por el genoma de PVY. El segundo fragmento corresponde al ADNc presente en el pBS8. Ambos fragmentos están ligados de forma tal que se mantiene el marco de lectura abierto en el codón de iniciación de la proteína P1.

El plásmido **pBI121** posee un origen de replicación para *E. coli* y otro para *A. tumefaciens* y un gen de resistencia a la kanamicina. El ADN-T consta del gen de la β -glucuronidasa (*uid A*, gen reportero) bajo el control del promotor del transcripto 35 S del cauliflower mosaic virus (CaMV), el gen de la neomicina fosfotransferasa como marcador de selección para plantas y los bordes derecho e izquierdo del ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens* flanqueando a los genes marcador y reportero.

El plásmido pBIPVY se construyó eliminando el gen *uid A* del pBl121 y tratándolo sucesivamente con las enzimas *Xba* I, ADN polimerasa T4 y *Sst* I, de manera de dejar un extremo cohesivo (correspondiente al sitio *Sst* I) y otro romo. Posteriormente, se insertó en estos sitios el *cassette* conteniendo las secuencias de PVY provenientes de p8+80, las que se liberaron con enzimas de restricción tales que dejaran extremos compatibles para la ligación.

Los plásmidos pBS8, p8+80 y pBIPVY fueron construidos en nuestro laboratorio por el Dr. Fernando Bravo-Almonacid (1992).

5.5 PURIFICACION DE VIRUS

El procedimiento de purificación utilizado fue el desarrollado por Murphy *et al.* (1990) modificado por el Dr. Bravo-Almonacid (1992). Se partió de 200 g de hojas de tabaco infectadas que se homogeneizaron en *Omnimixer* (Dupont-Sorvall, USA) en *buffer* KH_2PO_4 0,5 M, pH 7.5, urea 1 M, DIECA 0,01 M, ácido tioglicólico 0,5%. Se agregó 1 ml de cloroformo por g de tejido y se emulsionó en *Omnimixer*. Se centrifugó a 4000 xg por 15 min en rotor GS3 (Dupont-Sorvall, USA), y la fase acuosa se filtró por varias capas de gasa. Se agregó PEG 6000 hasta una concentración final de 4% y NaCl hasta una concentración final de 0,25 M. Se agitó en agitador magnético por 2 h a 4°C y se centrifugó en rotor GS3 a 4000 xg por 15 min. Se agregaron al *pellet* 125 ml de, KH_2PO_4 0,1 M, pH 7, urea 1 M, y Triton X-100 hasta una concentración final de 1% (p/p). Se dejó en un agitador magnético toda la noche a 4°C. Se clarificó por centrifugación a 4000 xg en rotor GSA (Dupont-Sorvall, USA). El sobrenadante se sembró sobre un colchón de 2,5 ml de sacarosa 20%, preparado en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM en un tubo para rotor SW 28 (Beckman, USA) y se centrifugó en ultracentrífuga a 27000 rpm durante 2 h. Se resuspendió el *pellet* en 2,5 ml de Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, con la ayuda de un homogenizador de vidrio (tipo *potter*).

5.6 MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las microscopías electrónicas fueron realizadas en el CEVAN-CONICET gracias a la gentileza del Dr. José La Torre. Las muestras se prepararon en *buffer* borato 0,05 M, se clarificaron por centrifugación y se montaron en grillas de cobre pretratadas. Luego se lavaron con el mismo *buffer* y se tiñieron con acetato de uranilo 2%.

5.7 PURIFICACION DEL ARNg VIRAL

A 2,5 ml de suspensión viral se adicionaron NaCl hasta 0,25 M final, SDS hasta 1% final y 50 µg de proteinasa K. Se incubó a 42°C por 40 min. Se agregó luego un volumen de fenol equilibrado en Tris.HCl, pH 8. Se emulsionó a 65°C durante 5 min y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm. Se extrajo la fase acuosa con fenol-cloroformo (1:1 v/v) y luego con cloroformo. Se llevó la misma hasta una concentración 3 M de AcONa, pH 5,8 partiendo de una solución madre de 4.5 M y se dejó toda la noche a -20°C. Se centrifugó durante 30 min a 12000 rpm a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 800 µl de H₂O. Se agregó 1/10 de volumen de AcONa 3 M, pH 5,2, 2 volúmenes de etanol 100% y se dejó precipitar durante toda la noche a -70°C. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C y se resuspendió en 100 µl de H₂O estéril.

Todas las soluciones fueron autoclavadas a 1,2 atm durante 30 min y el material de vidrio fue horneado durante 2 h a 200°C para evitar la acción de ARNasas. En todo momento se utilizaron guantes.

5.8 PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly (1979). Para preparaciones en pequeña escala se partió de 5 ml de cultivo bacteriano crecido en LB/ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm y se resuspendieron en 100 µl de Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM y

glucosa 50 mM. La suspensión de bacterias se incubó 5 min en hielo y se agregaron 200 μ l de una solución de SDS 1%, NaOH 0,2 N preparada en el momento. Se mezcló por inversión y se dejó 10 min en hielo. Se agregaron luego 150 μ l de AcOK 3 M previamente enfriado, se mezcló por inversión y se dejó en hielo. Luego de 10 min de incubación, se centrifugó en microcentrifuga durante 5 min. Al sobrenadante obtenido (400 μ l) se lo extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). La fase acuosa obtenida fue precipitada con el agregado de 1/10 de volumen de AcONa 3 M, pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol. Luego de 10 min a -70°C se centrifugó en microcentrifuga durante 5 min y el ADN se resuspendió en 200 μ l de H₂O. Se agregaron luego 2 μ l de ARNasa A (10 mg/ml) libre de ADNasa y se incubó 30 min a 37°C. Se agregaron 1/10 de volumen de AcONa 3 M, pH 5,2 y 300 μ l de etanol y se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente. El ADN plasmídico se sedimentó por centrifugación durante 5 min y se resuspendió en 40 μ l de H₂O. El rendimiento fue de aproximadamente 1 μ g ADN por ml de cultivo. Para preparaciones a gran escala se utilizó el mismo protocolo, aumentando proporcionalmente los volúmenes utilizados.

5.9 PURIFICACION DE ADN GENOMICO DE TABACO

Se molieron 1 a 4 g de hojas en N₂ líquido, se colocaron en un tubo de 30 ml y se agregaron 15 ml de Tris.HCl 100 mM, pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, 1% SDS y β -mercaptoetanol 10 mM. Se incubó a 65°C por 10 min y se agregaron 5 ml de AcOK 5 M, pH 5,2. Se mezcló y se colocó en hielo por 20 min. Se centrifugó durante 10 min a 16000 rpm y el sobrenadante se filtró por gasa. Se agregaron 10 ml de isopropanol y se mantuvo 30 min a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm por 30 min y el *pellet* se resuspendió en 0,7 ml de Tris.HCl 50 mM, pH 8 y EDTA 20 mM. Se agregaron 20 μ l de ARNasa 10 mg/ml, se incubó a 37°C por 10 min y se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Se repitió la extracción fenólica y se extrajo con un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1). Se agregó 1/10 de volumen de AcONa 3 M y 1 volumen de isopropanol y se dejó a -20°C por 20 min. Se centrifugó en microcentrifuga, se lavó el *pellet* en etanol 80% y se resuspendió en agua.

5.10 PURIFICACION DE ARN TOTAL DE TABACO

Todo el material se esterilizó por autoclave, con excepción del *buffer* A. Se molió 1 g de hojas en N₂ líquido y se agregaron al mortero 3 ml de *buffer* A (isotiocianato de guanidinio 8 M, 20 mM MES, pH 7, 20 mM EDTA y 50 mM β-mercaptoetanol). Se transfirió a un tubo de 30 ml, se colocó a 65°C por 10 min aplicando *vortex* cada 2 min y se extrajo con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). Se centrifugó 10 min a 10000 rpm y se agregó a la fase acuosa 1/20 de volumen de AcOH y 0,7 volúmenes de etanol. Se mantuvo 30 min a -70°C y se centrifugó 30 min a 10000 rpm. El *pellet* se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 1 ml de AcOK 3 M. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm, se lavó el *pellet* con etanol 70% y se resuspendió en 200 µl de agua.

5.11 MARCACION DE SONDAS POR INICIACION AL AZAR DE LA POLIMERIZACION (FEINBERG Y VOGELSTEIN, 1983)

La muestra de ADN (25-100 ng en un volumen de 10 µl) se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 2 min, y se mantuvo en hielo por 2 min. Se agregaron 4 µl de *buffer* OLB 5X (PIPES 500 mM, pH 6,6, MgCl₂ 25 mM, DTT 50 mM, mezcla de hexanucleótidos de secuencia aleatoria 1,25 mg/ml, BSA 1 mg/ml), 2 µl de solución NUC 10X (dGTP, dATP, dTTP 0,2 mM c/u), 2 µl de [³²P]-dCTP y 2 µl del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa (1U/µl). Se incubó durante 4 h a 37°C, o durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 5 µl de EDTA 0,5 M para quelar el Mg²⁺ presente e inhibir la actividad enzimática. Para eliminar los nucleótidos no incorporados se agregó H₂O a la mezcla de reacción hasta un volumen final de 100 µl. Se agregaron 2 µg de ADN de esperma de salmón como *carrier*, medio volumen de AcONH₄ 7,5 M, pH 7, y 2 volúmenes de etanol 100%. Se incubó a -70°C durante 20 min, a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó 15 min a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de H₂O. Se precipitó nuevamente el ADN agregando 50 µl de AcONH₄ y 300 µl de etanol 100%.

Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 100 μ l de H₂O. Antes de hibridar, se calentó a 100°C por 10 min y se colocó en hielo por 2 min.

5.12 ELECTROFORESIS

Geles de agarosa nativos. Se utilizaron geles de agarosa de entre 0,7-1,5%. El *buffer* utilizado fue TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8). Los geles contenían 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron en general, a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. La composición del *buffer* de siembra 5X utilizado fue glicerol 50%, TBE 5X y BPB 1%. Los geles fueron fotografiados utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm, una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) y película Polaroid 667.

Geles de agarosa alcalinos. El gel se preparó fundiendo la suspensión acuosa de agarosa en un horno de microondas. Luego de enfriar a aproximadamente 50°C, se agregó *buffer* de corrida alcalino a partir de una solución madre 10X (NaOH 300 mM, EDTA 20 mM), para lograr una concentración final de 1X. El gel fue corrido en *buffer* alcalino de 1X, a 5 V/cm y a 4°C. Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* de carga alcalino (NaOH 30 mM, EDTA 2 mM, Ficoll 400 3% y verde de bromocresol 0,3 mg/ml) y calentadas a 100°C durante 2 min antes de sembrarlas en el gel. Luego de la corrida, el gel se colocó en ácido tricloroacético por 30 min y se secó por presión sobre varios filtros de papel *Whatmann* 3 MM. El gel se cubrió con una película de *nylon* (*Rolo-pac*) y se realizó una autorradiografía.

Geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida 42% y bisacrilamida 2%. Se disolvieron 21 g urea en 50 ml de solución de acrilamida en *buffer* TBE. La polimerización se catalizó por agregado de 500 μ l de persulfato de amonio 10% y 50 μ l de TEMED. Se usaron geles verticales de 40 x 35 cm y la corrida se realizó a 60 W de potencia constante. Los geles se fijaron durante 15-20 min en metanol 10%, AcOH 10% y luego se secaron bajo línea de vacío a 80°C, durante 1,5-2

h. Como *buffer* de siembra se usó: formamida 80%, TBE 1X, BPB 0,2%, xilen cianol 0,2%. Las muestras fueron calentadas a 80°C durante 2 min antes de ser sembradas.

Geles de agarosa con formaldehído. Se fundió la agarosa en un volumen adecuado de H₂O deionizada, se dejó enfriar a 55-60°C y se agregaron formaldehído hasta una concentración de 6% y *buffer* MOPS 10X (MOPS 0,2 M, AcONa 50 mM y EDTA 10 mM, pH 7) hasta alcanzar una concentración final de 1X. La muestra a sembrar se resuspendió en 50% de formamida conteniendo 6% de formaldehído y *buffer* MOPS 1X. Se calentó a 65°C durante 10-15 min, se enfrió 2 min en hielo, se agregaron 1,5 µl bromuro de etidio 0,1% y 2 µl *buffer* de siembra (BPB 1%, glicerol 50%) y se corrió a 100 V.

5.13 DIGESTION DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en el *buffer* recomendado por el fabricante. Se utilizaron de 3 a 5 U de enzima por µg de ADN y se incubó por 2 h a la temperatura recomendada. Las digestiones de ADN genómico se realizaron utilizando aproximadamente 10 U de enzima por µg de ADN.

5.14 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROELUCION

El fragmento de ADN a purificar fue separado en un gel nativo de agarosa conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, utilizando las condiciones previamente descriptas. Finalizada la corrida, se extrajo un taco de agarosa conteniendo la banda a purificar y se la depositó sobre un pocillo (hecho en otro gel sin bromuro de etidio), previamente tapizado con una membrana de diálisis. Las membranas fueron pretratadas a 100°C durante 5-10 min en una solución de NaHCO₃ 2%, EDTA 10 mM y luego

lavadas con H₂O deionizada. El nivel del *buffer* de corrida (TBE 1X) se mantuvo en el mínimo necesario para lograr un correcto contacto entre los electrodos. La electroelución se llevó a cabo a 5 V/cm durante aproximadamente 30-90 min, dependiendo del tamaño de la banda. El proceso fue controlado por iluminación con una lámpara UV de mano. Confirmada la transferencia a la membrana de diálisis, se procedió a la purificación del ADN. Para ello, sin interrumpir la corriente, se extrajo la membrana y se la lavó 3 veces con 150 µl H₂O, se reunieron los lavados y se extrajeron con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1). Finalmente, se precipitó el ADN con 1/10 de volumen de AcONa 3 M y 2 volúmenes de etanol. Las muestras fueron resuspendidas en H₂O y mantenidas a -20°C hasta su uso.

Una alternativa a la utilización de membranas de diálisis fue el uso de membranas de DEAE-Celulosa (*Schleicher and Schuell*, USA). En este caso se siguió el protocolo provisto por el fabricante.

5.15 SINTESIS DE ADNc DE DOBLE CADENA

Se utilizó el *kit* de síntesis de ADNc de *Amersham* (Reino Unido). Se colocó 1 µg de ARNg viral en un tubo *Eppendorf*, se calentó a 100°C por 1 min, se colocó inmediatamente en hielo y se agregaron 4 µl de *buffer* para síntesis de primer cadena de ADNc, 20 U de inhibidor de ARNasas de placenta humana, 1 mM final de dATP, dGTP y TTP, 0,5 mM final de dCTP, 1,6 µg de oligo(dT), 1 µl de [³²P]-dCTP 10 mCi/ml, 6000 Ci/mmol, 20 U de transcriptasa reversa y H₂O hasta completar 20 µl. Se incubó a 42°C por 1 h y se colocó en hielo. Se separó una alícuota de 1 µl para medir la incorporación de radioactividad a la cadena nascente de ADNc. En el mismo tubo se agregaron 37,5 µl de *buffer* para síntesis de segunda cadena de ADNc, 0,8 U de ARNasa H, 23 U de ADN polimerasa I de *E. coli* y H₂O hasta un volumen final de 100 µl. Se incubó secuencialmente a 12°C por 1 h y a 22°C por 1 h. Se calentó a 70°C por 10 min. Se agregaron 2 U de ADN polimerasa T4 y se incubó a 37°C por 10 min. Se detuvo la reacción con 4 µl de EDTA 0,25 M, pH 8. Se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó una vez con AcONa y etanol y otra vez con AcONH₄. Se resuspendió en H₂O y se agregaron 2,5 µl de adaptadores *Eco* RI, 2 µl de *buffer* L/K 10X (Tris.HCl 6,6

M, pH 7,6, MgCl₂ 250 mM, DTT 250 mM, ATP 50 mM), 5 U de ADN ligasa T4 en un volúmen final de 20 µl. Se incubó toda la noche a 15°C y se detuvo la reacción agregando 2 µl de EDTA 0.25 M. Se sembró toda la muestra en una columna de *Sepharose* CL-4B (*Pharmacia*, Suecia). Se eluyó con buffer Tris.HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM. Se tomaron fracciones de dos gotas cada una (aproximadamente 100 µl) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo. Se tomó el primer pico eluido de la columna y el volumen se llevó a 500 µl en *buffer* L/K 1X. Se agregaron 80 U de polinucleótido quinasa T4, se incubó 30 min a 37°C, se extrajo con fenol-cloroformo y luego con cloroformo. Se redujo el volúmen unas diez veces en evaporador rotatorio y se precipitó con AcONa y etanol. Se resuspendió en 25 µl de H₂O.

Los adaptadores *Eco* RI contenían, de 5' a 3', los sitios de reconocimiento para las enzimas *Eco* RI, *Bam* HI, *Kpn* I y *Nco* I. Seguidamente, se mezclaron 10 ng del plásmido pUC13 digerido con la enzima *Eco* RI y tratado con fosfatasa alcalina (*Pharmacia*, Suecia) con aproximadamente 5 ng de ADNc con extremos adaptados para *Eco* RI y 2 µl de *buffer* de ligación 10X (Tris.HCl 0,66 M, pH 7,6, MgCl₂ 25 mM, ditiotreitól 25 mM, ATP 5 mM) en un volumen final de 20 µl. Se incubó toda la noche a 12°C.

La incorporación de radioactividad al ADNc se midió de la siguiente manera: Se tomó 1 µl de muestra y se diluyó en 4 µl de EDTA 0,2 M. Se sembraron dos filtros *Whatmann* DE 81 de 2 cm de diámetro con 2 µl de muestra. Uno de los filtros se lavó seis veces en Na₂HPO₄ 0,5 M por 5 min cada vez, luego se lavó dos veces con H₂O por 1 min y finalmente se lavó dos veces con etanol 95% por 1 min. Se midió la radioactividad de ambos filtros en un contador de centelleo. Se calculó el porcentaje de incorporación teniendo en cuenta que el filtro lavado contiene la radioactividad incorporada, mientras que el otro contiene la radioactividad total.

5.16 SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE ADN EN EL VECTOR M13

Preparación de vectores e insertos. Para su utilización en reacciones de ligación, se digirió 1 µg del plásmido con las enzimas adecuadas y la forma

lineal del plásmido fue purificada mediante electroelución a partir de geles de agarosa. Para su utilización, los vectores se resuspendieron en H₂O a una concentración aproximada de 50 ng/μl.

En general, los insertos fueron purificados de geles de agarosa. En algunos casos los fragmentos fueron liberados del clon original por digestión con las enzimas de restricción adecuadas y, luego de inactivar las mismas por calor, la mezcla fue utilizada directamente en las reacciones de ligación.

Reacciones de ligación de ADN. En cada reacción de ligación se utilizaron entre 20 y 100 ng vector. Los volúmenes de reacción fueron de entre 10 y 20 μl, utilizando 0,5 μl de ADN ligasa del fago T4 (1 U/μl). Las ligaciones se realizaron durante 10-16 h a 12-16°C en *buffer* de ligación (Tris.HCl 0,66 M, pH 7,6, MgCl₂ 25 mM, DTT 25 mM, ATP 5 mM).

Se incluyó siempre un control conteniendo vector sin inserto, para poder estimar el aporte del vector no cortado o religado al número total de colonias obtenidas luego de la transformación. Las relaciones vector:inserto utilizadas fueron de aproximadamente 1:2 a 1:5 moles. Se realizaron varias reacciones, manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto.

5.17 PREPARACION DE ADN DE CADENA SIMPLE A PARTIR DE FAGOS M13

Se infectaron 2 ml de una dilución 1/50 de un cultivo saturado de la cepa JM 101 de *E. coli* a partir de una placa de lisis de un fago recombinante, utilizando escarbadietes estériles. Se incubó a 37°C con agitación durante 6 a 8 h, se transvasó una alícuota de 1,5 ml a un tubo *Eppendorf* y se centrifugó durante 5 seg a 12000 rpm. El sobrenadante se volvió a centrifugar y se transfirieron 1,2 ml a otro tubo *Eppendorf*. Se agregaron 200 ul de PEG 8000 20%, NaCl 2.5 M y se incubó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se extrajo cuidadosamente todo el sobrenadante. El *pellet* de fagos se resuspendió en 200 μl de Tris.HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1mM y se extrajo

con 100 μ l de fenol equilibrado en Tris.HCl 1 M, pH 8. Se extrajo una vez con cloroformo y se precipitó con 1/2 volumen de AcONH₄ y 2 volúmenes de etanol. El *pellet* se lavó con 1 ml de etanol 80% y se resuspendió en 20 μ l de H₂O.

5.18 PREPARACION DE BACTERIAS *E. COLI* COMPETENTES (HANAHAN, 1985)

A partir de una colonia aislada en una placa de medio mínimo (o del medio selectivo adecuado para la cepa de *E. coli* a utilizar), se realizó una estria en una placa de medio SOB (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM). Luego de incubar durante toda la noche, se tomaron con un ansa varias colonias de aproximadamente 2-3 mm de diámetro (una colonia cada 10 ml de medio a utilizar), se colocaron en un tubo *Eppendorf* conteniendo 1 ml de medio SOB, se las dispersó por agitación y se utilizó la suspensión para inocular 100 ml de medio SOB contenidos en un Erlenmeyer de 1 l. Se incubó a 37°C con agitación hasta OD₅₅₀ = 0,7 y luego se enfrió el cultivo colocándolo en hielo durante 15 min. Se cosecharon las bacterias por centrifugación en tubos *Falcon* de 50 ml a 3500 rpm durante 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secaron brevemente los tubos por inversión sobre papel absorbente. Las células se resuspendieron en solución TFB (KCl 7,4 g/l, MnCl₂.4H₂O 8,9 g/l, CaCl₂.2H₂O 1,5 g/l Co(NH₂)₆Cl₃ 0,8 g/l, KMES 10 mM, pH 6,3) utilizando 1/3 del volumen del medio original. Se dejó en hielo durante 15 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Se resuspendieron las bacterias en solución TFB (1/12,5 del volumen del medio original). Se agregaron 7 μ l de DMSO-DTT (DTT 0,153 g/ml, DMSO 0,9 ml/ml, AcOK 10 mM, pH 7,5), por cada 200 μ l de suspensión de bacterias. Se agitó unos segundos y se dejó en hielo durante 10 min. Se agregó una segunda alícuota de solución DMSO-DTT, se procedió como en el paso anterior y se incubó en hielo durante 20 min. Finalmente, se fraccionaron las células en alícuotas de 200 μ l en tubos *Eppendorf*.

5.19 TRANSFORMACION DE BACTERIAS *E. COLI* COMPETENTES

Se agregó el ADN (en un volumen menor que 10 μ l), a un tubo conteniendo 200 μ l de células competentes. Se agitó y se incubó en hielo durante 40 min. Se colocó el tubo en un baño a 42°C durante 90 seg y luego en hielo durante 2 min. Se agregaron 800 μ l de medio SOC (SOB más glucosa hasta 20 mM final) y se incubó a 37°C por 45 min con agitación moderada. Se centrifugó durante 5 seg en microcentrifuga y se descartaron 800 μ l del sobrenadante. Luego de resuspender las células en los 200 μ l restantes del sobrenadante, se las sembró sobre una placa de Petri conteniendo medio selectivo. En aquellos casos en que el plásmido poseía el sistema de selección por α -complementación de β -galactosidasa, se agregaron 40 μ l de IPTG 100 mM, 40 μ l de X-Gal 2% en dimetilformamida. Se incubó durante toda la noche a 37°C.

5.20 TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS DE NYLON (*SOUTHERN BLOT*)

Las muestras de ADN genómico (aproximadamente 10 μ g) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de 0.8%. Los geles se tiñeron luego durante 20 min con bromuro de etidio y se lavaron con H₂O durante 5 min. Los geles fueron fotografiados antes de ser transferidos. Cuando se analizaron ADNs plasmídicos o fragmentos (50 ng/banda), los geles de agarosa 1% fueron corridos en presencia de bromuro de etidio.

Luego de la corrida electroforética, los geles se incubaron en HCl 0,25 N durante 15 min a temperatura ambiente, con el fin de depurar parcialmente el ADN. En el caso de los fragmentos clonados se omitió este paso. Luego del tratamiento con ácido se desnaturalizó el ADN con NaOH 0,2 N, NaCl 0,6 N durante 30 min a temperatura ambiente. Se neutralizó lavando varias veces en *buffer* Tris.HCl 0,5 M, pH 7,5, NaCl 0,5 M durante aproximadamente 1 h. Durante los últimos 20 min de la neutralización, se pretrató la membrana de nylon (*Nytran*, *Schleicher & Schuell*, USA) equilibrándola durante este tiempo en solución SSC 2X (citrato de sodio 8,82 g/l, NaCl 17,53 g/l, pH 7). Luego se procedió a la transferencia del

ADN por capilaridad durante aproximadamente 12-16 h. Los puntos de siembra de la muestra se marcaron con tinta. La membrana se lavó en SSC 6X para eliminar restos de agarosa y luego se calentó durante 2 h a 80°C. La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta la hibridación.

5.21 TRANSFERENCIA DE ARN A MEMBRANAS DE NYLON (NORTHERN-BLOT)

Los ARNs fueron separados electroforéticamente en geles conteniendo formaldehído, tal como se describió previamente. Una vez terminada la separación, se lavó y equilibró el gel en solución SSC 10X durante 30 min. El gel fue luego transferido por capilaridad a una membrana de nylon (*Nytran, Schleicher & Schuell*, USA) equilibrada en el mismo *buffer*. Luego de transferir el ARN por 12-16 h, la membrana se lavó, se secó a temperatura ambiente y se horneó a 80°C durante 2 h. La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta su uso en la hibridación.

5.22 HIBRIDACION

Se utilizaron aproximadamente 50-100 µl de solución de hibridación, por cada cm² de membrana (en general, entre 5-10 ml). La prehibridación e hibridación se realizaron en bolsas de polietileno o en horno de hibridación. La solución de prehibridación e hibridación contenía solución SSPE 2X, SDS 1%, pirofosfato de sodio 0,001%, PAES 0,001 mg/ml. En general las membranas se prehibridaron en una bolsa de polietileno alrededor de 1 h con agitación a 65°C en baño termostático o en horno de hibridación rotatorio a 65°C durante 1 h. Luego de la prehibridación, se desnaturalizó la sonda y se la introdujo en la bolsa de polietileno o en el tubo del horno de hibridación. Se incubó con agitación durante 12-16 h, a la temperatura adecuada (65°C para sondas 100% homólogas a la secuencia blanco), luego de lo cual se lavó una vez con 1X SSC, 0,1% SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente, dos veces con 0,1X SSC, 0,1% SDS durante 15 minutos a la temperatura adecuada y una vez con 0,1X SSC durante 5 min a

temperatura ambiente. Las membranas fueron expuestas con película radiográfica X-O-Mat (Kodak, USA) y pantalla intensificadora a -70°C por períodos variables.

5.23 DELECCIONES ANIDADAS DE FRAGMENTOS DE ADN_c CLONADOS EN pUC13 (HENIKOFF, 1984)

5 µg de plásmido, purificado por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl, se digirieron con 20 U de la endonucleasa de restricción *Pst* I durante 2 h a 37°C. La mezcla de reacción se extrajo con fenol:cloroformo (1:1), luego con cloroformo y se precipitó con etanol y AcONa 0,3 M. Se resuspendió en H₂O, se trató con la enzima de restricción *Sma* I durante 2 h a 28°C y se precipitó de la misma manera. El *pellet* de ADN se resuspendió en 40 µl de *buffer* Exo III (Stratagene, USA) 1X conteniendo 300 U de exonucleasa III. Se incubó a 32°C y se tomaron alícuotas de 10 µl cada 60 seg inactivando inmediatamente la enzima por calentamiento a 70°C durante 10 min. A cada alícuota se agregaron 10 µl de *buffer* S1 2X (AcONa 24 mM, pH 4,6, NaCl 0,6 M, ZnSO₄ 2,4 mM, glicerol 12%) conteniendo 4 U de nucleasa S1. Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se agregó 1 µl de Tris.HCl 1 M, pH 8,3 e inmediatamente se inactivó la enzima a 70°C durante 10 min. Se extrajo con fenol:cloroformo (1:1), luego con cloroformo y se precipitó con etanol y AcONa. Se resuspendió en 23 µl de *buffer* Klenow 1X (NaCl 50 mM, MgSO₄ 10mM, Tris.HCl 10 mM, pH 8) conteniendo 0,5 U del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I. Se incubó a temperatura ambiente por 2 min y se agregó 1 µl de una solución de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato 2,5 mM. Se incubó 10 min a 37°C y se inactivó la enzima a 70°C durante 10 min. Una alícuota de 3 µl de cada tiempo de reacción se trató con ADN ligasa T4.

5.24 SECUENCIACION DE ADN (SANGER ET AL., 1977)

La secuenciación se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos. Para ello se utilizó el *kit* de secuenciación

Sequenase (U.S.B., USA). En cada mezcla de reacción se agregaron 5 μ Ci de [35 S]-dATP (1360 Ci/mmol).

Secuenciación de ADN de cadena simple del fago M13. Se disolvieron 600 ng de ADN de cadena simple y 5 ng de iniciador en 10 μ l de H₂O. Se calentó a 65°C por 2 min y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Se procedió luego según el protocolo del *kit de Sequenase*

Secuenciación de ADN plasmídico de cadena doble. Se resuspendieron 2 μ g de ADN plasmídico purificado por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl o por resina de intercambio iónico (*Quiagene*, USA) en 8 μ l de H₂O, se agregaron 2 μ l de NaOH 2 N y se dejaron 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 μ l de iniciador (5 ng/ μ l) y 9 μ l de AcONa 1 M, pH 5. Se mezcló, se agregaron 75 μ l de etanol y se colocó a -70°C durante 20 min. Luego de centrifugar se lavó dos veces el *pellet* con etanol 80% y se resuspendió en 10 μ l de *buffer Sequenase IX*. A continuación se procedió según se indica en el protocolo del *kit de Sequenase*.

5.25 ELECTROPORACION DE *A. TUMEFACIENS* (MERSEREAU, 1990)

Se utilizó la cepa C-58 portadora del plásmido pMP90 que posee resistencia a gentamicina y rifampicina. Las bacterias se cultivaron y prepararon para la electroporación según las instrucciones detalladas en el Manual del electroporador (*Gene Pulser*, *BioRad*, USA). Se electroporaron 40 μ l de células competentes por ensayo, sometiénolas a un pulso de 1,5 kV, 25 μ F y 200 ohm. Las células se recuperaron durante una noche en 10 ml de medio LB a 28°C y se sembraron en placas de medio LB suplementado con kanamicina 100 μ g/ml, rifampicina 50 μ g/ml y gentamicina 100 μ g/ml. Se incubó a 28°C durante 2 días y se procedió a verificar la presencia de plásmido mediante minipreparaciones y análisis de restricción.

5.26 TRANSFORMACION DE DISCOS DE HOJA DE TABACO (HORSCH ETAL., 1985)

Se tomaron hojas jóvenes de *N. tabacum* cv. Xanthi y se esterilizaron en hipoclorito durante 20 min. Se lavaron con agua estéril y se cortaron en cuadrados de 1 cm de lado. Los explantos se colocaron en placas de Petri con medio líquido de Murashige-Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962), se agregaron 100 µl de un cultivo fresco de *A. tumefaciens* conteniendo el ADN-T a transferir a la planta y se incubaron por dos días a 27°C en cámara de cría. Los explantos se transfirieron a medio MS sólido suplementado con benciladenina (BA) 1 mg/l, ácido naftalenacético (ANA) 0,1 mg/l, kanamicina 100 mg/l y cefotaxime 500 mg/l. Dos a tres semanas más tarde se regeneraron tallos, que al alcanzar 1 cm de largo, se cortaron y se colocaron en medio MS suplementado con kanamicina y cefotaxime en concentraciones similares a las anteriores. Luego de dos a tres semanas se desarrollaron raíces adventicias.

5.27 RUSTICACION DE PLANTAS

Para el pasaje a invernadero, las plantas que crecían *in vitro* se lavaron en agua corriente y se transplantaron a una mezcla de volúmenes iguales de humus, arena y turba, suplementada con fertilizantes ricos en fosfato y nitrógeno. La temperatura del invernadero era controlada mediante aire acondicionado y aspersion de agua durante 5 min, 6 veces diarias. En los ensayos realizados en el invernadero del INTA-Luján de Cuyo, la temperatura se controló mediante redes de media sombra y riego. Durante los primeros 2-3 días, las plantas se mantuvieron cubiertas con un frasco de vidrio o una bolsa de polietileno para evitar la deshidratación. Luego, las plantas se mantuvieron descubiertas por 1-2 h diarias, incrementando este período hasta que no hiciera falta protegerlas de la deshidratación. A los 3 días luego del trasplante se agregó insecticida *Temic*.

5.28 ENSAYO DE ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA (JEFFERSON, 1987)

La β -glucuronidasa es una hidrolasa que cataliza el clivaje de una gran variedad de β -glucurónidos. Existen sustratos artificiales como el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Glu) que, al ser hidrolizados por la enzima, originan un producto coloreado.

Se tomó un trozo de tejido de la planta a analizar y se lo colocó en un pocillo de una multiplaca de 1 cm de diámetro. Se agregaron 200 μ l de una solución de X-Glu 0,5 mg/ml, $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}_2$ 50 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Triton X-100 0,1%, Sarcosil 0,1%, pH 7. Se incubó luego a 37°C durante 6-12 h y se observó la presencia o ausencia de precipitado color azul sobre el tejido. El tiempo de incubación dependió de la permeabilidad del tejido. Para aumentar el contraste por extracción de la clorofila y para preservar el tejido se extrajo varias veces con alcohol 70% hasta decolorar.

5.29 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE NPT II (MC DONNELL *ET AL.*, 1987)

La neomicina fosfotransferasa-II es una enzima de origen bacteriano que cataliza la o-fosforilación de antibióticos aminoglicósidos (neomicina, kanamicina y G-418). La reacción catalizada por esta enzima involucra la transferencia del grupo fosfato del ATP al antibiótico. La molécula así fosforilada es incapaz de unirse al ribosoma e interferir con la síntesis de proteínas. Utilizando [^{32}P]-ATP es posible detectar la actividad de la enzima por la incorporación de radioactividad al antibiótico.

Se trató una membrana de fosfocelulosa (P81 *Whatmann*, USA) con una solución de ATP 30 mM y pirofosfato de sodio 50 mM, durante 10 min con agitación y luego se la dejó secar a temperatura ambiente. Se homogenizaron aproximadamente 50 mg de hojas en presencia de 50 μ l de *buffer* de extracción (glicerol 20%, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, β -mercaptoetanol 10%, SDS 0,2%), utilizando un tubo *Eppendorf* y un vástago de plástico descartable. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se

tomaron 15 μ l del sobrenadante y se agregaron a 15 μ l de una solución conteniendo Tris.HCl 65 mM, MgCl₂ 40 mM, NH₄Cl 0,4 M (titulado a pH 7,1 con ácido maleico 1 M), ATP 0,05 mM, [³²P]-ATP 100 μ Ci/ml, neomicina 175 μ g/ml y NaF 50 mM. Se incubó durante 1 h a 37°C y se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm. Se sembraron 20 μ l del sobrenadante sobre la membrana de fosfocelulosa. Luego de secar las muestras, las membranas se lavaron con *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,4, previamente calentado a 80°C, durante 10 min con agitación suave (el *buffer* se va enfriando a temperatura ambiente durante los lavados). Este lavado se repitió 4 veces. Finalmente se realizaron autorradiografías en placas Kodak X-OMAT por exposición durante 24 h.

5.30 SELECCION DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS POR GERMINACION

Se tomaron aproximadamente 100 a 200 semillas de cada línea transgénica y se esterilizaron en lavandina comercial diluída al 20% durante 5 min. Se lavaron con varios volúmenes de H₂O bidestilada estéril, se sembraron en medio de cultivo MS suplementado con 100 μ g/ml de kanamicina y se incubaron en cámara de cría. Dos semanas después de la germinación, se seleccionaron las plantas que se habían desarrollado normalmente y se transfirieron a frascos conteniendo el mismo medio de cultivo. Al llegar al estado de 4 hojas, las plantas fueron transferidas a macetas con tierra y pasadas al invernadero.

5.31 INOCULACION DE PLANTAS CON VIRUS

Se homogeneizó en mortero 1 g de hoja infectada en 10 ó 100 ml de *buffer* fosfato de sodio 10 mM (para obtener inóculos diluídos 10⁻¹ ó 10⁻², respectivamente). Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se usaron 100 μ l del sobrenadante para infectar las dos primeras hojas que estuvieran completamente expandidas. El inóculo se frotó usando guantes, sobre una hoja espolvoreada con carborundum de 60 *mesh* y se lavó la hoja con agua corriente. Se utilizó (según se indica en los experimentos detallados en

"Resultados") extractos de plantas sanas o infectadas con PepSMV o con PVY.

5.32 ENSAYOS DE ELISA

Técnica de DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Las muestras fueron tomadas con tubos *Eppendorf*, cerrando los mismos de manera de atrapar un disco de la hoja de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 10 mg de peso, entre la tapa y los bordes del tubo. Los discos se conservaron a -20°C hasta el momento del ensayo. Excepto en los casos indicados, cada disco se homogenizó en el mismo tubo, en 100 µl de PBS-Tween (NaCl 18 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, Tween-20 0,05%, pH 7,4) con un vástago plástico de punta cónica. Las placas de ELISA fueron recubiertas con antisuero policlonal anti-PepSMV (gentilmente provisto por las Ing. Agr. Olga Gracia y Sandra Lampasona del INTA-Luján de Cuyo) en *buffer* carbonato 10 mM, pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Se lavó con PBS-Tween, se agregó el homogenato del disco de hoja y se incubó a 37°C durante 4 h. Se lavó de la misma manera y se agregó un antisuero policlonal anti-PepSMV conjugado a fosfatasa alcalina. Se incubó a 37°C durante 4 h, se lavó con PBS, se agregó el sustrato *p*-nitrofenilfosfato y se leyó en espectrofotómetro a los 20 min a 405 nm. Dispersos en cada placa se colocaron 3 controles positivos y 3 negativos. Se consideró negativo al valor de absorbancia igual o menor al promedio de los 3 controles negativos de cada placa. Se consideró positivo a todo valor superior al promedio de los controles negativos de cada placa.

Ensayos de ELISA recubriendo la placa con antígeno. En los experimentos de la Fig. 6.18 D y F las placas se recubrieron con el extracto de plantas. Las muestras se homogenizaron en 1 ml de *buffer* carbonato 10 mM, pH 9,6. Se sembraron 200 µl de extracto en cada pocillo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se lavó de la misma manera y se agregó antisuero policlonal de conejo anti-PepSMV. Se incubó a 37°C durante 4 h, se lavó en forma similar y se agregó antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. Se agregó el sustrato y se leyó en espectrofotómetro a 405 nm.

5.33 PROGRAMAS DE COMPUTACION

Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas Pustell-IBI y DNASIS.

5.34 ACELERADOR DE MICROPARTICULAS

Se utilizó un sistema diseñado en el INRA-Versailles, Francia. Consiste en un desecador conectado a una bomba de vacío donde se coloca el tejido a "bombardear". El ADN se mezcla con las micropartículas de tungsteno precipitado en etanol, se coloca la mezcla sobre un disco de aluminio de 1 cm de diámetro y se deja secar. El disco se coloca dentro de un portafiltros *Millipore* que está conectado a un tanque de helio comprimido. La punta del portafiltros se coloca en un orificio del desecador de manera tal que el sistema quede herméticamente cerrado. Una válvula eléctrica se abre durante 25 mseg dejando pasar helio a una presión de 6 bar controlada por un regulador de presión conectado al tanque de helio. Luego del "bombardeo" se deja entrar el aire al sistema y se incuba el tejido en una solución de 100 mM NaCl y 100 mM KCl durante 16 h en cámara de cría. Luego se somete a un ensayo de actividad de GUS.

6. RESULTADOS

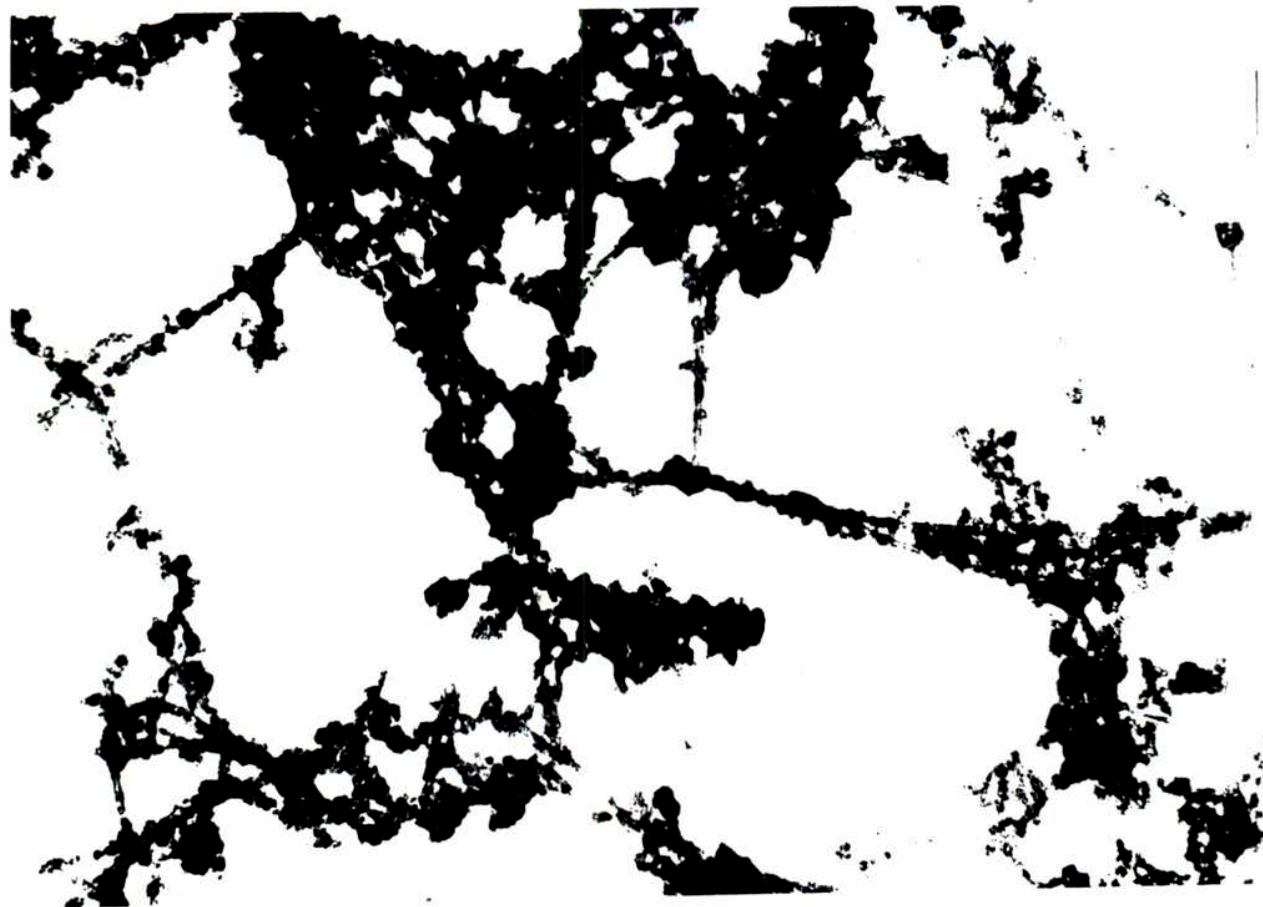
6.1 Clonado y secuenciación del gen de la CP de PepSMV

Se seleccionaron hojas de *N. tabacum* cv. White Burley infectadas con PepSMV que mostraran una sintomatología acentuada, fundamentalmente en forma de mosaico (Fig. 6.1). Estas hojas se utilizaron para purificar viriones y luego extraer el ARNg viral. Debido a que el método de Murphy *et al.* (1990), comúnmente usado para la purificación de potyvirus, permite obtener preparaciones de viriones de buen nivel de pureza pero con bajos rendimientos, se utilizó el protocolo modificado que se describe en "Materiales y Métodos". Este procedimiento brinda altos rendimientos de viriones, pero con niveles considerables de impurezas. Dado que dichas contaminaciones son eliminadas durante los pasos de purificación del ARNg, este protocolo se adecuaba mejor al objetivo perseguido. Para verificar la calidad de la preparación de viriones, se analizó una muestra mediante microscopía electrónica. La Fig. 6.2 muestra el resultado final de una purificación parcial. Se observa una alta concentración de viriones filamentosos, junto con abundantes contaminantes de restos celulares. Seguidamente, se purificó el ARNg por extracción fenólica y el producto se corrió en una electroforesis en gel de agarosa/formaldehído para constatar su calidad. Como patrones de peso molecular se corrieron muestras de ARNg del PVX y de ARNg de PVY°. El ARNg del PepSMV resultó ser de un tamaño similar al de PVY (Fig. 6.3 A). Dado que PepSMV pertenece al género *Potyvirus*, existía la posibilidad de que hubiera homología parcial entre las secuencias de los genes de las CPs de este virus y del PVY. Con el fin de comprobar este punto, se utilizó como sonda el clon pBS8 (conteniendo un fragmento de ADNc del PVY°) para identificar secuencias de PepSMV en un ensayo de *Northern-blot*. En un gel similar al anterior, se corrieron dos preparaciones diferentes de ARNg de PepSMV, en paralelo con ARNg del PVY y ARN total de plantas infectadas con PVX y se transfirieron los mismos a una membrana de *nylon*. Luego de la hibridación y dado que se desconocía el grado de homología entre las secuencias del PVY y PepSMV, se lavó la

FIGURA 6.1: Hojas de *N. tabacum* cv. White Burley presentando síntomas acentuados de infección con PepSMV, utilizadas para preparaciones de virión.



FIGURA 6.2: Micrografía electrónica de una purificación parcial de viriones de PepSMV. Se observan partículas virales contaminadas con restos celulares.



membrana a baja rigurosidad. La Fig. 6.3 B muestra la autorradiografía correspondiente a este ensayo. Se observa que la sonda hibrida débilmente con el ARNg del PepSMV y fuertemente con el virus homólogo. No se ven bandas de hibridación contra el ARN de plantas infectadas con PVX. De esta manera, se concluyó que el clon de ADNc de PVY podría servir como sonda para identificar clones que contuvieran secuencias correspondientes al gen de la CP del PepSMV.

Una alícuota del ARN viral obtenido se utilizó para sintetizar ADNc de cadena doble tratándolo con transcriptasa reversa y oligo(dT) como cebador, ARNasa H y ADN polimerasa I. De esta manera, se favorecía la obtención de clones de ADNc correspondientes al gen de la CP, ya que éste se encuentra localizado hacia el extremo 3' del ARNg viral. Para evaluar la calidad del ADNc obtenido, se incorporó una pequeña proporción de desoxinucleósidos trifosfato radioactivos a la mezcla de reacción. Luego de finalizada la incubación, una alícuota de la misma se corrió en un gel de agarosa alcalino y se realizó una autorradiografía. En la Fig. 6.4 se observa que el tamaño de los mayores fragmentos de ADNc obtenidos alcanza a los 2000 pb. La muestra de ADNc fue tratada con ADN polimerasa del fago T4 para obtener extremos romos, adicionándose por ligación adaptadores *Eco* RI. La mezcla de reacción se pasó por una columna de *Sepharose* CL-4B para eliminar el exceso de adaptadores y los fragmentos más pequeños de ADNc. El eluido se trató luego con polinucleótido kinasa para fosforilar los extremos del ADNc y se ligó a un vector pUC13 previamente digerido con *Eco* RI. Con la mezcla de ligación se transformaron bacterias competentes de la cepa NM 522 de *E. coli* y se obtuvieron unos 700 clones que conformaron una biblioteca de ADNc genómico de PepSMV. Se seleccionaron al azar 21 de estos clones, se purificaron los plásmidos correspondientes, y se digirieron con *Eco* RI para liberar los fragmentos de ADNc. Los diferentes productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa para realizar un ensayo de *Southern-blot* usando como sonda la secuencia de PVY empleada en el ensayo de la Fig. 6.3 y lavando las membranas de *nylon* en las mismas condiciones de rigurosidad. El resultado de este experimento mostró que 17 de los 21 clones contenían insertos que hibridaban con la sonda y que variaban desde aproximadamente 300 a 1900 pb (Fig. 6.5).

FIGURA 6.3: A) Electroforesis en gel de 1,2% agarosa/formaldehído. Calle 1: ARNg de PVX; calle 2: ARNg de PVY; calle 3: ARNg de PepSMV. Las flechas indican las posiciones de los respectivos ARNs virales. B) *Northern-blot* del ARNg de PepSMV hibridado con una sonda de ADNc de la CP de PVY. Calles 1 y 2: dos preparaciones diferentes de ARNg de PepSMV; calle 3: ARN total de plantas infectadas con PVX; calle 4: ARNg de PVY.

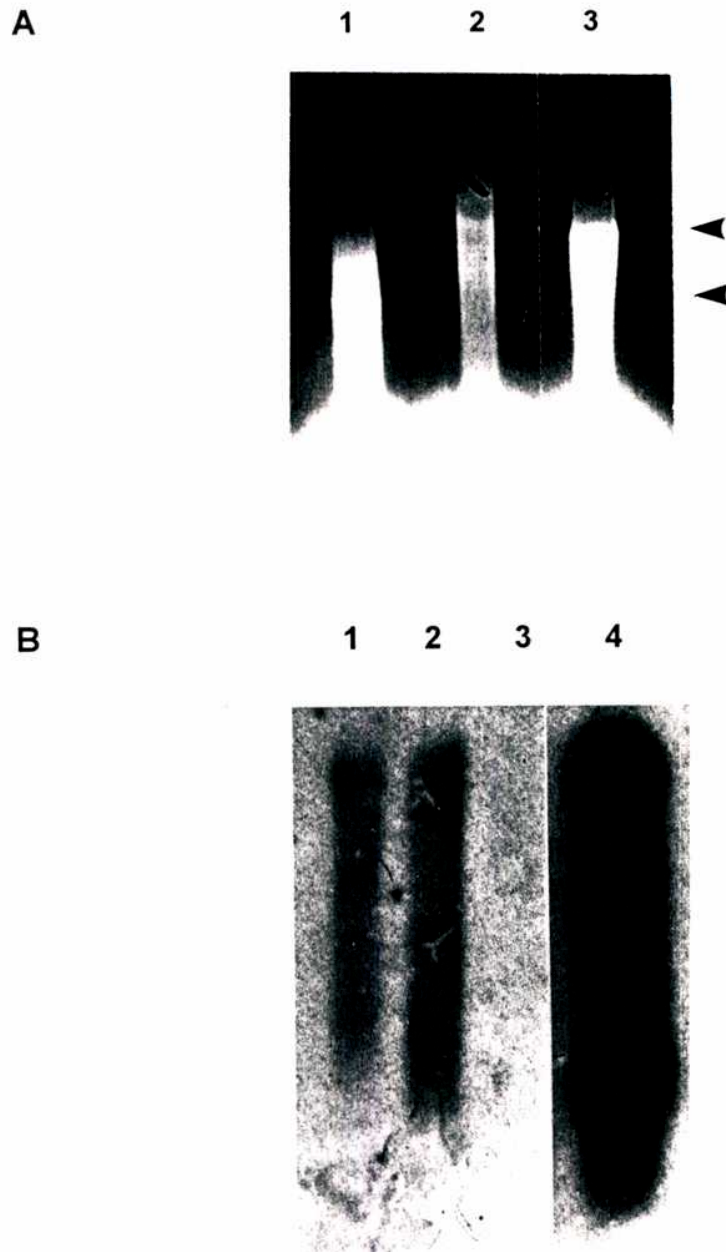


FIGURA 6.4: Autorradiografía del ADNc de PepSMV (ADNc) corrido en gel alcalino de 1% agarosa. M: marcador de peso molecular (ADN del fago λ digerido con *Hind* III).

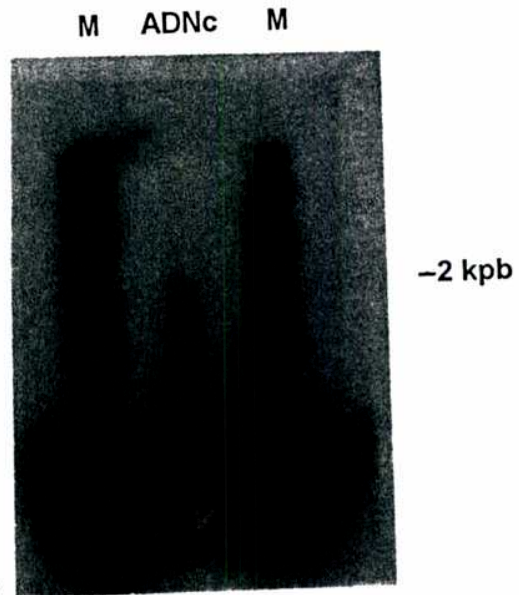
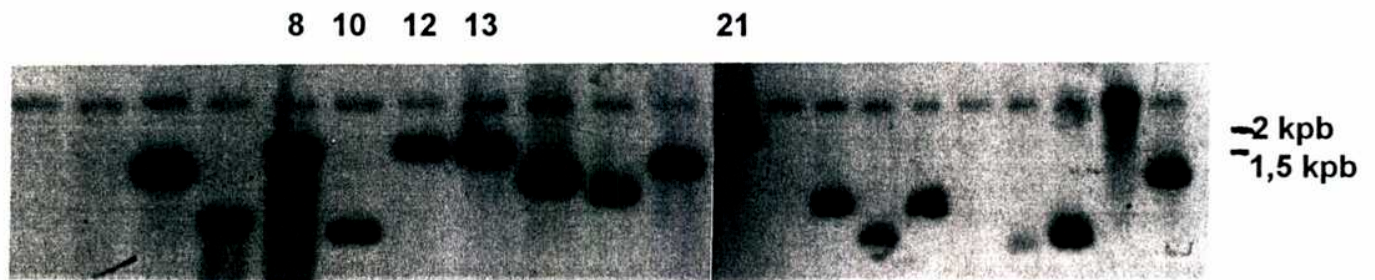


FIGURA 6.5: *Southern-blot* de los clones pertenecientes a la biblioteca de ADNc de PepSMV. Se señalan los clones pSM8, pSM12 y pSM13 (de 1600 pb cada uno); pSM10 (de 600 pb) y pSM21 (de 1900 pb).

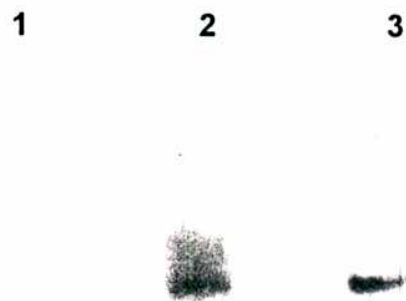


El clon pSM8, que comprendía un fragmento de 1600 pb, fue utilizado como sonda en un ensayo de *Northern-blot* para verificar la identidad del ADNc clonado. La Fig. 6.6 muestra que este clon hibrida con una banda del tamaño correspondiente al ARNg viral en extractos de plantas infectadas con PepSMV. No se observa hibridación en extractos correspondientes a ARN de plantas sanas.

Además del clon pSM8, se seleccionaron los clones pSM10 y pSM21 (conteniendo fragmentos de 600 y 1900 pb, respectivamente) para secuenciar parcialmente sus extremos y determinar su ubicación relativa en el genoma viral por comparación con la secuencia genómica de PVY, la cual ya había sido reportada para la cepa necrótica (PVYⁿ, Robaglia *et al.*, 1989).

La secuenciación parcial de los clones pSM8 y pSM10 mostró que contenían la región 3' del genoma, incluyendo parte del tracto de poli(A). Dado que el gen de la CP viral y la región 3' no codificante de los potyvirus comprenden aproximadamente 1200 pb, resultaba muy probable que el clon pSM8 contuviera el gen completo de la CP de PepSMV. Además, estos datos de secuencia permitieron detectar la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima *Eco* RV a aproximadamente 200 pb del extremo 3' del clon. Se verificó por un ensayo de restricción la presencia de este sitio y se comprobó que era único. El clon pSM21 se encontraba en orientación inversa al anterior. La secuencia de uno de los extremos de este clon mostró una alta homología de secuencia con el gen N1b de PVY (que se encuentra inmediatamente río arriba del gen de la CP) por lo cual se dedujo que también podría contener el gen completo de la cápside. Para confirmarlo, se verificó la presencia del sitio *Eco* RV digiriendo con esta enzima (presente en la región 3' no codificante de PepSMV) y con *Hind* III (perteneciente al *polylinker* de pUC13). Paralelamente, se realizó el mismo ensayo con otros dos clones (pSM12 y pSM13, ambos de alrededor de 1600 pb) de los que no se disponían datos de secuencia. La Fig. 6.7 A muestra que el clon pSM13 no contiene el sitio *Eco* RV y que pSM12 se encuentra en orientación similar a pSM8. El clon pSM21 contenía al sitio *Eco* RV y, en consecuencia, al gen completo de la CP. Por lo tanto, este clon se seleccionó para secuenciar. Las ubicaciones relativas de los clones utilizados se muestran en la Fig. 6.7 B.

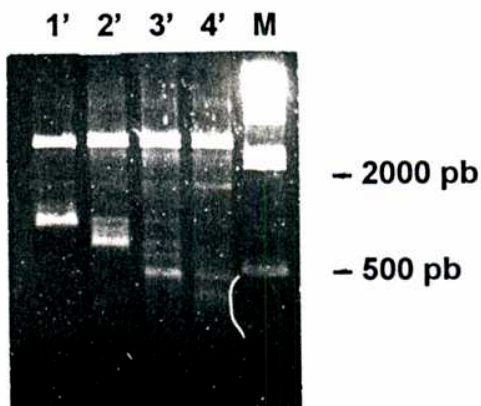
FIGURA 6.6: *Northern-blot* de ARN total de plantas sanas (calle 1), de plantas infectadas con PepSMV (calle 2). En paralelo se corrió ARNg de PepSMV (calle 3).



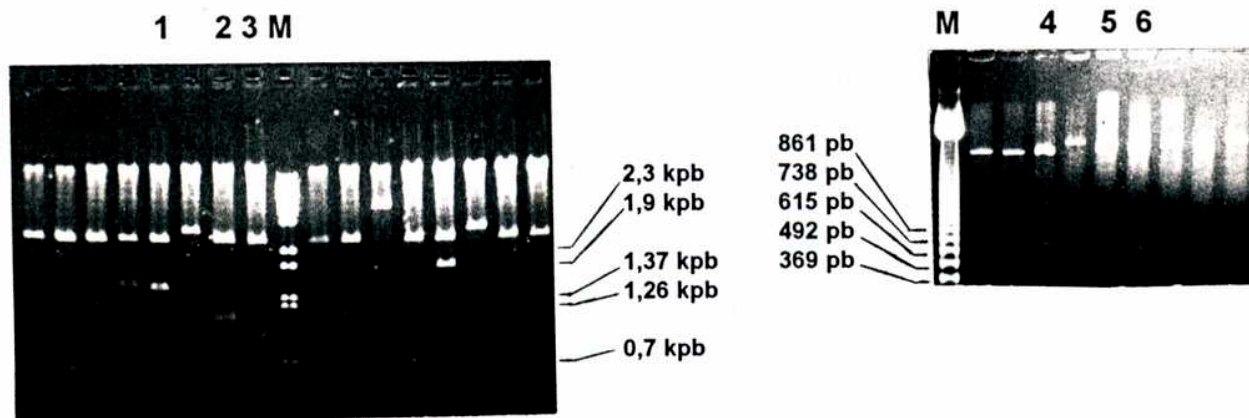
Con el objeto de secuenciar completamente los clones pSM8 y pSM21 (que incluían el gen de la CP y estaban orientados en forma opuesta respecto del vector de clonado, se procedió a la producción de delecciones anidadas, utilizando una combinación de exonucleasa III y nucleasa S1. Para ello, se purificaron los plásmidos por ultracentrifugación en gradiente de CsCl y se digirieron con las enzimas *Pst* I y *Sma* I. Los sitios de reconocimiento para ambas enzimas se encuentran en el *polylinker* del vector pUC13. Mientras que la primera no es susceptible al ataque por la exonucleasa III, la segunda sí lo es. Para obtener crecientes grados de delección, se trataron ambos plásmidos con exonucleasa III y se tomaron alícuotas de la reacción a 1, 2, 3 y 4 min al cabo de los cuales se detenía la reacción. Seguidamente se degradaron con nucleasa S1 las porciones de ADN de cadena simple dejadas por la exonucleasa III. Como control del procedimiento, se digirieron alícuotas obtenidas a los distintos tiempos de reacción con la enzima *Eco* RI, lo que permitió liberar las diferentes poblaciones de fragmentos deleccionados. La Fig. 6.8 A muestra los resultados obtenidos con el clon pSM8. Las cuatro poblaciones de fragmentos obtenidas con cada clon fueron tratadas sucesivamente con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y con ADN ligasa T4, y usadas para transformar células competentes. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de varias colonias y se digirieron con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III para liberar los fragmentos de ADNc. La Fig. 6.8 B muestra los resultados de las restricciones correspondientes a algunos subclones derivados de pSM8. Entre éstos, se escogieron para su secuenciación los subclones p813, p814, p815, p832, p844 y p845 de aproximadamente 1250, 1000, 850, 600, 500 y 300 pb, respectivamente. Del clon pSM21 se escogieron p2124, p2113, p2114, p2122, p2143 y p2131, de 1800, 1700, 1600, 1400, 1250, 1150 y 850 pb, respectivamente. Los plásmidos mencionados se digirieron con *Eco* RI y *Hind* III y los fragmentos liberados se subclonaron en el vector M13 mp19 digerido con las mismas enzimas y purificado por electroelución. Se transformaron células competentes JM 101 y se obtuvieron fagos recombinantes. Se prepararon ADNs de cadena simple correspondientes a cada subclon y se secuenciaron aproximadamente 300 bases de cada uno. La comparación de los datos obtenidos permitió superponer en forma escalonada las secuencias parciales. De

FIGURA 6.8: A) Digestión de las mezclas de reacción de delección del clon pSM8 a 1, 2, 3 y 4 min. Se observan las poblaciones de fragmentos liberadas, de tamaño decreciente a medida que aumenta el tiempo de reacción (M: marcador de peso molecular). B) Subclones deletantes del clon pSM8. Se señalan los subclones p813 (calle 1), p814 (calle 2), p815 (calle 3), p832 (calle 4), p845 (calle 5) y p844 (calle 6).

A



B



esta manera, se secuenciaron 1300 de las 1600 pb del clon pSM8, que comprendían la región 3' del gen de la CP, la región 3' no codificante del genoma viral y parte del tracto de poli(A). Las 200 pares de bases restantes de la región 5' del gen de la cápside viral se secuenciaron luego de subclonar el fragmento *Eco* RV-*Hind* III, liberado del clon pSM8, en el vector M13 mp18, digerido con las enzimas *Hind* III y *Sma* I. La secuencia obtenida se pudo superponer con el extremo 5' de la anterior, completándose así la secuencia del gen de la CP y los últimos 51 nt de la replicasa viral, incluyendo los codones que codifican el sitio de clivaje entre ambas proteínas. La secuencia obtenida a partir del clon pSM21 y los subclones deletados correspondía al gen completo de la CP y a 300 pb de la región 3' no codificante. El extremo faltante de esta región se completó con la secuencia parcial obtenida a partir de ADN de cadena doble del clon pSM10, que incluye la región 3' no codificante y parte del tracto de poli(A). La estrategia completa utilizada para la secuenciación del gen de la cápside del PepSMV se resume en el esquema de la Fig. 6.9. La Fig. 6.10 muestra la secuencia obtenida de 1329 nt, comprendiendo la región 3' del gen de la Nib, el gen de la CP y la región 3' no codificante. El gen que codifica para la CP presenta un 72% de homología respecto de la secuencia correspondiente del PVY° (Bravo-Almonacid y Mentaberry, 1989) y presenta 6 bases más en la región 5'. La región 3' no codificante consta de 468 nt, mientras que la correspondiente al PVY° mide 327 nt. La homología entre ambas regiones 3' no codificantes es de 59%. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de esta secuencia mostró un 80% de homología con la de la CP del PVY°, un 60% con la de la cepa no transmisible por áfidos del TEV (TEV-NAT, Allison *et al.*, 1985) y un 54% con la del TVMV (Domier *et al.*, 1986, Fig. 6.11).

De acuerdo con lo reportado por Feldman y Gracia (1977) el aislado S-163 del PepSMV, utilizado para clonar y secuenciar el gen de la CP, no es transmisible por áfidos. Esto es congruente con la ausencia de la secuencia "DAG" en la región amino terminal de la CP (Fig. 6.11).

FIGURA 6.9: Esquema de la estrategia de secuenciación de la CP de PepSMV. Las barras gruesas representan los clones originales y las barras delgadas representan los subclones obtenidos por delección. Las flechas indican la zona secuenciada de cada clon ("+" y "-": ubicación de las regiones de unión a los *primers* de secuenciación + y - persentes en el vector; "stop": codón de terminación de la CP; "sc": sitio de clivaje por la proteasa NIa).

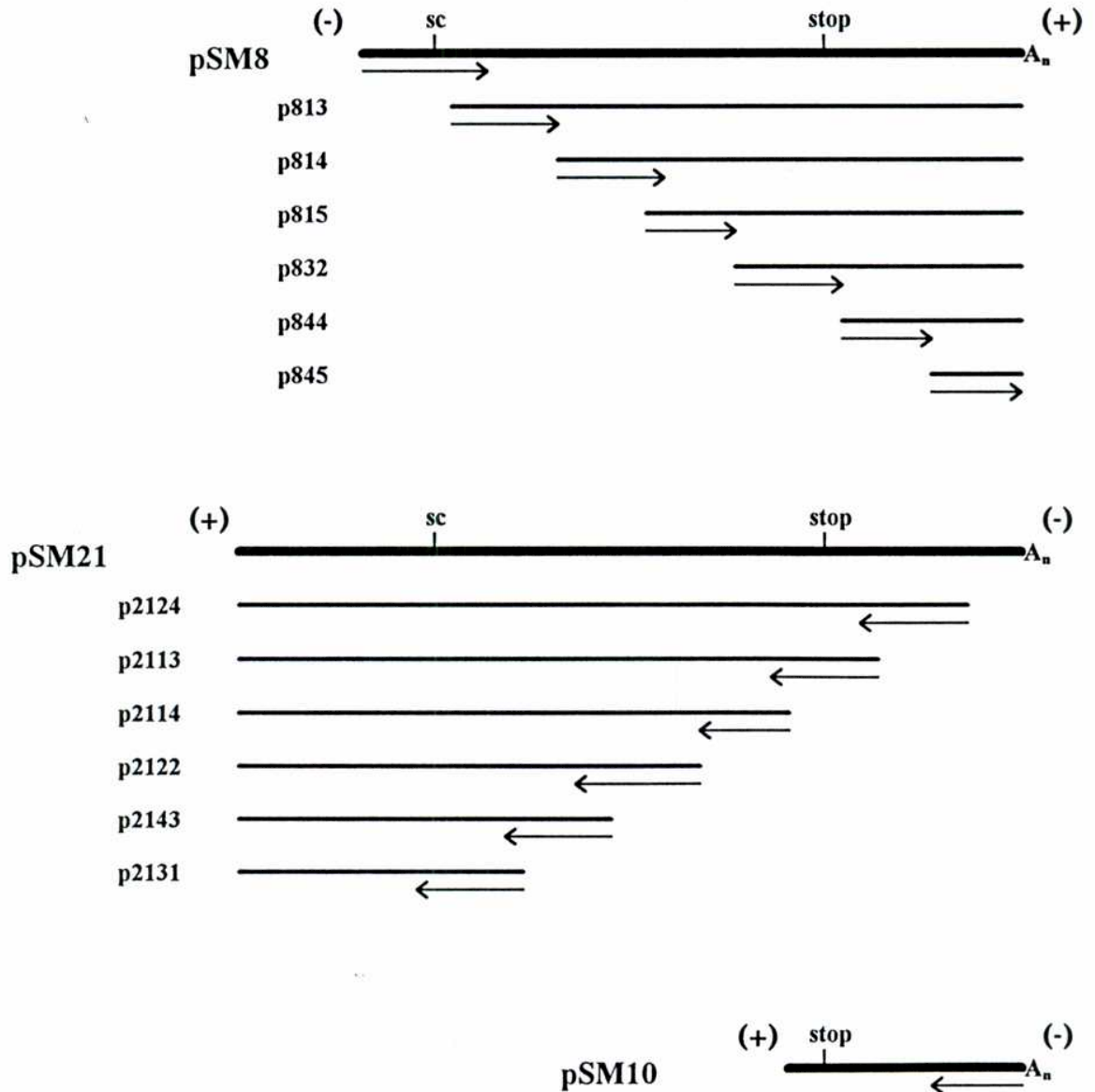


FIGURA 6.10: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región 3' del genoma de PepSMV. Las diferencias de la secuencia de nucleótidos con la correspondiente secuencia de PVY^o se señalan en la línea superior. La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de PepSMV se muestra en la línea inferior. El sitio consenso de clivaje por la NIa y el sitio mutado de transmisión por áfidos están subrayados. El codón de terminación se señala con asteriscos. Los guiones indican los 6 nucleótidos ausentes en la secuencia de PVY^o.

```

      C CAU A U      GU      G UCGACU U      G GC C U      AA GAU AA
1  GUGGAGCUUGACGAUGAACUUGAAUGUUGUCCAUUGAAGUUUAUCACCAAGCUGAUACAACUGUU
  V E L D D E L E C C P Y E V Y H Q /A D T T V

      A G GGAA C CA G A AUGCAAACCAG GCAA GC GCA AC GUCAAACCU AGU
67 GAUGCUGAAAAGGAAAAAGAAAAGGCGAGUUCUGGUAUUUAAGAAAGUUAAGGGUCGUCGUCA
  D A E K E K E K A S S G K L K K V E G S S S

      A G GA----- AA      A      U UU C AUCU G A U      G G GA A
133 GACGUGAAAGCAACUGAUUAGGAUGUGAACGCCGGAACUAUCGGAACCCACACUAUCCUCGGAUC
  D V K A T D K D V N A G T I G T H T I P R I

      U C UCC      AA      C G AGC G AGUAG C GC C CU A A
199 AAGGCGAUUACGGGGAAAAUGAGGCUGCCUAAAUCUAAAGGGAAGACUGCUUUGAAUCUGGAUCAC
  K A I T G K M R L P K S K G K T A L N L D H

      U CU      A U C C A U      G      A G
265 UUGCUCGAGUACGAACCACAACAGAUAGAUUAUCUAACACUCGAGCAACUCAGUCACAAUUUGAU
  L L E Y E P Q Q I D I S N T R A T Q S Q F D

      G A G G G G GG UG      AGGAC AG G      A U G
331 ACAUGGUUUAAAGCAGUUCAAACAGCAUACGACAUACUGAAGAUGAAUGCCUACGGUCAUGAAU
  T W F K A V Q T A Y D I T E D E M P T V M N

      GC U      A A      G      U C C A U      U
397 GGAUUGAUGGUUUGGUGCAUUGAGAAUGGUACCUCACCAACAUAUAAUGGUGUAUGGGUGAUGAUG
  G L M V W C I E N G T S P N I N G V W V M M

      GA U      GU      C G G      A U U G U A A      CC U
463 GAUGGAGAAGAACAUAUCGAAUAUCCAUAUAAAACCAUCGUAGAAAACGCCAAGCCAACUUUCAGG
  D G E E Q I E Y P L K P I V E N A K P T F R

      A      A      C      A      G
529 CAGAUCAUUGGCACAUUUCUGAUGUUGCAGAAGCGUAUAUAGAGAUGCGCAACAAGAAGAACCA
  Q I M A H F S D V A E A Y I E M R N K K E P

      U      A UC      G      AA      A G      C
595 UACAUGCCACGAUAUGGUUUGAUUAGAAAUUCUACGGGAUGUUAUGUCUUGCACGCUAUGCAUUUGAC
  Y M P R Y G L I R N L R D V S L A R Y A F D

      U      GC      A A      GUG G UA G      G C C      GC
661 UUCUAUGAAAUAACAUCUCGUACACCGUCAAGAGCACGUGAAGCACAUUUCAAAUGAAAGCAGCA
  F Y E I T S R T P S R A R E A H I Q M K A A

      AU G A A CU AC C AC U C GU
727 GCGCUCAAGUCGGUGCAGACUAGGAUGUUUGGUCUGGAUGGUGCAUCAGUACACAAGAGGAGAAC
  A L K S V Q T R M F G L D G G I S T Q E E N

      C C      U U AAG      A GC A      UG
793 ACAGAGAGGCACACUACUGAGGAUGUGUCCCCGCAUAUGCAUACUCUGCUUUGGGUUAGAAACACA
  T E R H T T E D V S P H M H T L L G V R N T

      GA
859 UAGUGCUCGUCUCUCCUGACGAUUAUUAUCUAUAUGUAUGCAGUAUUUAGUAUGUUUUCUCCUG
  ***

925 UAUUACUUUUUAGUCAGUCUUUUUAAAUUUUAGCUAGUUAAGUGUUAGGUGAUCUGGGCAUUU
991 UGUCGUCAGGGUGACUGGCAUUUCUCUUUGUGUGUUGCAGUUUAGGUGACUUUGUGAUUUUGU
1057 CAUGAAGGUGACUCACUCUUUUAGAUUAAUUCUCUACACUACUACUAAGGUGUCUGGGGUGGU
1123 UCGGUGAUUUCGUACUCGAGGUGAACUCAAUACCAAGCAGUGAUUUGGGUGGCUUUGCGAUUUUG
1189 UCGUAGAGGUGAACUCAACUUCUGCUUUUUAUGUUUAUAGAUUCUCAUAAAAGUUCACAGUACUUG
1255 CCGUGAGUGUGGAAGUGUCCACGGGUGACGUAUGGAUUUCGUCUAUGCGGUAGCAGUAGGUUUUGA
1321 CUGAGAGAC (A)n

```

FIGURA 6.11: Comparación de las secuencias de aminoácidos de las CPs de tres *Potyvirus* con la de PepSMV. La secuencia consenso (y sus variantes no funcionales en TEV-NAT y PepSMV) para la transmisibilidad por áfidos está subrayada. Los aminoácidos conservados en las cuatro secuencias se muestran en negrita.

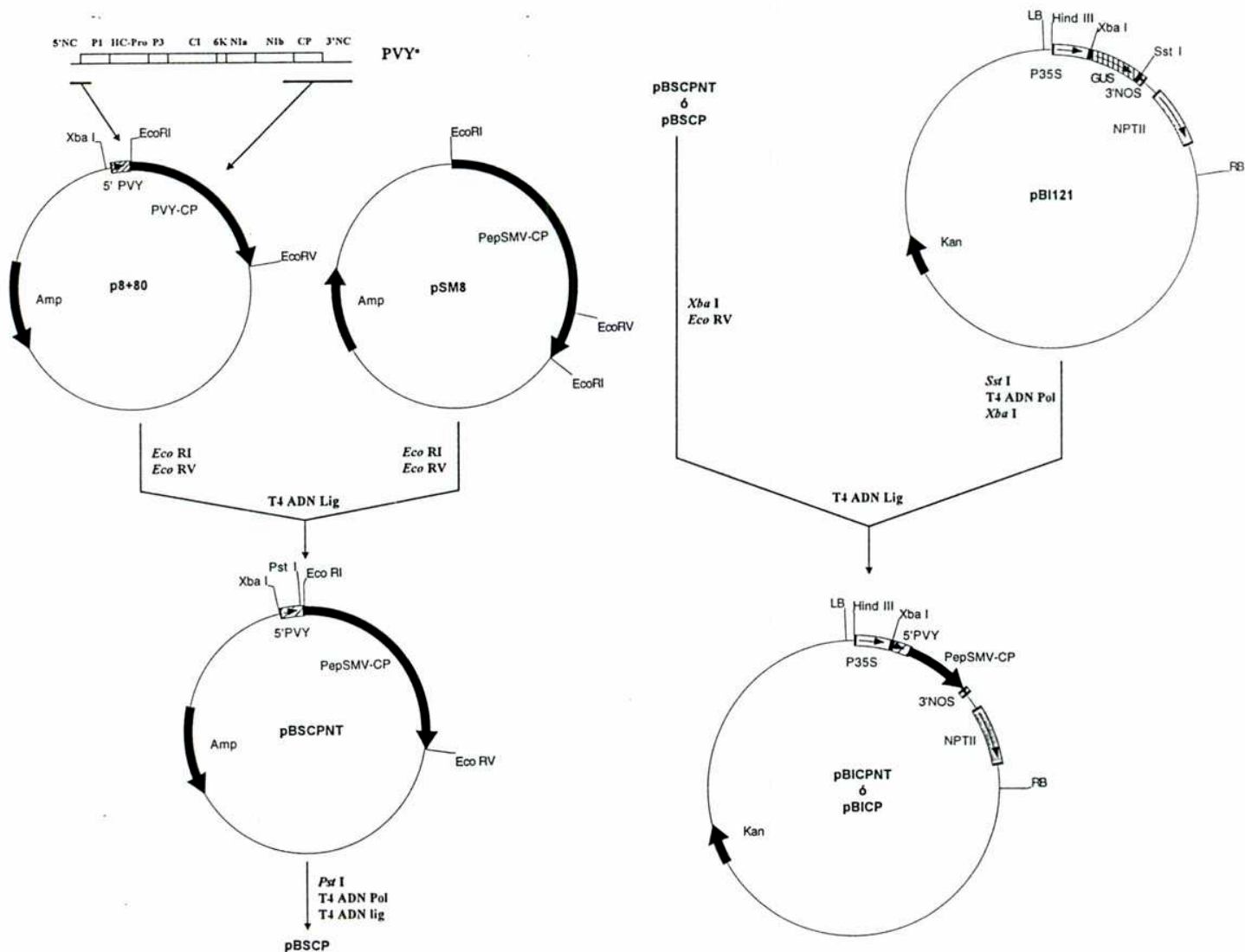
PepSMV	ADTTVD AEKEKE KASSGKLKKVEGSSSDVKATDKDVNAGTIGTHTIPRIK	50
PVY°	ANDTIDAGGNNKKDAKPEQSSIQSNLSKG--KDKDVNVGTSGTHTVPRIK	
TVMV	SDTV DAGKDK KARDQKLADKPTLAIDRT---KDKDVNTGTSGTFSIPRLK	
TEV-NAT	GGTV DASAD -VGKKKDQKDDKVAEQAS---KDRDVNAGTSGTFSVPRIN	
PepSMV	AITGKMRLPKSKGKTALNLDHLLLEYEPQQIDISNTRATQSQFDTWFKAVQ	100
PVY°	AITSKMRMPRSKGVAALNLEHLLLEYAQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVR	
TVMV	KAAMNMKLPKVGSSVVNLDHLLTYKPAQEFVVNTRATHSQFKAWHTNVM	
TEV-NAT	AMATKLQYPRMKGEVVVNLNHLGYPQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVM	
PepSMV	TAYDITEDEMP TVMNGLMVWCIENGTSPNINGVWVMMDGEEQIEYPLKPI	150
PVY°	MAYDIGQTEMP TVMNGLMVWCIENGTSPNINGVWVMMDGNEQVEYPLKPI	
TVMV	AELELNEEQMKIVLNGFMIWCIENGTSPNISGVWTMMDGDEQVEYPIEPM	
TEV-NAT	TAYGVNEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMMDGEEQVSYPLKPM	
PepSMV	VENAKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDVSLARY	200
PVY°	VENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARY	
TVMV	VKHANPSLRQIMKHFSNLAEAYIRMRNSEQVYIPRYGLQRGLVDRNLAPF	
TEV-NAT	IENAQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYPYMPRYGLQRNITDMSLSRY	
PepSMV	AFDFYEITSRTPSRAREAHIQMKAALKSVQTRMFGLDGGISTQEENTER	250
PVY°	AFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGISTQEENTER	
TVMV	AFDFFEVNGATPVRAREAHAQMKAAGRTPQFAAAMFCLDGSVSGQEENTER	
TEV-NAT	AFDFYELTSKTPVRAREAHMQMKA AVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTER	
PepSMV	HTTEDVSPHMHTLLGVRNT	269
PVY°	HTTEDVSPSMHTLLGGKNM	
TVMV	HTVDDVNAQMHHLLGVKGV	
TEV-NAT	HTAHDVNRNMHTLLGVRQ	

6.2 Construcción de genes quiméricos de la proteína de cubierta del PepSMV para ser expresados en plantas

Se diseñaron dos genes quiméricos para su expresión en plantas, con el objeto de obtener resistencia derivada del patógeno. Uno de ellos corresponde al gen de la CP del PepSMV. El otro gen es similar pero presenta un corrimiento en la fase de lectura de manera de producir un ARNm no traducible. Como se mencionó con anterioridad, ambas estrategias probaron ser eficientes en otros sistemas virus-huésped.

El plásmido p8+80 (ver "Materiales y Métodos") se digirió con *Eco* RI y *Eco* RV para liberar el fragmento correspondiente al gen de la proteína CP del PVY. Este gen se reemplazó por un fragmento del clon pSM8, obtenido por digestión con las mismas enzimas. Este fragmento de ADNc de PepSMV contiene la región 3' del gen de la Nib, el gen de la CP y parte de la región 3' no codificante del genoma (Fig. 6.12). De esta manera, se obtuvo el plásmido pBSCPNT que contiene el gen de la CP de PepSMV río abajo del codón de iniciación de la P1 del PVY. La estrategia de restricción y ligación utilizada para obtener al plásmido pBSCPNT, dio como resultado que el codón de iniciación del PVY quedara en un marco de lectura distinto del correspondiente a la porción 3' del gen de la Nib y al gen de la CP del PepSMV. Debido a la presencia de un codón de terminación en uno de los dos marcos de lectura no codificantes del gen de la Nib del PepSMV, la expresión de este gen quimérico en la planta produciría un ARNm que se traduciría como un péptido de 18 aminoácidos. Este desfasaje en el marco de lectura fue corregido deletando 4 pares de nucleótidos mediante un tratamiento con *Pst* I, ADN polimerasa T4 y ADN ligasa T4, obteniéndose el plásmido pBSCP. Esta construcción, al ser expresada en plantas, produciría una proteína compuesta por la fusión de los primeros aminoácidos de la P1 del PVY, la región carboxilo terminal de la Nib del PepSMV y la CP del mismo virus. Las uniones entre la secuencia 5' del PVY y la del PepSMV en pBSCPNT y en pBSCP fueron verificadas por secuenciación. Ambos genes quiméricos fueron subclonados en el plásmido de expresión para plantas pBI121 (Jefferson, 1987) tratado sucesivamente con *Sst* I, ADN

FIGURA 6.12: Esquema de la construcción de los plásmidos utilizados en la transformación de plantas (no a escala). El p8+80 aportó el codón de iniciación de la P1 de PVY^o que se colocó en fase (pBSCP) y fuera de fase (pBSCPNT) con el gen de la CP de PepSMV. Ambos *cassettes* se insertaron en el pBI121 (reemplazando al gen *uid A*) bajo la dirección del promotor 35S de CaMV (pBICP y PBICPNT). El plásmido pBIPVY es similar al pBICP pero contiene la región 3' del gen de la Nib, el gen de la CP y la región 3' no codificante de PVY^o.



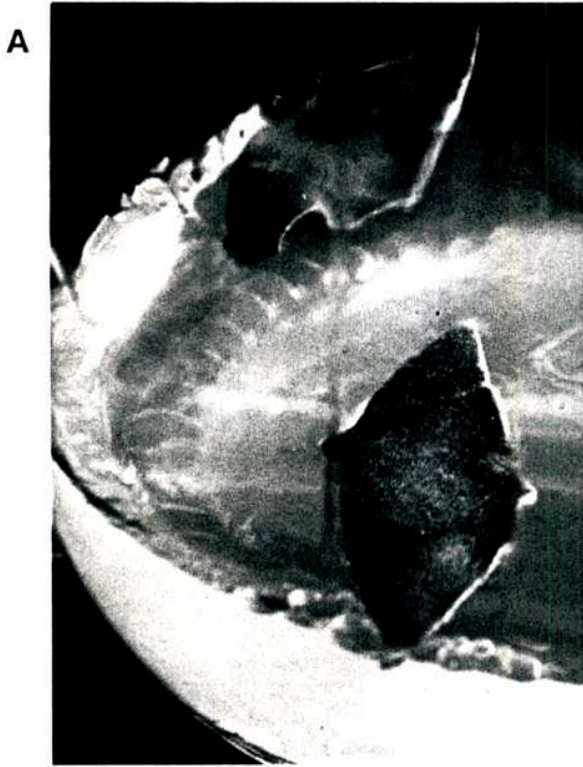
polimerasa T4 y *Xba* I, de manera de dejar un extremo cohesivo y otro romo y de liberar al gen de la β -glucuronidasa. En este vector se subclonaron los fragmentos de ADNc de pBSCP y pBSCPNT obtenidos por digestión con *Eco* RV y *Xba* I, obteniéndose los plásmidos pBICP y pBICPNT. De esta manera, las secuencias de ADNc viral quedaron bajo el control del promotor del transcripto de 35 S del CaMV.

6.3 Transformación de plantas de tabaco

Debido a que el pimiento ha resultado ser una especie recalcitrante a distintas técnicas de regeneración, se decidió ensayar la eficacia de los genes quiméricos construidos transformando plantas de tabaco. Al igual que el pimiento, el tabaco pertenece a la familia de las solanáceas, por lo que si las construcciones fuesen efectivas en esta planta, podrían ser transferidas al pimiento cuando estuvieran definidas las condiciones para su regeneración y transformación. La Lic. Florencia Rodríguez ha iniciado estudios en nuestro laboratorio sobre la regeneración y transformación del pimiento. Al respecto, los resultados más promisorios se obtuvieron utilizando explantos derivados de cotiledones, con los que, hasta el momento, se logró inducir la formación de hojas en roseta de las cuales no se logró regenerar plantas enteras. Los intentos por reproducir trabajos en los que se reporta la regeneración de *Capsicum annuum* no fueron exitosos (Yu-wen *et al.*, 1991; Arroyo y Revilla, 1991).

Los plásmidos pBICP, pBICPNT, pBIPVY y pBI121 se introdujeron en *A. tumefaciens* por electroporación. La identidad de los clones transformados se confirmó por análisis de restricción de los plásmidos purificados a partir de colonias de *Agrobacterium* que crecieron en medio de cultivo suplementado con gentamicina, rifampicina y kanamicina. Los clones seleccionados se utilizaron para efectuar ensayos de transformación de discos de hojas de tabaco mediante la técnica de cocultivo. Dado que los plásmidos usados son derivados del pBI121, todos ellos llevan como marcador selectivo para plantas el gen *npt II*, que confiere resistencia a kanamicina. Por este motivo, la formación de tallos por organogénesis directa se

FIGURA 6.13: A) Explantos de hoja de tabaco cocultivos con *A. tumefaciens*. B) Callos en formación en explantos de hoja de tabaco en medio de cultivo con hormonas para la organogénesis directa. C) Tallos resistentes a kanamicina, regenerados a partir de explantos cocultivos con *A. tumefaciens*. D) Planta resistente a kanamicina enraizada en medio sin hormonas.



indujo en medio suplementado con kanamicina (Fig. 6.13). Los tallos desarrollados en presencia de kanamicina se cortaron a los 15 días y se colocaron en medio de cultivo desprovisto de hormonas para inducir la formación de raíces. Se transplantaron aproximadamente 50 a 100 tallos provenientes de cada uno de los 4 ensayos de transformación (correspondientes a cada gen quimérico). De aquí en más las plántulas obtenidas se micropropagaron en presencia del agente selectivo.

Con el objeto de verificar la efectividad del ensayo de transformación, se realizó un análisis histoquímico de actividad de β -glucuronidasa. Para ello, se seleccionaron plantas obtenidas a partir de discos foliares cocultivados con agrobacterias portadoras del plásmido pBI121, utilizando como controles negativos plantas no transformadas o portadoras de los genes quiméricos pBICPNT y pBICP. La Fig. 6.14 muestra que 16 de 20 plantas regeneradas a partir de discos cocultivados con bacterias portadoras del pBI121, desarrollaron coloración azul, mientras que las plantas transformadas con genes virales quiméricos o plantas no transformadas resultaron negativas para este ensayo.

Seguidamente, en las plantas transformadas con los genes virales se constató la presencia del gen de resistencia a la kanamicina mediante un ensayo bioquímico de actividad de NPT II. Los resultados correspondientes a 42 plantas se observan en la Fig. 6.15. Todas las plantas ensayadas dieron una señal positiva. Una planta no transformada, utilizada como control negativo, no desarrolló señal.

Para verificar la presencia de los transgenes quiméricos en las plantas regeneradas se realizó un ensayo de *Southern-blot*. Se purificó ADN genómico de 4 plantas transformadas con pBICP y de 4 plantas transformadas con pBICPNT y se digirió con *Eco* RI. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa de 0,7%, se transfirieron a una membrana de *nylon* y se hibridaron con un fragmento de ADNc del gen de la CP de PepSMV marcado con [32 P]. Paralelamente, se hizo un ensayo similar con 5 plantas transformadas con pBIPVY y se hibridó con una sonda conteniendo secuencias del gen de la CP de PVY. La autorradiografía obtenida en este ensayo se muestra en la Fig. 6.16, donde se observa la banda esperada de 1290 pb, correspondiente al fragmento *Eco* RI presente en ambas construcciones de PepSMV y la

FIGURA 6.14: Ensayo de actividad de β -glucuronidasa. Las tres filas superiores corresponden a fragmentos de hojas de plantas transformadas con el pBI121. La fila inferior corresponde a dos plantas no transformadas (izquierda) y a dos plantas transformadas con una de las construcciones virales (derecha).

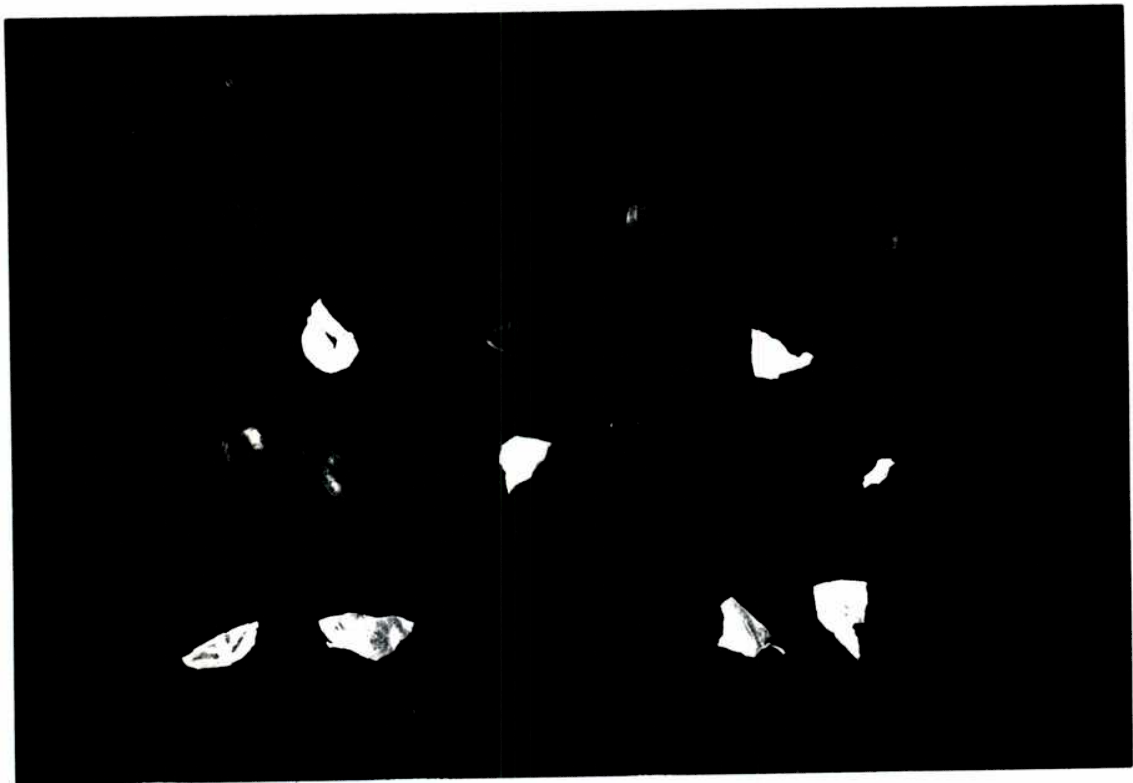


FIGURA 6.15: Ensayo bioquímico de actividad de neomicina fosfotransferasa. En las posiciones A1, A7, E6, F6, G6 y G7 no se sembró muestra. En la posición D6 se sembró el control de tabaco no transgénico.

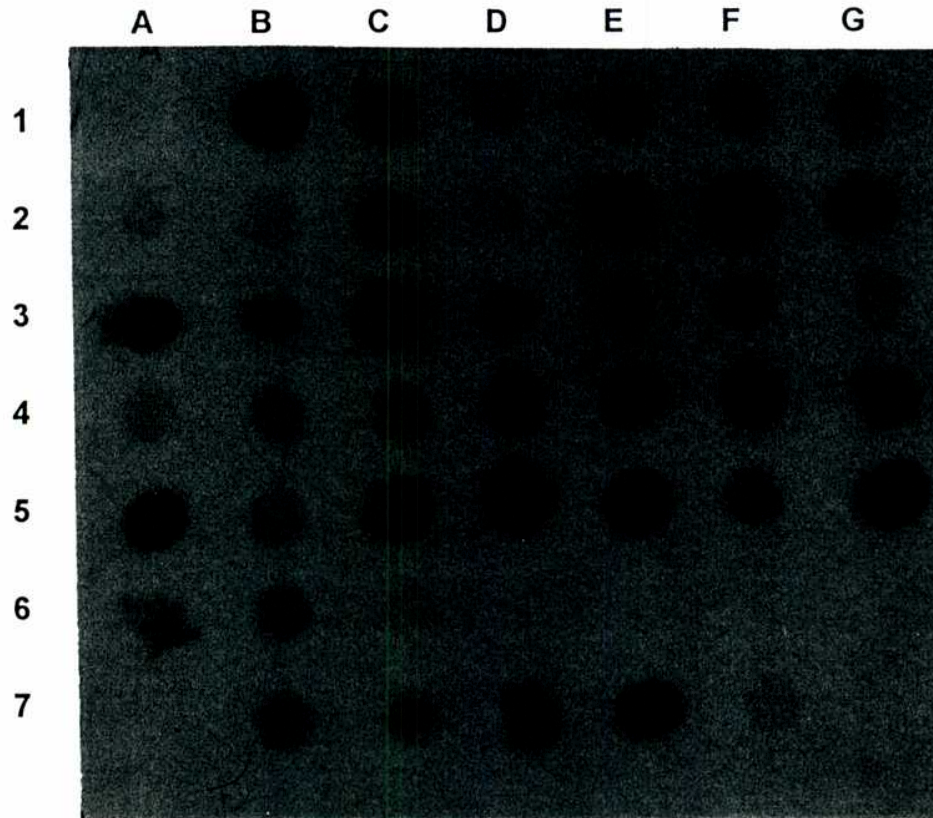
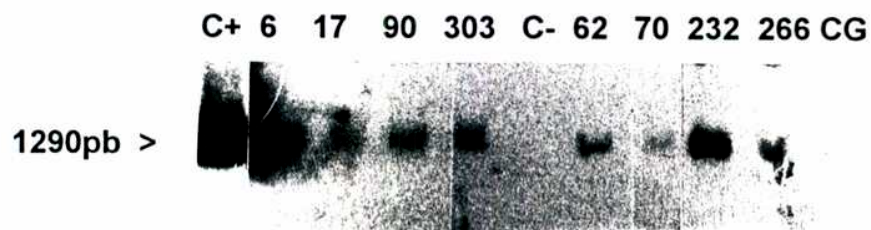
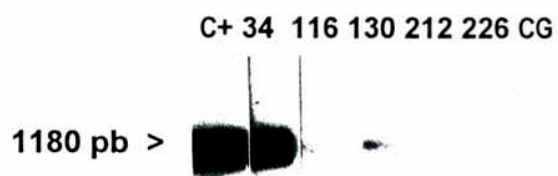


FIGURA 6.16: *Southern-blot* de ADN de plantas transformadas digerido con *Eco* RI. A) Sonda de ADNc de la CP de PepSMV. C+: pBICPNT digerido con *Eco* RI; C-: ADN de plantas no transgénicas; CG: ADN de plantas transformadas con pBI121; 6, 17, 90, y 303: líneas transformadas con pBICPNT; 62, 70, 232, 266: diferentes líneas transformadas con pBICP B) Sonda de ADNc de PVY°. C+: pBIPVY digerido con *Eco* RI; 34, 116, 130, 212 y 226: diferentes líneas transformadas con pBIPVY.

A



B



banda de 1180 pb, correspondiente al fragmento *Eco* RI de la construcción pBIPVY. Como controles negativos, se usaron preparaciones de ADN de plantas de tabaco no transformadas y de plantas de tabaco transformadas con pBI121, que contiene el gen de la β -glucuronidasa en lugar de las secuencias virales. Los plásmidos pBICPNT y pBIPVY, digeridos con la misma enzima, se usaron como controles positivos.

Con el objeto de estudiar la expresión de los transgenes en las plantas obtenidas se realizó un ensayo de *Northern-blot*. Se purificó ARN total de 4 plantas transgénicas para la construcción pBICPNT y de 3 plantas transgénicas para la construcción pBICP (Fig. 6.17 A), como así también de 4 plantas transformadas con la construcción pBIPVY (Fig. 6.17 B). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa/formaldehído y se transfirieron a sendas membranas de *nylon* que se hibridaron, respectivamente, con las mismas sondas usadas en el ensayo de *Southern-blot*. Como control negativo se utilizó ARN total de plantas no transformadas.

6.4 Ensayos para evaluar el nivel de resistencia antiviral

Con el objeto de realizar una selección primaria de las plantas transgénicas obtenidas se realizó un ensayo de infección con virus. Las plantas transformadas con secuencias derivadas del PepSMV se infectaron con este virus y las plantas transgénicas para el gen de la CP del PVY se infectaron con este último. Varias líneas de plantas transgénicas transformadas con las construcciones mencionadas anteriormente se mantuvieron *in vitro* en medio de cultivo conteniendo kanamicina. Doce líneas de plantas transgénicas para la construcción pBICPNT (6, 17, 18, 79, 82, 85, 90, 91, 189, 289, 298 y 303, que expresarían un transcrito no traducible del gen de la CP de PepSMV), 13 líneas de plantas transgénicas para la construcción pBICP (22, 26, 57, 62, 70, 77, 146, 149, 156, 232, 235, 266, 286, que expresarían la CP de PepSMV) y 12 líneas de plantas transgénicas para la construcción pBIPVY (34, 113, 116, 117, 120, 128, 130, 134, 205, 212, 221 y 226, que expresarían la CP de PVY) se seleccionaron para realizar un ensayo de resistencia antiviral en condiciones de

FIGURA 6.17: *Northern-blot* de ARN de plantas transgénicas. A) Sonda de ADNc del gen de la CP de PepSMV. C-: ARN de plantas no transgénicas; 6, 17, 90 y 303: líneas de plantas transgénicas para pBICPNT; 62, 70 y 232: líneas de plantas transgénicas para pBICP. B) Sonda de ADNc del gen de la CP de PVY. 34, 116, 130 y 226: líneas transgénicas para pBIPVY.

A

C- 6 17 90 303 62 70 232



B

34 116 130 226 C-

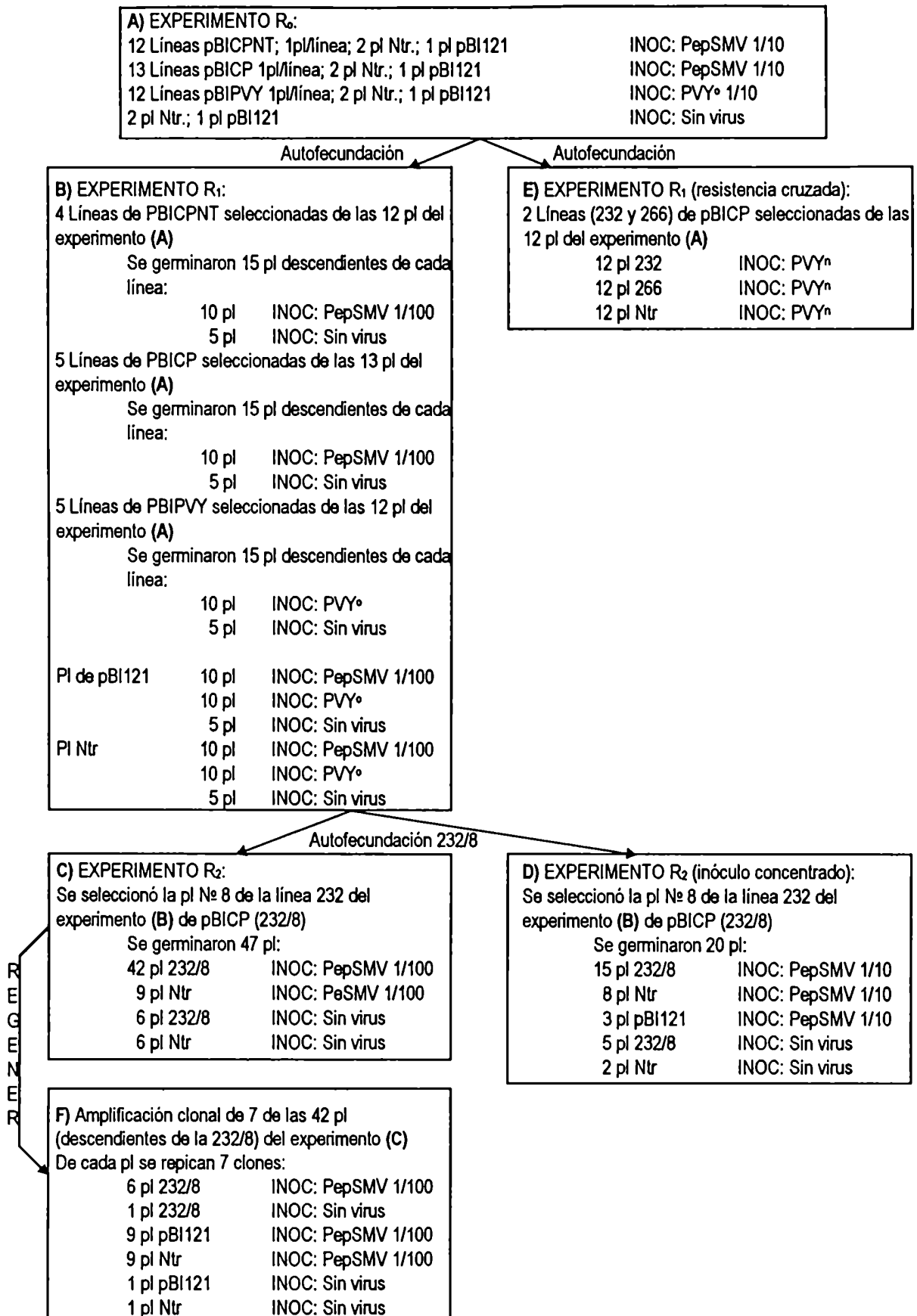


invernadero (Fig. 6.18 A). Una planta de cada línea, representando a la generación R_0 , se transfirió a maceta y se sometió a un ensayo de infección mecánica luego de ser rusticada. Como inóculo se utilizó una dilución al décimo en *buffer* fosfato de un extracto crudo de plantas infectadas con PVY° o PepSMV, respectivamente. Se utilizaron 2 plantas de tabaco no transgénico y 1 planta transformada con el gen de la β -glucuronidasa como controles de infección para cada uno de los virus. Paralelamente, se inocularon con *buffer* 2 plantas de tabaco no transgénicas y 1 planta transformada con el gen de la β -glucuronidasa. Las plantas se infectaron mecánicamente usando carborundum y se observaron síntomas cada 10 días hasta los 30 días postinoculación (dpi).

La planta correspondiente a la línea 232, transformada con la construcción pBICP, mostró ausencia de síntomas hasta los 30 dpi con PepSMV. Dado que la concentración de virus presente en el inóculo utilizado no fue determinada, era posible que ésta hubiera sido demasiado alta y en las otras líneas hubiera sobrepasado el posible umbral a partir del cual el virus puede replicarse, aún en presencia del mecanismo de resistencia. Para determinar la máxima dilución de inóculo capaz de producir infección, se realizó una curva de diluciones de extracto de plantas infectadas con PepSMV o con PVY y se cuantificó por ELISA el nivel de infección. Se hicieron diluciones del extracto de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en *buffer* fosfato. Con cada una de ellas se infectaron 2 plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi no transgénicas para determinar la máxima dilución de inóculo capaz de producir un 100% de infección. Dicha dilución resultó ser de 10^{-2} tanto para PepSMV como para PVY. Esto se acerca más a las condiciones naturales, si se tiene en cuenta que los virus son transmitidos de planta a planta en cantidades inferiores en varios órdenes de magnitud a las usadas en inoculaciones mecánicas artificiales. Por estos motivos, en los siguientes ensayos de infección se mantuvo esa dilución de inóculo, excepto en el experimento de la Fig. 6.18 D.

Dado que, al igual que la mayoría de los miembros del género *Potyvirus*, el PepSMV no es transmisible por semilla (Mink, 1993; Hollings y Brunt, 1982; Gracia, resultados no publicados), las plantas infectadas se mantuvieron en el invernadero hasta su floración y las

FIGURA 6.18: Síntesis de los ensayos de infección realizados con las diferentes generaciones de plantas transgénicas (ver el texto para más detalles). Ntr: no transgénica; pl: planta; INOC: inóculo.



semillas se recolectaron para usarlas en nuevos ensayos de infección. Las semillas de las plantas R_0 se obtuvieron por autofecundación, proceso en el que los transgenes pueden segregarse, razón por la cual fue necesario seleccionar las semillas que hubieran heredado el transgen. Como en el ADN-T el gen de resistencia a kanamicina se encuentra ligado al gen de la CP viral, fue posible seleccionar las semillas portadoras de este último mediante la germinación *in vitro* en presencia de este agente selectivo. Se realizó una curva de sensibilidad a la kanamicina para definir la concentración óptima de antibiótico que permitía la selección de plantas transgénicas. Para esto, se esterilizaron superficialmente semillas de tabaco no transgénico y semillas de la línea 227, transformada con el plásmido pBI121 y se sembraron en medio MS conteniendo 0, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. La Fig. 6.19 A muestra el crecimiento de las plantas dos semanas después de la germinación, en medio sin agente selectivo y en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Luego de 2 semanas de germinadas, se observa que, en presencia del antibiótico, las plántulas no transgénicas no se desarrollan más allá de la separación de sus cotiledones, mientras que en ausencia de selección las plantas comienzan a expandir su primer par de hojas. En el caso de las semillas de la línea transgénica sometidas a selección, se observaron plantas normalmente desarrolladas, y otras que se comportaron como las no transgénicas. Las concentraciones menores de kanamicina en estos ensayos de selección no fueron eficientes para diferenciar el crecimiento de plantas transgénicas de las que hubieran perdido el transgen por segregación. Para confirmar que la actividad del gen de resistencia a la kanamicina se correlaciona con la actividad del segundo transgen, se germinaron semillas de la línea 227 en ausencia de selección y se las sometió a un ensayo histoquímico de actividad de β -glucuronidasa. La Fig. 6.19 B muestra que la proporción de plantas azules a blancas es similar a la proporción de plantas resistentes a sensibles. Esta fue aproximadamente de 3 a 1, lo que evidencia que esta línea portaba una única copia de cada gen. Este ensayo evidencia que ambos genes están como copias únicas y es congruente con el hecho de que están ligados.

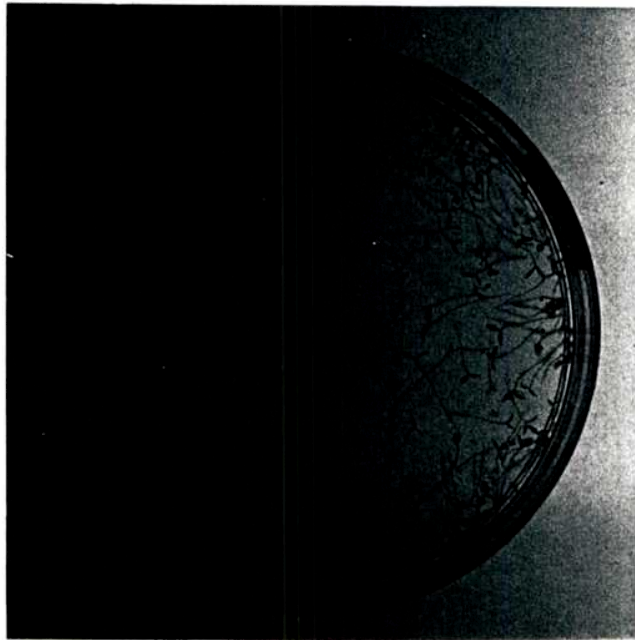
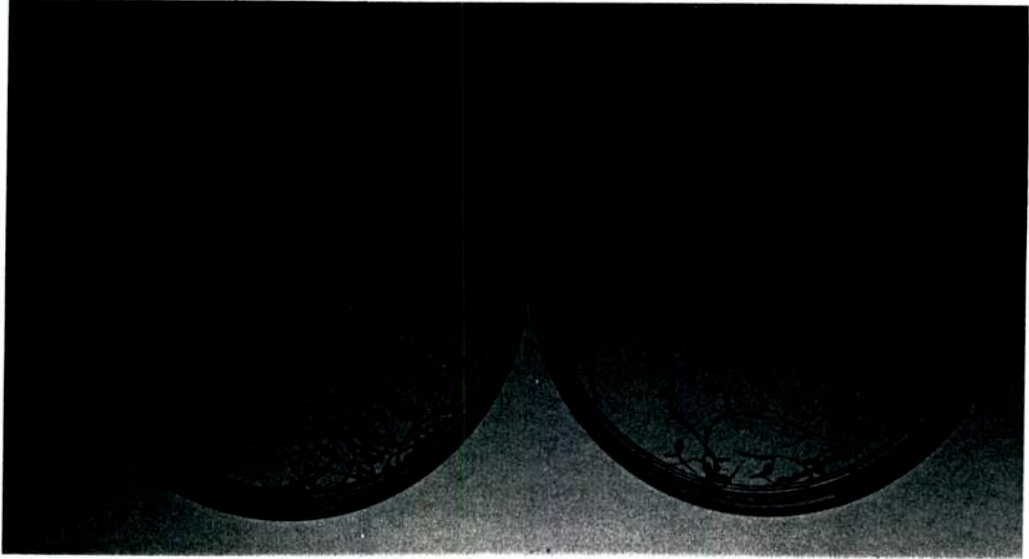
Una vez determinadas las condiciones para seleccionar la descendencia de las plantas analizadas inicialmente, se procedió a

FIGURA 6.19: A) Selección de plantas transgénicas por germinación en presencia de kanamicina. Arriba a la izquierda se observa el crecimiento normal de plántulas no transgénicas en ausencia de agente selectivo, y a la derecha se observan las mismas plantas en presencia 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Abajo se muestran plántulas descendientes de una planta transgénica. La flecha indica una plántula no desarrollada, presumiblemente porque perdió el transgen por segregación. B) Ensayo histoquímico de actividad β -glucuronidasa en plántulas descendientes de una planta transgénica para el gen de dicha enzima. Arriba se observan plántulas que heredaron el transgen (izquierda) y las que no lo heredaron (derecha). Abajo se observan plántulas descendientes de una planta no transgénica sometidas al mismo ensayo.

A



B



germinar las semillas que darían origen a la generación R₁. Cuatro líneas de plantas transgénicas para la construcción pBICPNT (17, 90, 189 y 303, que expresarían un transcripto no traducible del gen de la CP de PepSMV) y 5 líneas de plantas transgénicas para la construcción pBICP (62, 70, 146, 232 y 266, que expresarían la CP de PepSMV) se seleccionaron para realizar un ensayo de resistencia al PepSMV (Fig. 6.18 B). Por cada línea se eligieron 30 plántulas que exhibieran un desarrollo normal en presencia del agente selectivo y se transfirieron a tierra en el invernadero. Para realizar el ensayo de infección, se usaron por cada grupo, 15 plantas de entre las que se mantuvieron saludables durante el proceso de rusticación. De la misma manera, se hizo germinar un número igual de semillas de plantas de 2 líneas transformadas con el plásmido pBI121 que expresan el gen de la β -glucuronidasa. Además se germinó una cantidad igual de semillas de tabaco no transgénico en medio sin antibiótico y las plantas desarrolladas a partir de ellas se infectaron siguiendo el mismo esquema usado para el resto de las plantas.

De las 15 plantas rusticadas por cada una de las líneas transgénicas para secuencias del PepSMV, pBI121 y no transgénicas, diez plantas se inocularon con PepSMV y 5 plantas se inocularon con una dilución equivalente de extracto de plantas sanas, como control negativo de la infección. Un esquema similar se utilizó para inocular con PVY^o las líneas 34, 116, 130, 212 y 226 (transgénicas para secuencias de este virus, Fig. 6.18 B). En todos los casos el nivel de infección fue seguido observando la aparición de síntomas. El primer registro se realizó a los 10 dpi.

Entre las 5 líneas transgénicas para pBICP (que expresarían la CP de PepSMV), 5 de las 10 plantas correspondientes a la línea 232, no mostraron síntomas a los 10 dpi, mientras que las plantas no transgénicas o transgénicas para pBI121 mostraron síntomas en todas las plantas inoculadas con PepSMV (Tabla 6.I). A los 20 dpi sólo una de las plantas de esta línea (la 232/8) aún mostraba ausencia total de síntomas y continuó así hasta los 30 dpi. La planta 70/9 (transgénica para la misma construcción que la anterior) mostró aparición de mosaico recién a los 30 dpi.

Entre las 4 líneas transgénicas para la construcción pBICPNT (que expresan un ARNm no traducible correspondiente al gen de la CP

TABLA 6.I: Resultados de la observación de síntomas y de ensayos de ELISA de la generación R₁ de plantas transformadas con pBICPNT y pBICP inoculadas con PepSMV (NTr: no transformadas).

LINEA	Nº de plantas con síntomas/Nº de plantas inoculadas			ELISA 20 DPI
	10 DPI	20 DPI	30 DPI	
17 CPNT	8/10	10/10	10/10	10/10
90 CPNT	9/10	9/10	10/10	10/10
189 CPNT	10/10	10/10	10/10	10/10
303 CPNT	9/10	9/10	9/10	9/10
62 CP	10/10	10/10	10/10	10/10
70 CP	9/10	9/10	10/10	9/10
146 CP	10/10	10/10	10/10	10/10
232 CP	5/10	9/10	9/10	9/10
266 CP	10/10	10/10	10/10	10/10
NTr	10/10	10/10	10/10	10/10
GUS	10/10	10/10	10/10	10/10

de PepSMV) sólo una planta (la 303/7) se mantuvo asintomática hasta el final del experimento (30 dpi), mientras que la planta 90/8 mostró aclaramiento en las nervaduras recién a los 30 dpi (Tabla 6.I).

Todas las demás plantas inoculadas con PepSMV mostraron síntomas a los 10 dpi, y ninguno de los controles inoculados con extracto de plantas sanas mostró síntomas a lo largo del experimento.

En el caso de las plantas transformadas con el gen de la CP de PVY, que fueron inoculadas con PVYⁿ, no se observaron retrasos significativos en la aparición de síntomas. Los controles inoculados con extractos de plantas libres de virus, no mostraron síntomas.

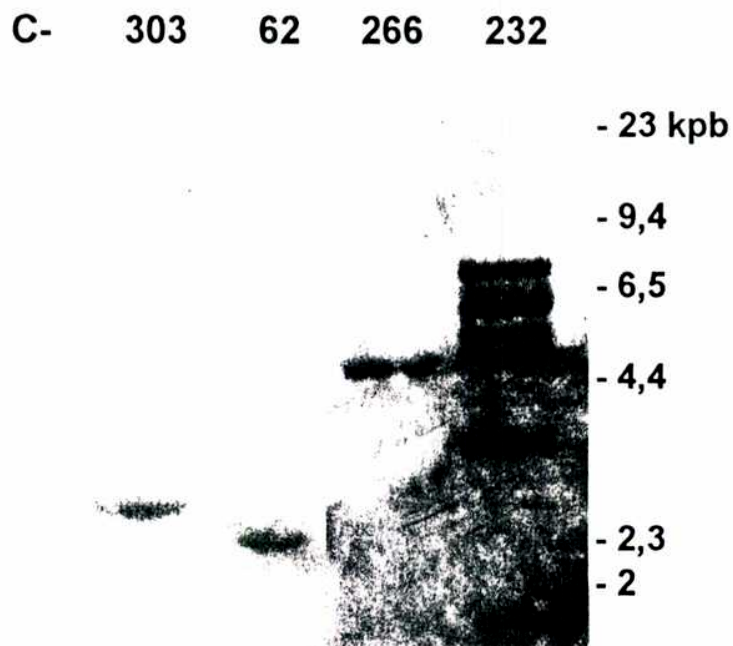
La presencia de virus en las plantas inoculadas se determinó también mediante la técnica de ELISA. Se tomaron muestras de todas las plantas antes de la inoculación y a los 20 dpi. A excepción de la línea 90, ninguna de las plantas que no presentaron síntomas a los 20 dpi, mostró presencia de virus en el ensayo de ELISA (Tabla 6.I).

Para evaluar si existía resistencia cruzada contra otra especie de *Potyvirus*, se realizó un ensayo de resistencia infectando con PVYⁿ (cepa necrótica) 12 plantas descendientes de la línea 232 y otras tantas descendientes de la línea 266 (Fig. 6.18 E). A los 15 dpi, 3 de las descendientes de la línea 266 y 1 de la 232 no presentaban síntomas, mientras ninguna de las 12 plantas no transgénicas escapó a la infección.

Para analizar el número de copias de los transgenes derivados de secuencias del PepSMV presentes en la generación R₀, se analizaron algunas líneas de plantas transgénicas por análisis de *Southern-blot*. Se utilizó la enzima de restricción *Hind* III, para la cual existe un único sitio de reconocimiento en el ADN-T (Fig. 6.12). Se utilizó una sonda de ADNc conteniendo secuencias del gen de la CP del PepSMV. De esta manera cada copia del transgen produce una única banda de hibridación. Se determinó así que la línea 232 poseía cinco copias del transgen, la 303 tenía 2 copias y el resto de las plantas estudiadas tenían una única copia del transgen (Fig. 6.20).

Debido a que la planta 232 fue la que mostró el mayor nivel de resistencia, se decidió analizar con más detalle la distribución de los transgenes en la generación R₁ para determinar si las diferencias observadas en el fenotipo de resistencia antiviral entre las 10 plantas

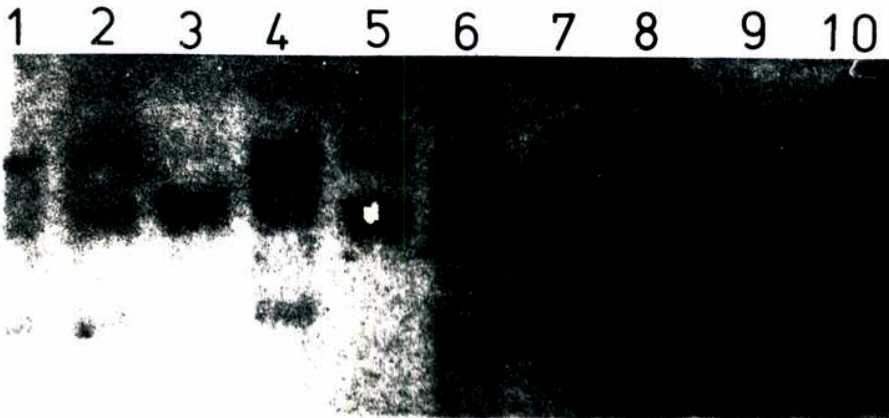
FIGURA 6.20: *Southern-blot* de ADN de plantas transformadas con pBICPNT (303) y con pBICP (62, 266 y 232), digerido con *Hind* III. La sonda utilizada fue ADNc de la CP de PepSMV.



hermanas descendientes de la línea 232 se correlacionaban con diferencias genéticas, como ocurre en los trabajos de Hobbs (Hobbs *et al.*, 1990; Hobbs *et al.*, 1993). Las plantas se analizaron mediante un ensayo de *Southern-blot* de características similares al anterior. Los resultados de este experimento, que se observan en la Fig. 6.21, no permiten establecer ninguna correlación entre el número de copias y el nivel de resistencia. Así por ejemplo, la 232/5 tiene sólo 3 copias y presenta demora de síntomas, mientras que la 232/1 tiene todas las copias y no muestra ningún fenotipo resistente. La 232/8 presenta sólo 4 de las copias del transgen. Tampoco fue posible identificar alguna copia del transgen asociada con la resistencia o la sensibilidad al virus.

La planta 232/8 (la número 8 de la R_1 de la línea 232), que había mostrado ausencia de síntomas hasta 30 dpi y era negativa en ensayos de ELISA hasta 20 dpi, se seleccionó para autofecundar y obtener la generación R_2 . Las semillas se hicieron germinar *in vitro* en presencia de kanamicina de la misma forma que la R_1 . Las plantas se crecieron *in vitro* hasta 5 semanas luego de la germinación, momento en que se transplantaron a tierra. De esta forma se transfirieron al invernadero 47 plantines transgénicos junto con 15 plantines de tabaco no transgénico (que se germinaron de la misma manera pero en ausencia del agente selectivo). Tres semanas después, 42 de las plantas transgénicas y 9 no transgénicas se infectaron mecánicamente con una dilución 1/100 de extracto de una planta de tabaco infectada con PepSMV. Paralelamente, 5 plantas transgénicas y 6 plantas no transgénicas se trataron de la misma forma pero se inocularon sólo con *buffer*. Se tomaron muestras para ensayos de ELISA antes de la infección, a los 7, 14, 21, 28, 45 y 84 dpi (Fig. 6.18 C). También se tomó una muestra de la hoja de tabaco infectada que se usó como inóculo. Los síntomas se observaron diariamente. Desde los 7 dpi, tanto en las plantas no infectadas como en las infectadas se desarrolló un moteado que no permitió distinguir la presencia de síntomas. Este moteado no se debía a la presencia de PepSMV, ya que se observaba también en las plantas inoculadas con *buffer* y los resultados de los ensayos de ELISA no se correlacionan con la presencia del mismo. A los 45 dpi el moteado desapareció y se hicieron evidentes los síntomas en todas las plantas no transgénicas

FIGURA 6.21: *Southern-blot* de ADN de las 10 plantas de la generación R_1 usadas en el ensayo de resistencia.



inoculadas con PepSMV. En contraste, ni las plantas inoculadas con *buffer* ni las plantas transgénicas mostraron síntomas a este tiempo. A los 52 dpi volvieron a aparecer síntomas en todas las plantas inoculadas con PepSMV. Los resultados de los ensayos de ELISA se muestran en la Fig. 6.22. Como puede observarse existe un retraso de aproximadamente una semana en la aparición del virus en las plantas transgénicas. Además, se puede observar un decaimiento en la concentración de virus en las plantas desde los 21 dpi, que alcanzó su máximo a los 45 dpi. A los 84 dpi ya no se observó diferencia entre la mayoría de las plantas transgénicas y los controles no transgénicos. En la Tabla 6.II se observan los resultados de los ensayos de ELISA para cada planta individual. Se puede observar que en algunas plantas como la 9 y la 20 no se detectó presencia de virus en ningún momento durante todo el transcurso del experimento. En otras, como la 12, 16 y 21 se detectó presencia de virus en todas las muestras a partir de los 14 dpi. En las plantas número 3, 39 y 58 los resultados del ELISA variaron en forma errática a lo largo del experimento. Junto con los ensayos de ELISA de las plantas transgénicas se incluyó una muestra de la planta usada como inóculo y se realizó una serie de diluciones de una preparación de viriones de PepSMV en extracto de una planta sana para estimar la concentración de inóculo utilizada. La concentración calculada para el inóculo utilizado fue de aproximadamente 1 µg/ml de virión.

Con el objeto de estudiar si el fenómeno de resistencia observado era dependiente de la concentración de virus utilizada en el inóculo, se realizó otro experimento con 15 plantas (descendientes de la planta 232/8) de la misma generación R₂, 8 plantas no transgénicas y 3 plantas transgénicas para el gen de la β-glucuronidasa, a las que se infectó con una dilución 1/10 (aproximadamente 10 µg/ml de viriones) de extracto de planta infectada. Como controles negativos se utilizaron 5 plantas transgénicas y 2 no transgénicas que se inocularon con *buffer* (Fig. 18 D). Todas las plantas inoculadas con PepSMV mostraron síntomas a los 10 dpi. Se tomaron muestras para ensayos de ELISA antes de la infección y luego cada 7 días hasta los 28 dpi. No fue posible continuar el experimento hasta los 84 dpi como el experimento anterior porque las plantas florecieron aproximadamente a los 35 dpi.

FIGURA 6.22: Porcentaje de plantas infectadas determinado en ensayo de ELISA en función del tiempo postinoculación. Se utilizaron 42 plantas R₂ (descendientes de la 232/8) inoculadas con una dilución 1/100 de extracto de plantas infectadas.

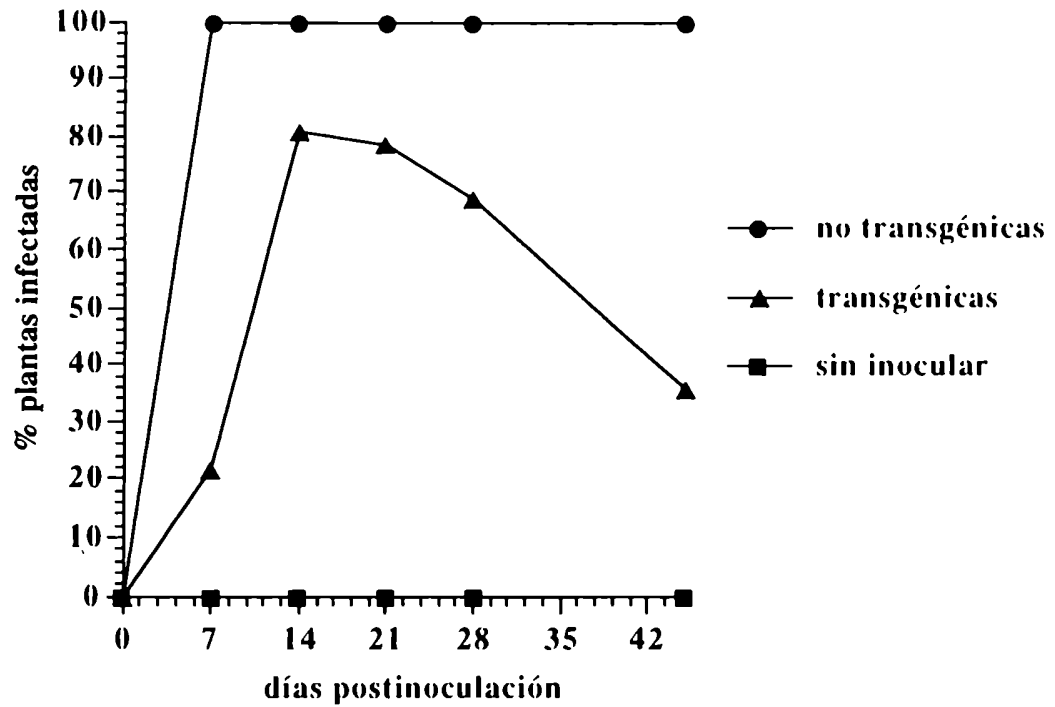


TABLA 6.II: Resultados de los ensayos de ELISA de la generación R₂ descendiente de la 232/8. Se muestran los resultados de cada planta individualmente. (NTr: no transgénica).

LINEA	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	45 dpi	84 dpi
1	-	-	+++	+++	++	+/-	+++
3	-	-	-	-	+++	-	-
4	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-
5	-	-	+++	+++	+	+	++
6	-	+++	++	-	+/-	+/-	+
7	-	-	+++	+/-	+++	+/-	++
8	-	-	+++	+++	++	+/-	++
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	++	+++	+	-	+++
11	-	-	+/-	+/-	+/-	-	+++
12	-	-	++	+++	+++	+/-	+++
14	-	-	+	+++	-	-	+++
15	-	-	-	-	-	-	+
16	-	-	++	++	+	+/-	+
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+++	+++	+	+/-	+++
22	-	-	++	+++	++	-	+++
23	-	-	-	-	-	-	+++
24	-	-	++	+++	++	-	+
26	-	+	+++	+++	-	+	+++
27	-	-	++	+++	-	-	++
28	-	-	+	+++	+/-	-	+++
29	-	-	++	+++	+++	+	+++
30	-	+	+	++	++	-	+++
31	-	-	-	+++	+/-	-	+++
33	-	+++	+++	++	-	-	+
34	-	-	+++	+++	+	-	++
38	-	+/-	+++	+++	+++	+/-	+++
39	-	-	+++	+	+	-	-
41	-	+	+++	+++	++	+++	++
42	-	++	+++	+++	+/-	-	+
43	-	+++	+++	+++	+	-	+++
44	-	+++	+++	+	-	+	+++
45	-	-	+++	+++	+	-	++
48	-	-	++	+	++	+	++
49	-	-	+++	+++	-	-	+++
53	-	-	+++	++	+/-	-	++
54	-	-	+++	-	+++	-	+++
55	-	-	-	-	-	-	+/-
56	-	-	+++	++	+/-	-	+
58	-	-	-	-	+++	-	-
59	-	+++	+++	+++	-	+/-	+/-

Tabla 6.II (continuación)

Controles:							
LINEA	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	45 dpi	84 dpi
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NTr	-	+++	+++	+++	+++	++	++
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	+
NTr	-	+++	+++	+++	+	+/-	+
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
NTr	-	+++	+++	++	++	++	+++
NTr	-	+++	+++	+++	+++	+++	+
inoculadas con <i>buffer</i> :							
61	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-
NTr	-	-	-	-	-	-	+/-
NTr	-	-	-	-	-	-	+/-
NTr	-	-	-	-	-	-	-
NTr	-	-	-	-	-	-	-
NTr	-	-	-	-	-	-	-
NTr	-	-	-	-	-	-	-

El resultado de los ensayos de ELISA (realizados recubriendo la placa con el extracto de plantas) se muestra en la Fig. 6.23. A los 14 dpi el 60% de las plantas transgénicas fueron positivas para el ensayo de ELISA, mientras que un 87% de las plantas control (no transgénicas o transgénicas para el gen de la β -glucuronidasa) mostraban presencia de virus.

Las plantas de la generación R_2 (que posteriormente se usaron en el experimento de la Fig. 6.18 C) desarrollaron cuatro hojas dos semanas después de la germinación *in vitro*. En ese momento se cortaron fragmentos de una hoja de cada planta y se colocaron en medio de regeneración con el objeto de hacer una amplificación clonal de cada planta. De las 47 líneas regeneradas por organogénesis somática, se seleccionaron 7 (líneas 4, 8, 9, 15, 20, 55 y 58). De cada una de ellas se cortaron 7 brotes y se colocaron en medio de enraizamiento para regenerar 7 plantas enteras de cada línea genéticamente idénticas entre sí. Paralelamente, se regeneraron 10 plantas no transgénicas y 10 plantas transgénicas para el gen de la β -glucuronidasa como controles negativos. Cuando enraizaron, se transplantaron a tierra y se colocaron en invernadero. Seis plantas de cada línea y 9 plantas de cada una de las dos líneas control se infectaron con una dilución 1/100 de extracto de plantas infectadas con PepSMV. Como control, se inoculó con *buffer* una planta de cada línea (Fig. 6.18 F). A los 6 dpi las líneas 4 y 58 no mostraban síntomas, mientras que todas las demás plantas inoculadas con PepSMV mostraban mosaico o aclaramiento de las nervaduras. La Tabla 6.III resume los resultados de las líneas 4 y 58, las que mostraron el mayor nivel de resistencia. Los controles no infectados no mostraban síntomas. A los 10 dpi en 2 plantas de la línea 4 y en 3 de la línea 58 apareció un leve mosaico (Fig. 6.24). A los 21 dpi la planta 4₄ (una de las dos plantas de la línea 4 que mostraba síntomas) parecía haberse recuperado ya que sus hojas superiores no mostraban síntomas. Dentro de la línea 58 sólo 2 plantas de las 6 continuaban sin síntomas. Las cuatro plantas de la línea 4 que no habían mostrado síntomas, continuaron así hasta los 29 dpi (último registro de síntomas). La planta 4₄ tampoco mostró síntomas en las hojas superiores. Los ensayos de ELISA correlacionaron con las observaciones de síntomas, aunque en varias de las plantas se observó una señal positiva, o débilmente positiva, en el ensayo de

FIGURA 6.23: Porcentaje de plantas infectadas detectadas por ensayos de ELISA en función del tiempo postinoculación. Se utilizaron 15 plantas R_2 inoculadas con una dilución 1/10 de extracto de plantas infectadas.

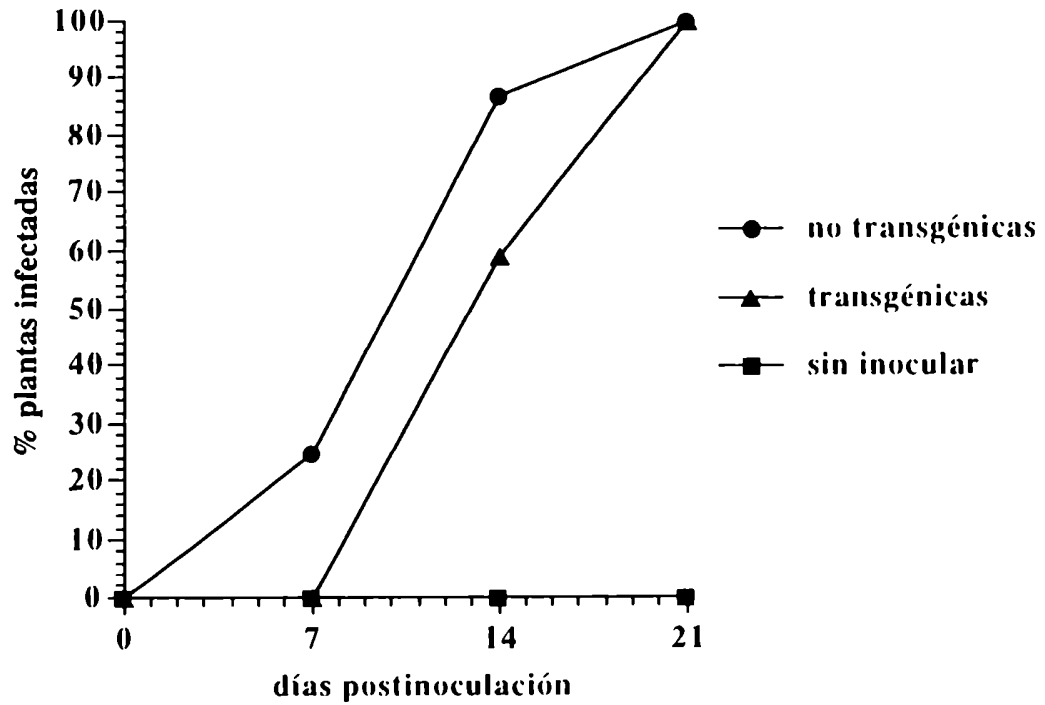


FIGURA 6.24: Resultados de la observación de síntomas de plantas regeneradas a partir de la línea 4 descendiente de la 232/8, inoculadas con PepSMV. A) Planta no transformada (NT). B) Planta 4₂ (resistente). C) Planta sin inocular (S/I). D) Planta 4₄ (sin síntomas en la parte superior de la planta). Se indican los días postinoculación a los que se analizaron los síntomas.

14 dpi

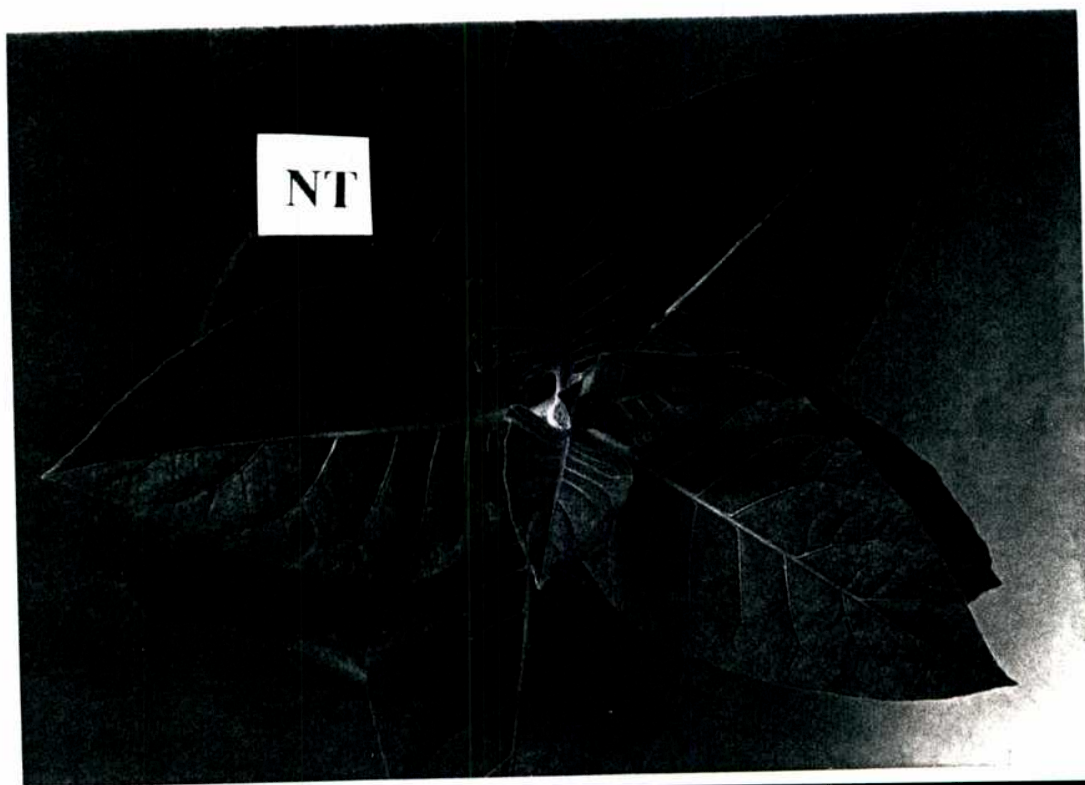


21 dpi



A

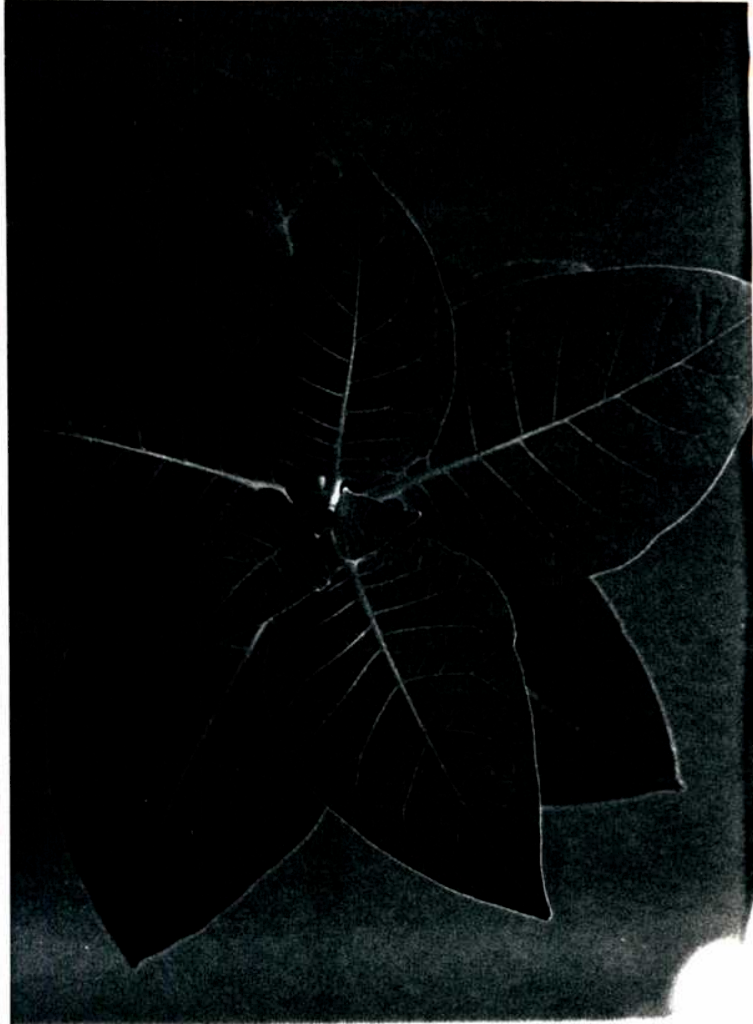
29 dpi



14 dpi

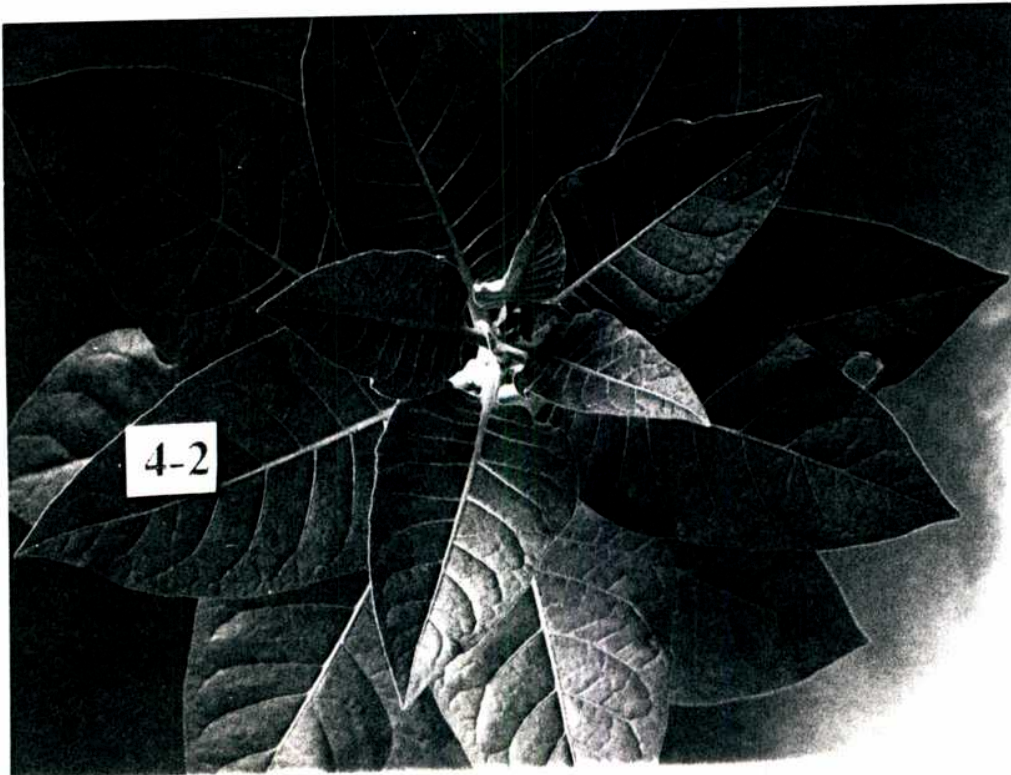


21 dpi



B

29 dpi



14 dpi

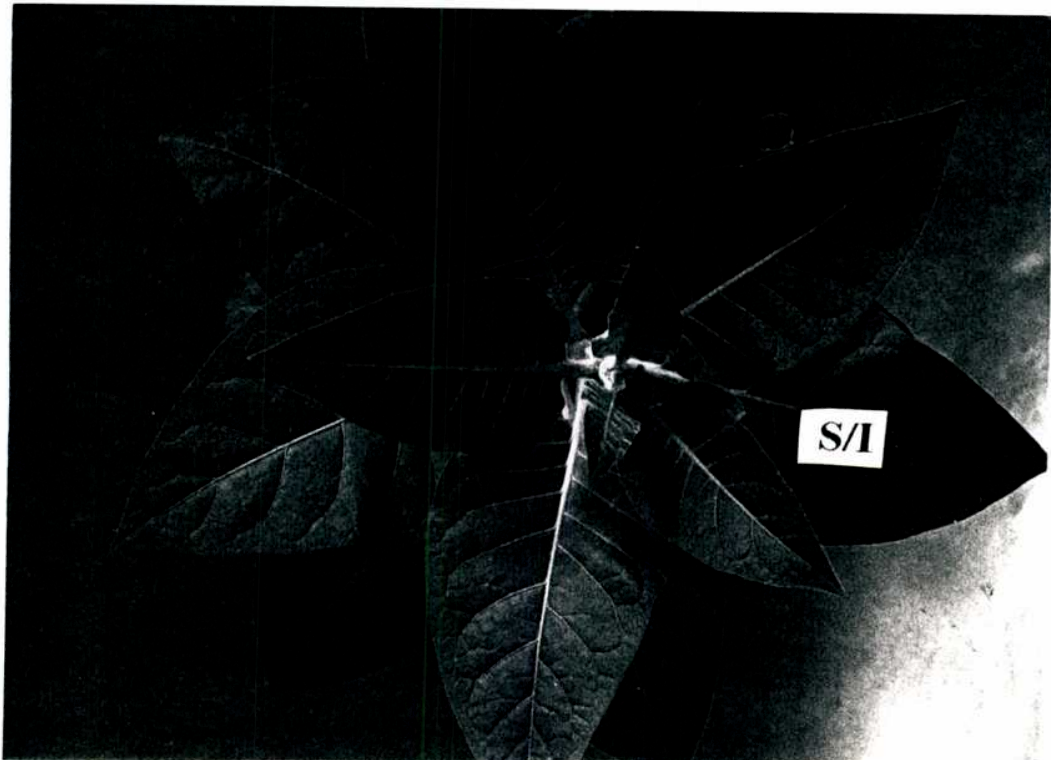


21 dpi



C

29 dpi



S/I

14 dpi



21 dpi



D

29 dpi



ELISA a los 7 dpi (Tabla 6.III). En general, las concentraciones de virus estimadas por ELISA fueron menores en las plantas transgénicas que las detectadas en los controles.

Para verificar la ausencia de virus en las plantas resistentes observadas, se realizó un ensayo de *Northern-blot* usando ARN total de hojas superiores e inferiores de las plantas 4₂ y 4₄. Como puede verse en la Fig. 6.25, sólo en las hojas inferiores de la planta 4₄ se detecta ARNg viral, aunque en menor cantidad que los controles de plantas no transgénicas. En la planta 4₂ no se observa ARNg viral ni en las hojas superiores ni en las inferiores.

FIGURA 6.25: Northern-blot de ARN total de hojas superiores (sup) e inferiores (inf) de plantas transgénicas y no transgénicas. 4₂ es una planta resistente; la 4₄ es una planta que mostró una desaparición de los síntomas en las hojas superiores. La 4₇ fue inoculada sin virus.

Ntr INFEC		Ntr SANA		4 ₄		4 ₂		4 ₇	
inf	sup	inf	sup	inf	sup	inf	sup	inf	sup



-9 kb

7. DISCUSION

7.1 Secuencia nucleotídica de la CP del PepSMV e implicancias en su ubicación taxonómica

La secuencia de nucleótidos obtenida del ADNc de PepSMV fue validada mediante la secuenciación de 3 clones y la lectura de ambas cadenas del ADNc. Dos de los 3 clones (pSM8 y pSM21) se secuenciaron completamente y estaban orientados en forma opuesta con respecto al vector de clonado. Tanto los clones como los subclones deletados se secuenciaron utilizando el mismo *primer*. Esto permitió obtener la secuencia de la hebra codificante del ADNc en el clon pSM8, y la complementaria en el clon pSM21. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, permitió confirmar la pertenencia del virus clonado al género *Potyvirus* mediante la comparación con secuencias reportadas de otros virus incluidos en este género. Todas las secuencias muestran un alto grado de conservación en la región central de la proteína. La región aminoterminal es la que presenta el mayor nivel de divergencia, como ocurre en general entre los miembros del género *Potyvirus*.

Si bien el PepSMV es transmisible por áfidos, la secuencia de aminoacídica de la CP del aislado S-163 utilizado en este trabajo mostró una alteración que convertía en la secuencia "DAE" al motivo "DAG" ubicado en la región aminoterminal de la CP. Según lo demostrado en otros virus (Atreya *et al.*, 1990; Atreya *et al.*, 1991; Gal-On *et al.*, 1992), esta mutación sería la responsable de la deficiencia en la transmisibilidad por áfidos del aislado S-163.

Hollings y Brunt (1981a) proponían la existencia de un rango continuo de variabilidad entre los diferentes miembros del género *Potyvirus*. De esta manera, no se podía definir claramente la clasificación de *Potyvirus* en especies o cepas de la misma especie. Estos autores apoyaban su hipótesis sobre los datos de sintomatología, serología, especificidad de huésped, etc., disponibles en ese momento. Ninguno de estos criterios taxonómicos probó ser unívoco para una adecuada clasificación de especies y cepas. Más tarde Shukla y Ward (1989) estudiando las secuencias de aminoácidos de las CPs de 17 especies de *Potyvirus* definieron que dos

especies diferentes dentro del género compartían menos de un 70% de homología mientras que dos cepas de la misma especie mostraban una homología mayor del 90%. Estudiando la cepa SC del sugarcane mosaic virus (SCMV-SC) y del maize dwarf mosaic virus B (MDMV-B), considerados especies diferentes, Frenkel *et al.* (1991) propusieron que se trataba de dos cepas del SCMV. Para ello fue necesario analizar en detalle las secuencias de aminoácidos de las CPs, ya que la comparación directa de ambas secuencias mostraba un 77% de homología, lo cual era mayor que lo definido por Shukla y Ward para dos especies y menor que lo definido para dos cepas de la misma especie. Sin embargo, si se tomaba en cuenta que, excluyendo una región de 44 aa en SCMV-SC y de 59 aa en MDMV-B, la homología entre ambos alcanzaba el 92%, y que las secuencias 3' no codificantes mostraban tener tamaños similares y una alta homología (86%), la sugerencia de que se trataba de dos cepas del mismo virus resultaba reforzada. La comparación de las secuencias de aa de las CPs del PVY y PepSMV mostró un 80% de homología. Si se considera que la mayoría de las diferencias estaban concentradas en la región amino terminal, podría evitarse tomar en cuenta dicha región al comparar las secuencias y obtener un valor más cercano al 90% de homología entre las CPs del PVY y del PepSMV y clasificar a éste último como una cepa del PVY. Sin embargo la región 3' no codificante del PepSMV es 141 nt más larga que la del PVY y la homología de secuencias es del 59%. Por lo tanto el PepSMV es una especie dentro del género *Potyvirus* y no una cepa del PVY. Refuerzan esta afirmación los resultados obtenidos por van der Vlugt (1993) al analizar las regiones 3' no codificantes de 12 cepas del PVY provenientes de diferentes regiones geográficas. Las homologías de secuencias obtenidas en este trabajo fueron superiores al 83% entre todas las cepas analizadas. Estos resultados conducirían a validar con datos moleculares la hipótesis del rango continuo de variabilidad propuesta por Hollings y Brunt, dado que el porcentaje de homología existente entre PVY y PepSMV no encaja dentro de los rangos propuestos por Shukla y Ward para diferenciar cepas de especies.

7.2 Producción de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas por el autor en el INRA-Versailles durante una pasantía realizada en 1992 en el marco de una colaboración financiada por la Comunidad Económica Europea. Los brotes enraizados en kanamicina fueron trasladados a nuestro laboratorio en el INGEBI donde se continuó el análisis de los mismos. En este momento nuestro laboratorio cuenta con la infraestructura y la tecnología necesarias para la producción de plantas transgénicas de varias especies vegetales. Debido a que en ese momento se disponía de poca experiencia en el uso de esta tecnología se realizó una serie de ensayos confirmatorios de la transgénesis. El primer ensayo consistió en confirmar bioquímicamente la expresión del gen marcador selectivo *npt II*. Si bien las plantas crecieron siempre en presencia del agente selectivo, la degradación de la kanamicina por una planta transgénica podría permitir el crecimiento de plantas no transgénicas en las zonas adyacentes del medio de cultivo. Todas las plantas analizadas dieron señal positiva en este ensayo, lo que confirmó que en nuestras manos, no se producían escapes con alta frecuencia. Sin embargo 4 de 20 plantas que crecían en presencia de kanamicina y habían sido transformadas con el pBI121, que lleva el gen de la β -glucuronidasa, no mostraron actividad de dicha enzima. Esto puede deberse a que en esas plantas el gen se inactivó por alguna modificación durante el proceso de transgénesis, quedando intacto el gen *npt II*.

Para obtener progenies de plantas transgénicas fue necesario determinar las condiciones en las cuales se podían seleccionar aquellas que hubieran heredado el transgen. Al germinar semillas en concentraciones crecientes de kanamicina se encontró que era necesaria una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico para inhibir el crecimiento de las plantas no transgénicas, permitiendo el desarrollo normal de las portadoras del transgen. Usando una línea portadora de los genes *npt II* y *uid A*, la proporción de plantas resistentes al antibiótico fue similar a la proporción de plantas que expresaban la β -glucuronidasa, lo que permitió inferir que los transgenes permanecen ligados luego de la autofecundación. Esta suposición se extrapó a las plantas transgénicas que portaban el gen *npt II* y genes quiméricos de origen viral.

7.3 Resistencia antiviral

Los ensayos de resistencia contra el PepSMV mostraron que las plantas provenientes de la línea 232 (que expresaría la CP del PepSMV) poseían el más alto grado de resistencia. Entre otros casos similares publicados con anterioridad, se reportó que en un lote de 50 líneas de plantas transgénicas independientes que poseen genes derivados de virus, la expresión de la resistencia sólo se observa en un 4% de las plantas. Además, entre las plantas individuales pertenecientes a cada línea, sólo se obtuvo un 40-50% de individuos asintomáticos (Vardi *et al.*, 1993). Audy *et al.* (1994) utilizan 25 plantas de cada una de 13 líneas independientes y obtienen 4 líneas que muestran ausencia de síntomas en algunos individuos: la línea FL5, en 2 de las 25 plantas; la línea FL10 en 3 plantas; la línea FL13, en 9 plantas, y la línea FL12 en 23 de las 25 plantas. En otros trabajos se muestran resultados obtenidos con 2 a 10 líneas de plantas transformadas y se asume que el resto de las plantas obtenidas en la transformación mostrarían un fenotipo resistente similar al de las plantas estudiadas (Namba *et al.*, 1992; Nida *et al.*, 1992; Kollár *et al.*, 1993; Fang y Grumet, 1993).

En nuestro caso, por construcción se obtuvieron 2 ó 3 líneas resistentes sobre 4 ó 5 analizadas, y un 50% de individuos resistentes dentro de la línea 232. El análisis de nuevas plantas transformadas independientemente, permitirá encontrar más líneas de plantas resistentes. Dado que nuestro objetivo era demostrar que la estrategia de resistencia elegida era viable en tabaco para luego transferirla al pimiento, nos concentramos en el análisis de las plantas derivadas de la 232.

Las plantas derivadas de la línea 70 (transformadas con el pBICP) mostraron un nivel menor de resistencia por lo que no fueron analizadas en mayor detalle. Las plantas derivadas de las líneas 17, 90 y 303 (transformadas con pBICPNT, que producirían un ARNm no traducible) mostraron un bajo nivel de resistencia. Estos datos podrían conducir a concluir que la construcción pBICP (que permitiría la expresión de la CP) fue más eficiente que la pBICPNT. Sin embargo, debido al pequeño número de plantas estudiadas y al mecanismo por el cual funcionaría la resistencia (ver más abajo), dicha conclusión no podría sustentarse plenamente. Además, la CP fue indetectable en ensayos de *Western-blots*. Esto podría

deberse a una insuficiente afinidad del anticuerpo policlonal utilizado. Sin embargo no se puede descartar que se hubiera producido una mutación en el o los transgenes, cuya consecuencia fuera, por ejemplo, la expresión de un transcripto no traducible.

Debido a que la línea 232 resultó ser portadora de 5 copias del transgen, no fue posible obtener descendencia homocigota. Por este motivo se clonaron, mediante organogénesis somática, plantas seleccionadas de la R_2 para obtener lotes de plantas genéticamente homogéneas y eliminar así la variabilidad debida a la segregación de las distintas copias de los transgenes. Una alternativa para obtener líneas homocigotas (aunque más complicada) sería obtener plantas haploides a partir de aquellas que fueran resistentes y luego obtener plantas doblehaploides mediante la regeneración (Smith *et al.*, 1994).

En el caso de *Potyvirus*, las primeras hipótesis propuestas para explicar el mecanismo por el cual funcionaría la resistencia mediada por secuencias derivadas de genes virales, postulaban que los mayores niveles de resistencia se obtenían por una hibridación entre el transcripto derivado del transgen y la cadena de ARN negativa (involucrada en la replicación) del virus desafiante (Lindbo y Dougherty, 1992b). Si el transcripto no era traducible, la formación del híbrido ARN/ARN se vería favorecida por la ausencia de interacción del ARN con los ribosomas. Posteriormente, este grupo de investigadores obtuvo inmunidad en la parte superior de plantas transgénicas (que expresaban tanto transcriptos no traducibles como transcriptos que codificaban la CP) que habían desarrollado la infección durante las primeras semanas de crecimiento (Lindbo *et al.*, 1993b; Dougherty *et al.*, 1994). Como consecuencia, postularon un modelo en el cual la acumulación de una determinada secuencia de ARN induciría la expresión de una ARN polimerasa ARN dependiente. Apoya esta hipótesis la descripción de una actividad de ARN polimerasa ARN dependiente inducida en plantas ante infecciones virales o heridas (van der Meer *et al.*, 1984). Esta enzima sintetizaría pequeños fragmentos de ARN complementarios al transcripto sobreexpresado. Estos fragmentos se hibridarían al ARN que se encuentra en exceso (en este caso tanto el transgen como el ARN viral), inactivándolo y marcándolo para ser degradado. El nivel de ARNm del transgen en el tejido resistente a la infección es varias veces menor que en la parte sintomática de la planta. Sin embargo, por experimentos de *run-off transcription* se determinó que el nivel de transcripción del transgen es

similar en toda la planta. A la luz de estos experimentos, se sugirió una analogía entre la resistencia mediada por el ARNm y el conjunto de fenómenos denominado "silenciamiento génico inducido por repetición". Este término surgió de la observación de que la expresión de genes exógenos en plantas resulta generalmente impredecible, encontrándose desde niveles de producción de proteínas muy altos a niveles indetectables. Inicialmente, esta variabilidad en la expresión de transgenes fue atribuida a efectos posicionales en el genoma vegetal, o a la competencia de los genes por factores no difusibles como la matriz nuclear o la envoltura nuclear. Se ha demostrado que es posible reducir la variabilidad de la expresión génica debida al efecto posicional del transgen, incluyendo en el ADN-T secuencias de unión a la matriz nuclear, de manera tal que el entorno del mismo determine regiones de transcripción activa (Mlynárová *et al.*, 1994; Dorer y Henikoff, 1994). Los trabajos de Napoli *et al.* (1990) y van der Krol *et al.* (1990) fueron los primeros aportes para el conocimiento de estos procesos. Estos investigadores transformaron plantas de petunia con los genes que codifican la chalcona sintetasa y la dihidroflavonol-4-reductasa (enzimas involucradas en la producción de pigmentos presentes en la flor) y observaron diferentes grados de inhibición de la expresión tanto del transgen como del correspondiente gen endógeno. Esta inhibición de la expresión debida a la presencia de una copia transgénica del gen se denominó "cosupresión génica" (Jorgensen, 1990). Otros ejemplos similares fueron descritos en los trabajos de Hobbs y colaboradores (Hobbs *et al.*, 1990; Hobbs *et al.*, 1993) donde, utilizando el gen de la β -glucuronidasa fueron capaces de identificar copias del transgen muy activas a nivel transcripcional y copias asociadas con una baja actividad transcripcional. Cuando uno de cada tipo de estos transgenes se introdujo en la misma planta, el de baja actividad inactivó al de alta actividad. Si bien no están claramente determinadas las causas de este fenómeno, hay evidencias de que los transgenes pierden actividad por metilación. Matzke y colaboradores estudiaron la inactivación del gen *npt II* (que confiere resistencia a kanamicina) por la introducción de un segundo ADN-T que portaba otro marcador de selección (Matzke y Matzke, 1991; Matzke *et al.*, 1993). Así, vieron que dicha inactivación se correlacionaba con la metilación del promotor del gen *npt II*, del cual había una copia en el segundo ADN-T. Al separar los dos transgenes por segregación, se vio que el transgen se reactivaba, lo que sugiere que el fenómeno es reversible. Esta inactivación guarda similitud con el fenómeno conocido como

paramutación (Brink, 1973), donde un alelo (paramutagénico) inactiva a otro alelo (paramutable) en forma heredable, pero reversible cuando ambos alelos segregan en la descendencia. Este fenómeno denominado "transinactivación" no se presenta en todas las plantas estudiadas: algunas transformantes no mostraron inactivación del primer transgen al introducirles el segundo. Esto podría deberse a un efecto de posición en el genoma, a alguna otra característica del estado del transgen en cuestión o a algún factor ambiental. Todas estas evidencias no permiten determinar si la metilación del ADN en el transgen es una causa o una consecuencia de su inactivación. Wassenegger *et al.* (1994) transformaron plantas con un ADNc que codifica el genoma de un viroide de papa, el que es capaz de replicarse una vez transcrito. Con este sistema, demostró que el transgen se metila completamente sólo si el viroide se amplifica por su propia replicación. A partir de estos datos se propuso que la superexpresión de un ARNm podría inducir la metilación específica del correspondiente gen. La metilación de la cromatina podría ser responsable de este "marcado" (*imprinting*) de genes, de manera tal de inactivarlos en forma reversible. Aunque no se estudió la metilación del gen de la chalcona sintetasa, los patrones de expresión de este gen en plantas de petunia transgénicas son congruentes con un mecanismo de marcado de cromatina, ya que en una misma planta se observó reversión de la cosupresión del gen en flores pertenecientes a algunas ramas axilares. Por otro lado la progenie de una planta en la que los genes de la chalcona sintetasa se hallaban cosuprimidos, mostró diferentes grados de desrepresión (Jorgensen, 1995; Napoli *et al.*, 1990).

Actualmente se tiende a denominar a los fenómenos en los que un gen silencia a otro como "silenciamiento transcripcional". Como contrapartida, la "cosupresión postranscripcional" comprende la transcripción de genes homólogos y la posterior inhibición de su expresión (Jorgensen, 1995). Si bien el mecanismo responsable de la cosupresión no se conoce, podría descartarse que opere por una retroalimentación negativa por exceso de proteína ya que genes no funcionales (carentes de promotor) son suficientes para producir cosupresión (van Blokland *et al.*, 1994). Si bien estos experimentos no encajan en el modelo de una inhibición postranscripcional de ambos genes (ya que uno no produce mensajero), otros experimentos tenderían a demostrar lo contrario. Al menos en un sistema determinado, se puede detectar la transcripción del gen de la β -1,3-glucanasa mediante ensayos de *run-off transcription*, pero el ARNm se

encuentra en el citoplasma en bajos niveles (de Carvalho *et al.*, 1992; de Carvalho Niebel *et al.*, 1995). Los autores proponen que el mecanismo de silenciamiento podría operar a nivel de transporte del ARN de núcleo a citoplasma y/o a nivel de la estabilidad del mensajero.

En cuanto a la resistencia antiviral, el modelo de la ARN polimerasa ARN dependiente, propuesto en los trabajos del grupo de Dougherty fue modificado por Smith *et al.* (1994). Según estos autores, las plantas susceptibles presentarían un bajo o moderado nivel de transcripción del transgen. Las plantas altamente resistentes, mostrarían un nivel de transcripción mayor que un determinado umbral. Finalmente las plantas que se recuperaran luego de unas semanas de la inoculación transcribirían el transgen a un nivel cercano al umbral y el mecanismo de degradación sería eventualmente disparado. Este modelo no incluye la gran variedad de niveles intermedios de resistencia obtenidos contra diferentes especies de *Potyvirus*, los que podrían ser consecuencia de otros mecanismos. Apoyan este modelo del umbral, los trabajos de Smith *et al.* (1990), quienes observaron que un transgen de la poligalacturonasa se podía expresar en altos niveles antes de la inducción del mismo gen endógeno, pero que, al inducirse éste, ambos transcriptos eran cosuprimidos. Si bien estos resultados son consistentes con el modelo del umbral para los niveles de ARNm, habría que suponer que, en este caso, el transcripto derivado del transgen se expresaba a un nivel muy cercano al umbral y un pequeño aumento de concentración, aportado por la inducción del gen endógeno, resultó suficiente para superarlo y activar el mecanismo de degradación específica. Otros estudios sobre dosaje génico refuerzan el modelo del umbral. Así, mientras que plantas transgénicas hemicigotas para el gen de la glucanasa expresan tanto el transgen como el gen endógeno, ambos genes se cosuprimen en la progenie homocigota para este transgen (de Carvalho *et al.*, 1992; de Carvalho Niebel *et al.*, 1995). Mueller *et al.* (1995) ampliaron el modelo, proponiendo la existencia de un factor genómico desconocido. Si el transgen se insertaba en o adyacente a dicho elemento genético, éste determinaba que el transcripto producido por el transgen y cualquier RNA que compartiera la secuencia, fueran degradados. Este modelo se apoya en la identificación de dos *loci* que influyen en la frecuencia y momento de aparición del fenómeno de silenciamiento génico (Dehio y Schell, 1994).

En los experimentos descritos en el presente trabajo de tesis, no se observaron casos de inmunidad, pero las plantas resistentes se ajustan en parte al modelo propuesto, ya que en algunos casos se observa una recuperación en la parte superior de plantas transgénicas infectadas (Fig. 6.22). Los niveles de acumulación de los ARNm derivados de los transgenes en las diferentes líneas, resultaron ser bajos y comparables entre líneas resistentes y sensibles. El mayor nivel de acumulación se observó en la planta 62 que resultó ser sensible (Fig. 6.17). Dado que no se evaluó el nivel de transcripción, es posible que en la línea resistente se produjera la degradación del mensajero, y en las sensibles el nivel de transcripción fuera bajo. Si bien era más esperable encontrar resistencia mediada por el ARN en las plantas transformadas con pBICPNT, no se puede descartar que uno o más de los transgenes presentes en la línea 232 hubiera sufrido una mutación que impidiera su traducción. Las líneas transformadas con el pBICPNT, presentan el codón de iniciación de PVY y codifican para un pequeño marco de lectura que podría favorecer la interacción del transcripto con los ribosomas frente al gatillado del mecanismo de degradación del ARN en exceso. La imposibilidad de detectar la CP de PepSMV en *Western-blot*s de plantas transgénicas apoyaría la hipótesis de que la resistencia observada estaba mediada por el ARN y no por la proteína.

La planta 4₄, descendiente de la línea 232/8, mostró un fenotipo recuperado de la infección con PepSMV en la parte superior de la planta. La planta 4₆ fue ligeramente resistente y las restantes 4 plantas (genéticamente idénticas a las anteriores) mostraron consistentemente resistencia a la infección. Esta variabilidad entre plantas genéticamente iguales no era esperada. Sin embargo este fenómeno también fue observado por Smith *et al.* (1994).

La variabilidad observada en los niveles de resistencia entre generaciones puede deberse en parte a segregación de los transgenes, aunque en la R₁ no se pudo establecer ninguna correlación entre las distintas copias de los mismos y el grado de resistencia. Además, en el ensayo de *Southern-blot* no se pudo determinar si cada copia del trasgen estaba en homocigosis o hemicigosis. Por lo tanto no se puede descartar que existiera una dependencia del fenotipo resistente con el dosaje génico. Dougherty *et al.* (1994) proponen que la variabilidad entre plantas descendientes de la misma línea que obtienen en sus trabajos, se debe a

que las plantas poseen varias copias del transgen y algunas de ellas podrían estar en homocigosis y otras no.

Para que la resistencia antiviral sea efectiva, es necesario que el transgen ejerza su función en todas las células de la planta. La detección de patrones variables de la expresión de transgenes dirigidos por el promotor 35 S (Barnes, 1990) podría explicar la variabilidad de los niveles de resistencia entre líneas diferentes, ya que sería posible que el transgen no se expresara en un tejido donde la presencia del transcrito fuera crítica para manifestar el fenotipo resistente.

Dadas las analogías entre el mecanismo propuesto para la resistencia derivada del patógeno y el silenciamiento génico en plantas, la dependencia de este fenómeno de las variaciones de las condiciones ambientales como luz y temperatura, podría explicar también las variaciones en los niveles de resistencia antiviral entre generaciones de plantas (Meyer *et al.*, 1992; de Carvalho Niebel *et al.*, 1995). Asimismo, el mecanismo de silenciamiento es reversible, incluso en la misma planta, por lo cual podría analogarse a la recuperación de la infección observada en ciertas plantas (Napoli *et al.*, 1990; Matzke *et al.*, 1989).

Recientes reportes demuestran que la CP está directamente involucrada en la movilización de los potyvirus en la planta. Esto podría agregar una nueva alternativa para explicar los posibles mecanismos de resistencia mediada por la CP, al menos en los casos donde es detectable la expresión de la misma, derivada de un transgen (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995).

La infectividad de un inóculo viral determinado no suele ser reproducible debido a la variabilidad del estado fisiológico de la planta que se utiliza como fuente de virus y a la inestabilidad de los viriones en el almacenaje (tanto si se trata de extractos de plantas infectadas como de viriones purificados). Por esta razón se eligió la utilización de inóculos consistentes en extractos frescos de plantas infectadas mantenidas en invernadero en condiciones similares y la concentración de virus se estimó por ELISA. En estas condiciones, la resistencia obtenida resultó ser dependiente de la concentración del inóculo. La concentración estimada de viriones en el inóculo con el cual se obtuvo resistencia fue de 1 µg/ml. La utilización de inóculos consistentes en extractos de plantas infectadas garantiza un buen nivel de infectividad, en comparación con inóculos de

viriones purificados. Es por eso que la comparación directa de la concentración de viriones en nuestro inóculo con concentraciones más altas reportadas utilizando viriones purificados, no es válida. Por ejemplo, una concentración de 5 µg/ml de cowpea mosaic virus (CPMV) purificado no produjo síntomas consistentemente en plantas de tabaco, por lo que los autores utilizaron inóculos de 10 µg/ml (Nida *et al.*, 1992).

El ensayo de ELISA del experimento de la Fig. 6.22 fue realizado recubriendo la placa con los anticuerpos anti-PepSMV, mientras que en el ensayo de ELISA de la Fig. 6.23 la placa se recubrió con el antígeno (extracto de plantas). La sensibilidad de este último es menor que el anterior. Posiblemente por esta razón, a los 7 dpi se observa un menor porcentaje de plantas no transgénicas infectadas con el inóculo más concentrado. Sin embargo, la diferencia en el porcentaje de plantas infectadas entre las transgénicas y las no transgénicas es del 20% en el experimento en el que se usó un inóculo concentrado. En contraste, en el experimento en el que el inóculo fue más diluido esa diferencia fue del 80%.

La aparición del moteado en las plantas del experimento de la Fig. 6.18 C (Tabla 6.II) impidió la observación de los síntomas hasta los 45 dpi. Sin embargo los resultados de los ensayos de ELISA permitieron determinar la acumulación de virus y, consecuentemente, evaluar el nivel de resistencia.

7.4 Avances hacia la transformación de pimiento

Si bien los síntomas producidos por el PepSMV en *N. tabacum* cv. Xanthi no son muy pronunciados, permitieron demostrar que es posible obtener resistencia contra este virus mediante la estrategia de la expresión de genes derivados del mismo patógeno. Paralelamente con los resultados presentados en este trabajo, se intentó avanzar en la determinación de las condiciones para la regeneración del pimiento, lo cual es necesario para obtener pimiento transgénico. Durante el transcurso de la pasantía en el INRA-Versailles fue publicado un nuevo método para la regeneración de pimiento (Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992) que consistía en colocar hipocótilos de pimiento invertidos en un medio de regeneración adecuado y, luego de la aparición de yemas, volver a colocarlos en la posición

FIGURA 7.1: A) Hipocótilo de pimiento luego del período de incubación en posición invertida, en el medio de regeneración. Se observan las raíces sin grandes modificaciones y una yema en el callo formado en el extremo del hipocótilo. B) Detalle de la yema formada que no se elongó.

A



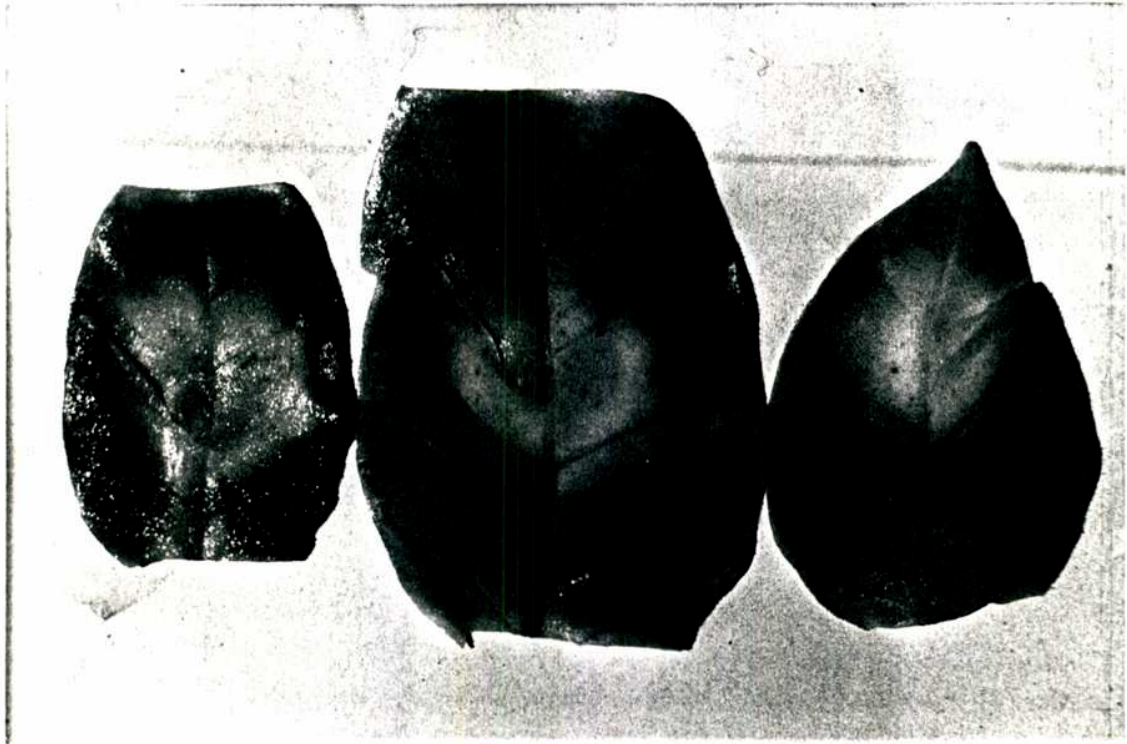
B



correcta en medio MS sin aditivos. En nuestras manos sólo se llegó a expandir una hoja que no se elongó para formar un tallo (Fig. 7.1). Hasta el momento se sigue trabajando en nuestro laboratorio para lograr las condiciones de regeneración de pimiento, pero aún sin resultados satisfactorios.

En otro intento por avanzar en la transformación de pimiento, se puso a punto un acelerador de micropartículas para transformar pimiento. la Fig. 7.2 muestra un ensayo preliminar de bombardeo de hojas de tabaco con partículas de tungsteno recubiertas con el plásmido pBI121 que porta el gen de la β -glucuronidasa. Este aparato podría ser usado para bombardear la zona meristemática de la planta de pimiento y obtener una planta quimérica, en la que algunas células meristemáticas serían transgénicas. Si en el momento de la floración estas células originaran semillas, éstas serían transgénicas y darían origen a plantas homogéneamente transformadas. En este momento se están desarrollando las modificaciones necesarias al dispositivo de aceleración de micropartículas para que sea adecuado a los fines de transformar meristemas.

FIGURA 7.2: Ensayo de expresión transitoria en hojas de tabaco bombardeadas con partículas de tungsteno recubiertas con el plásmido pBI121 y sometidas a un ensayo histoquímico de actividad de β -glucuronidasa.



8. BIBLIOGRAFIA

- Allison R, Johnston R y Dougherty W, 1986, *Virology* 154: 9.
- Allison R, Sorenson J, Kelly M, Amstrong F y Dougherty W, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3969.
- Ammar E, Järlfors U y Pirone T, 1994a, *Phytopathology* 84: 1054.
- Ammar E, Rodríguez-Cerezo E, Shaw J y Pirone T, 1994b, *Phytopathology* 84: 520.
- Ambros V y Baltimore D, 1978, *Journal of Biological Chemistry* 60: 5263.
- Anderson E, Stark D, Nelson R, Powel P, Tumer N y Beachy R, 1989, *Phytopathology* 79: 1284.
- Arroyo R y Revilla M, 1991, *Plant Cell Reports* 10: 414.
- Atreya C, Atreya P, Thornbury D y Pirone T, 1992, *Virology* 191: 106.
- Atreya P, Atreya C y Pirone T, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7887.
- Atreya C, Raccah B y Pirone T, 1990, *Virology* 178: 161.
- Audy P, Palukaitis P, Slack S y Zaitlin M, 1994, *Molecular Plant Microbe Interactions* 7: 15.
- Bachem C, Speckmann G, van der Linde P, Verheggen F, Hunt M, Steffens J y Zabeau M, 1994, *Bio/Technology* 12: 1101.
- Barnes W, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9183.
- Basso J, Dellaire P, Charest P, Devantier Y y Laliberté J, 1994, *Journal of General Virology* 75: 3157.
- Bateson M, Henderson J, Chaleprom W, Gibbs A y Dale J, 1994, *Journal of General Virology* 75: 3547.
- Baunoch D, Das P, Browning M y Hary V, 1991, *Journal of General Virology* 72: 487.
- Berger P, Hunt A, Domier L, Hellmann G, Stram Y, Thornbury D y Pirone T, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8402.
- Berger P y Pirone T, 1986, *Virology* 153: 256.
- Birnboim H y Doly J, 1979, *Nucleic Acids Research* 7: 1513.
- Brantley J y Hunt G, 1993, *Journal of General Virology* 74: 1157.
- Braun C y Hemenway C, 1992, *The Plant Cell* 4: 735.
- Bravo-Almonacid F, 1992, *Tesis Docotral*, Universidad de La Plata.
- Bravo-Almonacid F y Mentaberry A, 1989, *Nucleic Acids Research* 17: 4401.
- Brederode F, Taschner P, Posthumus E y Bol J, 1995, *Virology* 207: 467.
- Brink R, 1973, *Annual Review of Genetics* 7: 129.

- Calder V e Ingerfeld M, 1990, *Journal of Structural Biology* 105: 62.
- Carr J, Gal-on A, Palukaitis P y Zaitlin M, 1994, *Virology* 199: 439.
- Carr J, Marsh L, Lomonosoff G, Sekiya M y Zaitlin M, 1992, *Molecular Plant Microbe Interactions* 5: 397.
- Carr J y Zaitlin M, 1991, *Molecular Plant Microbe Interactions* 4: 579.
- Carrington J, Cary S y Dougherty W, 1988, *Journal of Virology* 62: 2313.
- Carrington J, Cary S, Parks T y Dougherty W, 1989a, *EMBO Journal* 8: 365.
- Carrington J y Dougherty W, 1987a, *Journal of Virology* 61: 2540.
- Carrington J y Dougherty W, 1987b, *Virology* 160: 355.
- Carrington J y Dougherty W, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3391.
- Carrington J y Freed D, 1990, *Journal of Virology* 64: 1590.
- Carrington J, Freed D y Leinicke A, 1991, *The Plant Cell* 3: 953.
- Carrington J, Freed D y Oh C, 1990, *EMBO Journal* 9: 1347.
- Carrington J, Freed D y Sanders T, 1989b, *Journal of Virology* 63: 4459.
- Chang C, Hiebert E y Purcifil D, 1988, *Journal of General Virology* 69: 1117.
- Chang S, Park S, Kim B, Kang B, Kim D y Nam H, 1994, *The Plant Journal* 5: 551.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sánchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J y Klessig D, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4134.
- Christou P, Ford T y Kofron M, 1991, *Bio/Technology* 9: 957.
- Christou P, Ford T y Kofron M, 1992, *Trends in Biotechnology* 10: 239.
- Chupeau M, Bellini C, Guerche P, Maisonneuve B, Vastra G y Chupeau Y, 1989, *Bio/Technology* 7: 503.
- Company M, Arenas J y Abelson J, 1991, *Nature* 349: 487.
- Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad M y Crrington J, 1995, *The Plant Cell* 7: 549.
- Cuozzo M, O'Connell K, Kaniewski W, Fang R, Chua N y Tumer N, 1988, *Bio/Technology* 6: 549.
- Dangl J, 1995, *Cell* 80: 363.
- de Carvalho F, Gheysen G, Kushnir S, van Montagu M, Inzé D y Castresana C, 1992, *EMBO-Journal* 11: 2595.
- de Carvalho Niebel F, Frendo P, van Montagu M y Cornelissen M, 1995, *The Plant Cell* 7: 347.
- Dehio C y Schell J, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5538.
- Dolja V, Haldeman R, Robertson N, Dougherty W y Carrington J, 1994, *EMBO Journal* 13: 1482.

- Dolja V, Haldeman-Cahill R, Montgomery A, Vandenbosch K y Crrington J, 1995, *Virology* 206: 1007.
- Dolja V, Herndon K, Pirone T y Carrington J, 1993, *Journal of Virology* 67: 5968.
- Domier L, Franklin K, Shahabuddin M, Hellman G, Overmeyer J, Hiremath S, Siaw M, Lomonosoff G, Shaw J y Rhoads R, 1986, *Nucleic Acids Research* 14: 5417.
- Domier L, Shaw J y Rhoads R, 1987, *Virology* 158: 20.
- Donson J, Kearney C, Turpen T, Khan I, Kurath G, Turpen A, Jones G, Dawson W y Lewandowski D, 1993, *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 635.
- Dorer D y Henikoff S, 1994, *Cell* 77: 993.
- Dougherty W y Carrington J, 1988, *Annual Review of Phytopathology* 26: 123.
- Dougherty W, Carrington J, Cary S y Parks T, 1988, *EMBO Journal* 7: 1281.
- Dougherty W, Cary S y Parks T, 1989a, *Virology* 171: 356.
- Dougherty W y Hiebert E, 1980, *Virology* 104: 174.
- Dougherty W, Lindbo J, Smith H, Parks T, Swaney S y Proebsting W, 1994, *Molecular Plant Microbe Interactions* 7: 544.
- Dougherty W y Parks T, 1989, *Virology* 172: 145.
- Dougherty W y Parks T, 1991, *Virology* 183: 449.
- Dougherty W, Parks T, Cary S, Bazan J y Fletterick R, 1989b, *Virology* 172: 302.
- Durand-Tardif M, Broglie R, Slightom J y Tepfer D, 1985, *Journal of Molecular Biology* 186: 557.
- During K, Porsch P, Fladung M y Lörz H, 1993, *The Plant Journal* 3: 587.
- Enyedi A, Yalpani N, Silverman P y Raskin I, 1992, *Cell* 70: 879.
- Falco S, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward R y Webber P, 1995, *Bio/Technology* 13: 577.
- Fang G y Grumet R, 1993, *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 358.
- Fauquet C y Martelli G, 1995, *Archives of Virology* 140: 393.
- Feinberg A y Vogelstein B, 1983, *Analytical Biochemistry* 132: 6.
- Feldman J y Gracia O, 1985, *IDIA-INTA enero-abril*: pg.75.
- Feldman J y Gracia O, 1977, *Phytopathologische Zeitschrift* 89: 146.
- Firoozabady E, Moy Y, Courtney-Gutterson N y Robinson K, 1994, *Bio/Technology* 12: 609.
- Fitch J y Beachy R, 1993, *Annual Review of Microbiology* 47: 739.

- Frame B, Drayton P, Bagnall S, Lewnau C, Bullock W, Wilson H, Dunwell J, Thompson J y Wang K, 1994, *The Plant Journal* 6: 941.
- Francki R, Fauquet C, Knudson D y Brown F, 1991, *Archives of Virology* (Supplement) 2: 351.
- Frenkel M, Jilka J, McKern N, Strike P, Clark J, Shukla D y Ward C, 1991, *Journal of General Virology* 72: 237.
- Fulton R, 1986, *Annual Review of Phytopathology* 24: 670.
- Gadh I y Hari V, 1986, *Virology* 150: 304.
- Gal-On A, Antignus Y, Rosner A y Raccach B, 1992, *Journal of General Virology* 73: 2183.
- García J y Lain S, 1991, *FEBS Lett.* 281: 67.
- García J, Lain S, Cervera M, Riechmann J y Martín M, 1990, *Journal of General Virology* 71: 2773.
- García J, Riechmann J y Lain S, 1989a, *Journal of Virology* 63: 2457.
- García J, Riechmann J y Lain S, 1989b, *Virology* 170: 362.
- Ghabrial S, Smith H, Parks T y Dougherty W, 1990, *Journal of General Virology* 71: 1921.
- Golemboski D, Lomonosoff G y Zaitlin M, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6311.
- Gonsalves D, Chee P, Provvidenti R, Seem R y Slightom J, 1992, *Bio/Technology* 10: 1562.
- Gorbalenya A y Kooning E, 1989, *Nucleic Acids Research* 17: 8413.
- Gorablenya A, Koonin E, Donchenko A y Blinov V, 1988, *FEBS Letters* 235: 16.
- Gorablenya A, Koonin E, Donchenko A y Blinov V, 1989, *Nucleic Acids Research* 17: 4713.
- Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian E, Peterson G y Smith R, 1991, *Plant Physiology* 95: 426.
- Gracia O y Feldman J, 1977, *IDIA-INTA* 349-354: 80.
- Gracia O, Feldman J, Pontis R y Boninsegna J, 1968, *Plant Disease Reporter* 52: 674.
- Gracia O y Gutiérrez L, 1982, *Phytopathologia Mediterranea* 21: 107.
- Granier F, Durand-Tardif M, Casse-Delbart F, Lecoq H y Robaglia C, 1993, *Journal of General Virology* 74: 2737.
- Gunasinghe U, Flasiniski S, Nelson R y Cassidy B, 1994, *Journal of General Virology* 75: 2519.
- Hanahan D, 1985, en *DNA Cloning. A Practical Approach*, Cap. 1, editado por Glover D, IRL Press.

- Hari V, 1981, *Virology* 112: 391.
- Hari V, 1995, *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*, III: cap. 1, editado por Singh U. Pergamon/Elsevier Science Ltd. Oxford U.K.
- Hellmann G, Shaw J y Rhoads R, 1988, *Virology* 163: 554.
- Hellmann G, Thornbury D, Hiebert E, Shaw J, Pirone T y Rhoads R, 1983, *Virology* 124: 434.
- Hemenway C, Fang R, Kaniewski J, Chua N y Tumer N, 1988, *EMBO-Journal* 7: 1273.
- Henikoff S, 1984, *Gene* 28: 357.
- Hidaka M, Yoshida Y, Masaki H, Namba S, Yamashita S, Tsuchizaki T y Uozumi T, 1992, *Nucleic Acids Research* 20: 3515.
- Hiebert E, Thornbury D y Pirone T, 1984, *Virology* 135: 1.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T y Kumashiro T, 1994, *The Plant Journal* 6: 271.
- Hobbs S, Kpodar P y DeLong C, 1990, *Plant Molecular Biology* 15: 851.
- Hobbs S, Warkentin T y DeLong C, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 17.
- Hodgman T, 1988, *Nature* 333: 22 (erratum 333: 578).
- Hollings M y Brunt A, 1981a, *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* N° 245.
- Hollings M y Brunt A, 1981b, *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, cap. 23, editado por E. Kurstak, Elsevier Biomedical Press.
- Hooykaas P y Schilperoort R, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15.
- Horsh R, Fry J, Hoffmann N, Eicholtz D, Rogers S y Fraley R, 1985, *Science* 227: 1229.
- Jefferson R, 1987, *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387.
- Johal G y Briggs S, 1992, *Science* 258: 985.
- Johansen E, Rasmussen O, Heide M y Borkhardt B, 1991, *Virus Genes* 5: 377.
- Jongedijk E, Schutter A, Stolte T, van den Elzen P y Cornelissen B, 1992, *Bio/Technology* 10: 422.
- Jorgensen R, 1995, *Science* 268: 686.
- Jorgensen R, 1990, *Trends in Biotechnology* 8: 340.
- Kaniewsky W, Lawson C, Sammons B, Haley L, Hart J, Delannay X y Tumer N, 1990, *Bio/Technology* 8: 750.
- Kasschau K y Carrington J, 1995, *Virology* 209: 268.
- Kawchuk L, Martin R y McPherson J, 1990, *Molecular Plant Microbe Interactions* 3: 301.

- Kawchuk L, Martin R y McPherson J, 1991, *Molecular Plant Microbe Interactions* 4: 247.
- Keen N, 1990, *Annual Review of Genetics* 24: 447.
- Klein P, Klein R, Rodríguez-Cerezo E, Hunt A y Shaw J, 1994, *Virology* 204: 759.
- Klein T, Arentzen R, Lewis P y Fitzpatrick-McElligott S, 1992, *Bio/Technology* 10: 286.
- Knuhtsen H, Hiebert E y Purciful D, 1974, *Virology* 61: 200.
- Knutzon D, Thompson G, Radke S, Johnson W, Kanuf V y Kridl J, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2624.
- Kollár A, Thole V, Dalmay T, Salamon P y Balázs E, 1993, *Biochimie* 75: 623.
- Koncz C y Schell J, 1986, *Molecular and General Genetics* 204: 383.
- Kruger K, Grabowski P, Zaug J, Sands J, Gottschling D y Cech T, 1982, *Cell* 31: 147.
- Lain S, Martín M, Riechmann J, y García J, 1991, *Journal of Virology* 65:1.
- Lain S, Riechmann J y García J, 1989a, *Virus Research* 13: 157.
- Lain S, Riechmann J y García J, 1990, *Nucleic Acids Research* 18: 7003.
- Lain S, Riechmann J, Martín M y García J, 1989b, *Gene* 82: 357.
- Lamb C, 1994, *Cell* 76: 419.
- Lamb C, Lawton M, Dron M y Dixon R, 1989, *Cell* 56: 215.
- Langenberg W, 1986, *Journal of General Virology* 67: 1161.
- Laursen C, Krzyzek R, Flick C, Anderson P y Spencer T, 1994, *Plant Molecular Biology* 24: 51.
- Lawson C, Kaniewski W, Haley L, Rozman R, Newell C, Sanders P y Tumer N, 1990, *Bio/Technology* 8: 127.
- Lawson C y Hearon S, 1971, *Virology* 44: 454.
- Li X y Carrington J, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 457.
- Lindbo J y Dougherty W, 1992a, *Molecular Plant Microbe Interactions* 5: 144.
- Lindbo J y Dougherty W, 1992b, *Virology* 189: 725.
- Lindbo J, Silva-Rosales L y Dougherty W, 1993a, *Seminars in Virology* 4: 369.
- Lindbo J, Silva-Rosales L, Proebsting W y Dougherty W, 1993b, *The Plant Cell* 5: 1749.
- Loesh-Fries L, Merlo D, Zinnen T, Burhop L, Hill K, Drahn K, Jarvis N, Nelson S y Halk E, 1987, *EMBO Journal* 6: 1845.
- Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S y Baulcombe D, 1993, *EMBO Journal* 12: 379.

- MacFarlane S y Davies J, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5829.
- MacKenzie D y Tremaine J, 1990, *Journal of General Virology* **71**: 2167.
- Maiss E, Timpe U, Briske A, Jelkman W, Casper R, Himmler G, Mattanovich D y Katinger H, 1989, *Journal of General Virology* **70**: 513.
- Malnoë P, Farinelli L, Collet G y Reust W, 1994, *Plant Molecular Biology* **25**: 963.
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J y Goldberg R, 1990, *Nature* **347**: 737.
- Marotto J, 1983, *Horticultura Herbácea Especial*, Editorial Mundi Prensa, Madrid.
- Marsh L, Dreher T y Hall T, 1988, *Nucleic Acids Research* **16**: 981.
- Martín M y García J, 1991, *Journal of General Virology* **72**: 785.
- Martineau B, Summerfelt K, Adams D y DeVerna J, 1995, *Bio/Technology* **13**: 250.
- Matzke M y Matzke A, 1991, *Plant Molecular Biology* **16**: 821.
- Matzke M, Neuhuber F y Matzke A, 1993, *Molecular and General Genetics* **236**: 379.
- Matzke M, Priming M, Trnovsky J y Matzke A, 1989, *EMBO Journal* **8**: 643.
- May G, Afza R, Mason H, Wiwcko A, Novak F y Arntzen C, 1995, *Bio/Technology* **13**: 486.
- McDonnell R, Clark R, Smith W y Hinchee M, 1987, *Plant Molecular Biology Reporter* **5**: 380.
- Mersereau M, Pazour G y Das A, 1990, *Gene* **90**: 149.
- Meyer P, Linn F, Heidmann I, Meyer H, Niedenhof I y Saedler H, 1992, *Molecular and General Genetics* **231**: 345.
- Milne R, 1988, *The Plant Viruses. The filamentous Plant Viruses*, Vol: 4, editado por Milne R, New York Plenum Press.
- Mink G, 1993, *Annual Review of Phytopathology* **31**: 375.
- Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen R, Keizer P, Stiekema W y Nap J, 1994, *The Plant Cell* **6**: 417.
- Mori M, Mise K, Okuno T y Furusawa I, 1992, *Journal of General Virology* **73**: 169.
- Morton R y Hooykaas P, 1995, *Molecular Breeding* **1**: 123.
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brigneti G y Baulcombe D, 1995, *The Plant Journal* **7**: 1001.
- Murashige T y Skoog F, 1962, *Physiol. Plant.* **15**: 431.
- Murphy J, Rhoads R, Hunt A y Shaw J, 1990, *Virology* **178**: 285.

- Murphy J, Rychlick W, Rhoads R, Hunt A y Shaw J, 1991, *Journal of Virology* 65: 511.
- Namba S, Ling K, Gonsalves C, Slightom J y Gonsalves D, 1992, *Phytopathology* 82: 940.
- Napoli C, Lemieux C y Jorgensen R, 1990, *The Plant Cell* 2: 279.
- Nawrath C, Poirier Y y Somerville C, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12760.
- Nejidat A y Beachy R, 1990, *Molecular Plant Microbe Interactions* 3: 247.
- Nelson M y Wheeler R, 1978, *Phytopathology* 68: 979.
- Nelson R, Powel-Abel P y Beachy R, 1987, *Virology* 158: 126.
- Nicolaisen M, Johansen E, Poulsen G y Borkhardt B, 1992, *FEBS Letters* 303: 169.
- Nicolas O y Laliberté J, 1992, *Journal of General Virology* 73: 2785.
- Nida D, Anjos J, Lomonosoff G y Ghabrial S, 1992, *Journal of General Virology* 73: 157.
- Osbourn J, Watts J, Beachy R y Wilson M, 1989, *Virology* 172: 370.
- Pan A, Yang M, Tie F, Li L, Chen Z y Ru B, 1994, *Plant Molecular Biology* 24: 341.
- Pang S, Nagpala P, Wang M, Slightom J y Gonsalves D, 1992, *Phytopathology* 82: 1223.
- Pang S, Slightom J y Gonsalves D, 1993, *Bio/Technology* 11: 819.
- Pappu S, Pappu H, Rybicki E y Niblett C, 1994, *Journal of General Virology* 75: 239.
- Parks T y Dougherty W, 1991, *Virology* 182: 17.
- Pellegrineschi A, Damon J, Valtorta N, Paillard N y Tepfer D, 1994, *Bio/Technology* 12: 64.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M y Tordo N, 1989, *EMBO Journal* 8: 3867.
- Ponz F y Bruening G, 1986, *Annual Review of Phytopathology* 24: 355.
- Powel P, Sanders P, Tumer N, Fraley R y Beachy R, 1990, *Virology* 175: 124.
- Powel-Abel P, Nelson R, De B, Hoffmann N, Rogers S, Fraley R y Beachy R, 1986, *Science* 232: 738.
- Puurand Ü, Mäkinen K, Paulin L y Saarma M, 1994, *Journal of General Virology* 75: 457.
- Rabinowicz P, Bravo-Almonacid F y Mentaberry A, 1993, *Plant Physiology* 103: 1023.
- Register J y Beachy R, 1988, *Virology* 166: 524.
- Restrepo M, Freed D y Carrington J, 1990, *The Plant Cell* 2: 987.

- Restrepo-Hartwig M y Carrington J, 1994, *Journal of Virology* 68: 2388.
- Rezaian M, Skene K y Ellis J, 1988, *Plant Molecular Biology* 11: 463.
- Riechmann J, Lain S y García J, 1989, *Journal of General Virology* 70: 2785.
- Riechmann J, Lain S y García J, 1992, *Journal of General Virology* 73:1.
- Robaglia C, Durand Tardif M, Tronchet M, Boudazin G, Astier-Manifacier S y Casse-Delbart F, 1989, *Journal of General Virology* 70: 935.
- Rodríguez-Cerezo E, Ammar E, Pirone T y Shaw J, 1993, *Journal of General Virology* 74: 1945.
- Rothberg P, Harris T, Nomoto A y Wimmer E, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4868.
- Rubino L, Lupo R y Russo M, 1993, *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 729.
- Sanders P, Sammons B, Kaniewski W, Haley L, Layton J, LaVallee, Delannay X y Tumer N, 1992, *Phytopathology* 82: 683.
- Sanford J y Johnston S, 1985, *Journal of Theoretical Biology* 113: 395.
- Sanger F, Nicklen S y Coulson A, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463.
- Sautter C, Waldner H, Neuhaus-Url G, Galli A, Neuhaus G y Potrykus I, 1991, *Bio/Technology* 9: 1080.
- Shade R, Schroeder H, Pueyo J, Tabe L, Murdock L, Higgins T y Chrispeels M, 1994, *Bio/Technology* 12: 793.
- Shahabuddin M, Shaw J y Rhoads R, 1988, *Virology* 163: 635.
- Shukla D, Strike P, Tracy S, Gough K y Ward C, 1988, *Journal of General Virology* 69: 1497.
- Shukla D y Ward C, 1989, *Advances in Virus Research* 36: 273.
- Shukla D y Ward C, 1988, *Journal of General Virology* 69: 2703.
- Smith C, Watson C, Bird C, Ray J, Schuch W y Grierson D, 1990, *Molecular and General Genetics* 224: 477.
- Smith H, Swaney S, Parks D, Wernsman E y Dougherty W, 1994, *The Plant Cell* 6: 1441.
- Soumounou Y y Laliberté J, 1994, *Journal of General Virology* 75: 2567.
- Stark D y Beachy R, 1989, *Bio/Technology* 7: 1257.
- Steinbecke P, Herget T y Schreier P, 1992, *EMBO Journal* 11: 1525.
- Streber W, Kutschka U, Thomas F y Pohlenz H, 1994, *Plant Molecular Biology* 25: 977.
- Takeda N, Kuhn R, Yang C, Takegami T y Wimmer E, 1986, *Journal of Virology* 60: 43.
- Tarkzynski M, Jensen R y Bohnert H, 1993, *Science* 259: 508.

- Taschner P, van der Kuyl A, Neeleman L y Bol J, 1991, *Virology* **181**: 445.
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martins D, Cattaneo A y Galeffi P, 1993, *Nature* **366**: 469.
- Teycheney P y Dietzgen R, 1994, *Virus Research* **31**: 235.
- Tennant P, Gonsalves C, Ling K, Fitch M, Manshardt R, Slightom L y Gonsalves D, 1994, *Phytopathology* **84**: 1359.
- Thornbury D, Hellmann G, Rhoads R y Pirone T, 1985, *Virology* **144**: 260.
- Thornbury D, Patterson C, Dessens J y Pirone T, 1990, *Virology* **178**: 573.
- Thornbury D y Pirone T, 1983, *Virology* **125**: 487.
- Tobin G, Young D y Flanagan J, 1989, *Cell* **59**: 511.
- Tumer N, Kaniewski W, Haley L, Gehrerke L, Lodge J y Sanders P, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2331.
- Valera-Montero L y Ochoa-Alejo N, 1992, *Plant Science* **84**: 215.
- van Blokland R, van der Geest N, Mol J y Kooter J, 1994, *The Plant Journal* **6**: 861.
- van der Krol A, Mur L, Beld M, Mol J y Stuitje A, 1990, *The Plant Cell* **2**: 291.
- van der Kuyl A, Neeleman L y Bol J, 1991, *Virology* **183**: 731.
- van der Meer J, Dorssers L, van Kammen A y Zabel P, 1984, *Virology* **132**: 413.
- van der Salm T, Bosch D, Honée G, Feng L, Munsterman E, Bakker P, Stiekema W y Visser B, 1994, *Plant Molecular Biology* **26**: 51.
- van der Vlugt R, 1993, *Tesis Doctoral*, pag: 25, Wageningen, Nederlands.
- van der Vlugt R, Ruiters R y Goldbach R, 1992, *Plant Molecular Biology* **20**: 631.
- van Dun C, Overduin B, van Volten-Doting L y Bol J, 1988a, *Virology* **164**: 383.
- van Dun C, van Volten-Doting L y Bol J, 1988b, *Virology* **163**: 572.
- van Rooijen G y Moloney M, 1995, *Bio/Technology* **13**: 72.
- Vardi E, Sela I, Edelbaum O, Livneh O, Kuznetsova L y Stram Y, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7513.
- Verchot J y Carrington J, 1995, *Journal of Virology* **69**: 3668.
- Verchot J, Herndon K y Carrington J, 1992, *Virology* **190**: 298.
- Verchot J, Koonin E y Carrington J, 1991, *Virology* **185**: 527.
- Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch H, Liao Y, Kreuzaler F y Fischer R, 1995, *Molecular Breeding* **1**: 39.
- Wang H, Yeh S, Chiu R y Gonsalves D, 1987, *Plant Disease* **71**: 491.

- Ward C y Shukla D, 1991, *Intervirology* 32: 269.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L y Sanger H, 1994, *Cell* 76: 567.
- Whitham S, Dinesh-Kumar S, Choi D, Hehl R, Corr C y Baker B, 1994, *Cell* 78: 1101.
- Yie Y, Zhao F, Zhao S, Liu YZ, Liu YL y Tien P, 1992, *Molecular Plant Microbe Interactions* 5: 460.
- Yoder J y Goldsbrough A, 1994, *Bio/Technology* 12: 263.
- Yu-wen W, Mei-zhu Y, Nai-sui P y Zhang-liang C, 1991, *Acta Botanica Sinica* 33: 780.
- Zaitlin M, Anderson J, Perry K, Zhang L y Palukaitis P, 1994, *Virology* 201: 200.