Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estrategias moleculares para la expresión combinada de genes en plantas transgénicas

Ceriani, María Fernanda

1996

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:
Ceriani, María Fernanda. (1996). Estrategias moleculares para la expresión combinada de genes en plantas transgénicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2810_Ceriani.pdf

Cita tipo Chicago:
Ceriani, María Fernanda. "Estrategias moleculares para la expresión combinada de genes en plantas transgénicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2810_Ceriani.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estrategias moleculares para la expresión combinada de genes en plantas transgénicas

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

María Fernanda Ceriani

Director: Dr. H. Esteban Hopp
Codirector: Dr. Roger N. Beachy

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología. CICV. INTA Castelar.

N° 2810
53

Todos sabemos que hacer una tesis no es tan fácil y sobre todo, que requiere muuuucho mucho tiempo, sudor y lágrimas. Llegado el momento de anillar, uno escribe a las apuradas y muy engominada una ristra de agradecimientos, en la cual deja a medio mundo olvidado... Lo que sigue es mi intento por no caer en lo de siempre, asi que a todo aquel que se detenga en estas páginas, Paciencia...
Quisiera agradecer...

A Esteban, por darme esta oportunidad apenas después de decirme "no tengo plata" allá por el año ´87, y desde entonces no cejar ni un ápice en su empeño por contagiarme su optimismo y confianza y, muy especialmente, por la paciencia innegable de todos estos años. Y por haberme impulsado a adquirir una experiencia más global, empujándome a hacer docencia, asistir a cursos...

A Nionia, una pila de cosas, empezando por haberme hecho un lugar en su proyecto, por las hs y hs de mesada (de aprendizaje y charla!) que gracias a eso compartimos, por las caminatas por Laguna Beach buscando la punta del ovillo.... y por el increíble sostén que significa para mí tenerla hoy en el escritorio, a mi lado (.....y me quedo corta!).

Renglón aparte se merecen Ceci y Seba. A Ceci quiero agradecerle haber cedido a la presión dejándose arrastrar hasta el far west para darle más forma al grupo "papa", para entonces recibir en adopción el legado transgénico (vaya suerte!!). Y a Seba, porque habiendo heredado el monumental fardo mientras yo estaba lejos, no sólo no se amendrentó con mi llegada ni la fama que me precedió, sino que es cada día una fuente de soluciones a mis problemas...

A mis amigos del entonces IBM (en aquella época en que no éramos tantos) empezando por Alez (el Salvador) y Ser y Lau y Silvia (ESO es hacer historia!) por el compañerismo, algún que otro tip para resolver encrucijadas y esa especie de amistad que fue construyéndose a la hora del café.

A Silvito y Oski, que ya son una institución, por las miles de respuestas inventadas y –las más– hasta acertadas a lo largo de este tiempo...

A Lela, Angel y Norbius, por haber sido el puntapié inicial por lograr la tan ansiada masa crítica. Por las ganas de responder a mis preguntas, siempre a las corridas y para ayer!

A los que hoy pululan por los pasillos, empezando con Magda (con esa energía loca inigualable), Dani, Susi, Dalia, Diego, Laurita, Pau, (y más recientemente) Analía, con los que compartí cada almuerzo, cada mate, la desesperación por nunca llegar a tiempo.... También a Osvaldo (por las veces que me) y Ale E (que ni aun a la distancia logró olvidarse de mi genio)

A todo aquel que durante estos dos últimos meses necesitó usar la Mac y sonrió en lugar de maldecir al descubrir que yo había echado raíces frente a ella....

A Tere y Nilda nada menos que por alivianarme las hs de flujo (hasta hacerlas desaparecer!).

A Eduardo (alias "el Dr.") por el apoyo (desde lo institucional) que me ofreció cada vez que fue necesario, y porque no, por aquellas viejas épocas en que había tiempo para paddle...

Al laboratorio de plantas del INGEBI, y especialmente a Fernando, por suministrar las construcciones que sirvieron de base para el subclonado de los genes de cápside de PVX y PVY.

A Roger, por haber interpretado mis ganas de hacer a pesar de mis incomprensibles balbuceos en inglés. Por su optimismo y el constante "vos podés" con que terminaban nuestras charlas, y por la oportunidad que significó para mi el habitar en un lab donde tantas personas, culturalmente tan distintas, pateaban para el mismo lado...

A José, por abrirse a tener "una intrusa" en su proyecto, por la punta de cosas que aprendí con él, y desde ya por el protocolo de la mejor paella que probaré en mi vida.

A Hal, por la montaña de cosas que me enseñó, por el inglés y el slang, y porque como labmate fue una verdadera maravilla.

A Marie, por la infinidad de charlas divertidas y de las otras, y por la alegría de reencontrarla... y muy muy especialmente por socorrerme de la locura de mis últimas semanas en SD, y por hacerme más fácil el transplante...

A la gente del lab de Roger, quienes me ayudaron a librarme del prurito de trabajar en el "primer mundo". Entre ellos, a los que realmente estuvieron cerca, encabezados por Iván (a quien le debo, además, mucho esfuerzo por obtener las transgénicas), Hervé, Andreas, Bert, Jesús, Caro y Pat, con quienes compartí desde protocolos y cafés, hasta cenas y fiestas a las 6.30 pm!!!!.

A Xime, los Nionios y los Pochos, porque en distintos momentos y de diferentes formas fueron el muro de contención indispensable para bancar con altura la distancia...

A Pau, por (y con) tanto afecto, aquí y allá, y por todas esas charlas que ayudaron cuando hubo que tomar decisiones...

A Ana, por significar un espacio en mi vida donde la ciencia no ocupa lugar.

A mis viejos, por haberme bancando primero la locura de la facu y ahora ésto; por haber sonreído cuando estaba lejos pero más ahora, aún con tanta cercanía!!

A Sil, por no flaquear en su intento por desasnarme con su punto de vista agronómico pero, más que nada, por estar ahí, siempre al alcance de la mano... y a Mar, bien no se porqué.

..... y a Ale, que se bancó estoicamente tanta locura de casi dos años de fechas límites, por sus maravillosos capuccinos, por sus inagotables ganas de poner el hombro y porque siempre sea, por sobre todo, mi refugio.

Abreviaturas.

AcO: ácido acético.
ANA: ácido naftalenacético.
BAP: bezilaminopurina.
DEPC: dietildipirocarbamato.
2,4D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
DTT: ditiotreitol.
EDTA: ácido etilendiaminotetracético.
GUS: enzima β-glucuronidasa.
kDa: kilodalton.
Km: sulfato de kanamicina.
LUC: enzima luciferasa.
MES: ácido morfolinoetansulfónico.
MU: metilumbeliferona.
MUG: metilumbeliferil glucurónido.
nt: nucleótidos.
ON: durante toda la noche.
ORF: marco abierto de lectura.
kpb: kilopares de bases.
PCR: reacción de amplificación en cadena de la polimerasa.
PLRV: virus del enrollamiento de la hoja de la papa.
PVX: virus de la papa X.
PVY: virus de la papa Y.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
TMV: virus del mosaico de tabaco.
TRIS-HCl: hidroximetilaminometano.
X-GLU: ácido 5-bromo-4-cloro- β D-glucurónico.

Indice

INTRODUCCION
EL CULTIVO DE PAPA. 1
Importancia del cultivo en la Argentina 3
Problemas que obstaculizan la explotación plena del cultivo 3
VIROSIS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE PAPA 4
Características generales de los potyvirus. 5
Organización genómica de los potyvirus 6
Características generales de los luteovirus: 12
Organización genómica del virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) 14
Características generales de los potexvirus. 16
Organización del genoma de PVX. 17
Infección conjunta de PVX y PVY en la naturaleza 18
TRANSFORMACION GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM.* 20
Características del plásmido Ti. 20
Los genes *vir* y el mecanismo de transferencia del T-ADN 21
Desarrollo de vectores para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium.* 24
APLICACION DE LA INGENIERIA GENÉTICA PARA EL MEJORAMIENTO. 25
Resistencia mediada por proteína de cápside: 26
Acerca del mecanismo de protección 26
√ Análisis del mecanismo de resistencia en el sistema TMV/ *Nicotiana tabacum.* 27
√ Análisis del mecanismo de resistencia para PVX. 30
√ Análisis del mecanismo de resistencia en potyvirus. 32
√ El fenómeno de resistencia en el caso de PLRV 36
OBTENCION DE PLANTAS CON RESISTENCIA COMBINADA 38
Características del cassette de expresión: 39
OBJETIVO 40

MATERIALES Y METODOS.
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. 42
Genotipos vegetales empleados 43
Vectores de clonado. 43

CLONADO, SECUENCIACION Y CONFIRMACION DEL PROCESAMIENTO CORRECTO *IN VITRO* DE LAS CONSTRUCCIONES REALIZADAS. 47
Construcción de los plásmidos derivados de PRO1. 47
Construcción de las fusiones a GUS. 49
Clonado de los productos de PCR: 49
Obtención de las construcciones conteniendo los genes de cápside viral. 51
Obtención de los clones derivados de ObNL3-ΔC. 53
Purificación de ADN plasmídico por el método de ebullición ("Boiling method"). 54
Relevamiento directo de colonias bacterianas por PCR 55
Preparación y electroporación de células competentes de *E.coli* 56
Transcripción y traducción in vitro de las construcciones derivadas de PRO1 57
1) Preparación del ADN a utilizar como templado: 57
2) Transcripción *in vitro*. 57
3) Traducción *in vitro* : 58
Inmunoprecipitación de proteínas 59
ENSAYOS DE EXPRESION TRANSITORIA EN PROTOPLASTOS 60
Reacciones de transcripción *in vitro* con el fin de obtener transcriptos infecciosos. 60
Mantenimiento y cultivo de las suspensiones celulares. 61
Obtención de protoplastos y electroporación. 61
Determinación de la actividad GUS. 62
Marcación *in vivo* de proteínas. 63
Extracción de ARN de protoplastos en cultivo. 64
Inoculación de plantas de tabaco con los transcriptos infectivos. 64
TRANSFORMACION Y CHEQUEO DE LAS AGROBACTERIAS 65
Conjugación triparental 65
Extracción de ADN total de *Agrobacterium* 65
OBTENCION Y CHEQUEO DEL MATERIAL TRANSGÉNICO: 66
Transformación de papa mediada por *Agrobacterium*. 66
Transformación de tabaco mediada por *Agrobacterium*. 67
Extracción de ADN de plantas de tabaco. 68

Extracción de ARN a partir de tejidos vegetales.....69

RESULTADOS Y DISCUSION.
1-CONSTRUCCION DE VARIANTES DEL CASSETTE DE EXPRESION PRO1.....71
Construcción de PRO1.NG y sus derivados.....71
Caracterización del procesamiento *in vitro* de las distintas versiones de NIa.....74
Caracterización de la actividad *in vivo* de los diferentes clones.....77
Subclonado en pMON921.....77
Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.....78
DISCUSION.....81
2-LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS DIFERENTES VERSIONES DE LA PROTEASA.....84
Construcción de PRO3.NG y sus derivados.....84
Caracterización de la actividad *in vivo* de las fusiones.....87
Subclonado en pMON921.....87
Subclonado en ObNL3 ΔC.....88
Obtención y chequeo de los transcriptos infectivos.....90
Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.....92
Localización subcelular de las fusiones.....94
DISCUSION.....96
3-CONSTRUCCION Y ANALISIS DE LOS CLONES CONTENIENDO LOS GENES DE CAPSIDE DE INTERÉS.....99
Clonado de los genes de cápside viral:.....99
√ Obtención de PRO10.YN:.....100
√ Obtención de PRO10.XYN y PRO10.YNX:.....101
√ Obtención de PRO10.LRYN:.....101
Caracterización del procesamiento *in vitro* de las distintas construcciones.....102
Inmunoprecipitación de los productos de la traducción *in vitro*.....105
DISCUSION.....108
4-EVALUACION DE LAS CONSTRUCCIONES VIRALES *IN VIVO*.....110
Subclonado en el vector de expresión ObΔC-NL3.....110

Obtención y chequeo de los transcriptos infectivos. 114
Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco. 116
DISCUSION 119
5-SUBCLONADO EN UN VECTOR APTO PARA LA TRANSFORMACION ESTABLE DE PLANTAS. 123
Transferencia de las construcciones a *Agrobacterium tumefaciens* mediante conjugación triparental. 123
Transformación estable de plantas de tabaco 127
6-COTRANSFORMACION DE PLANTAS DE PAPA CON AGROBACTERIAS CONTENIENDO GENES DE CAPSIDE VIRAL. 128
Relevamiento de las plantas transgénicas para la presencia de cada uno de los genes de cápside. 131
Diseño de los ensayos a campo en vistas a evaluar la capacidad de resistencia de las distintas líneas transgénicas. 138
DISCUSION 140

CONCLUSIONES. 142

BIBLIOGRAFIA. 146

Introducción

EL CULTIVO DE PAPA.

La papa se originó en el altiplano peruano-boliviano hace unos 8.000 años y era ampliamente cultivada en Sudamérica a la llegada de la colonización española. El cultivo fue exportado a Europa (posiblemente a España y luego a Inglaterra) hacia fines del siglo XVI, desde donde se extendió al resto del mundo durante los dos siglos siguientes. En Sudamérica, la producción permaneció restringida a las regiones de mayor altitud hasta los comienzos del siglo XX, empleándose en la misma métodos tradicionales de muy baja productividad [Ross, H, 1986].

Ante la creciente demanda mundial de alimentos y la crítica situación en que se debaten muchos países no desarrollados, la producción de este cultivo es motivo de renovado interés. En este sentido, el cultivo presenta las ventajas de ser altamente intensivo y remunerativo, con rendimientos que alcanzan las 3,6 tn/ha de materia seca. Los rendimientos en calorías (7,1x106 kcal/ha) y en proteínas (196 kg/ha) se comparan favorablemente con los de los cereales. Además, debido a un ciclo reproductivo más corto, estos rendimientos resultan también competitivos frente a los de otras tuberosas y raíces [Ross, H, 1986].

Durante el período de 1974-1986, se asistió a un crecimiento constante en la productividad del cultivo en el conjunto del mundo desarrollado. Así por ejemplo, pese a que el área sembrada disminuyó en un 15%, el incremento de productividad en América del Norte fue de cerca del 11%. Por su parte, los países en desarrollo incrementaron considerablemente tanto el área sembrada (10%) como la productividad. Como resultado, en los 12 años considerados, estos países lograron un incremento productivo de cerca del 35% [FAO, 1991].

En 1989, el conjunto de América Latina produjo 13.1x106 tn de papa, lo cual representa el 4.2% del total mundial. Aunque ponderable, este valor es bajo si se

consideran las producciones de América del Norte y Europa Occidental (67x106 tn), de Europa Oriental y Rusia (130x106 tn) y de Asia (30x106 tn). Llamativamente, en el período examinado (1974-1986), el incremento de producción en América Latina (15%) se produjo sin incrementos significativos del área sembrada. No obstante, la productividad del cultivo es altamente variable de país en país, con valores que van desde 4,7 tn/ha (Bolivia, 1979-81) hasta 24,8 tn/ha (Argentina, 1989) [FAO, 1991].

Las estadísticas de consumo disponibles demuestran que existe un amplio espacio potencial para incrementar la participación de la papa en la alimentación primaria de los países en desarrollo. Así, mientras el consumo anual *per capita* en América Latina está por debajo de los 10 kg, en los países desarrollados éste es de 50 a 80 kg. Una de las limitaciones más grandes de la producción es de índole económica. Debido a las condiciones imperantes en los países en desarrollo, la papa es considerada una producción de "alta inversión". Por esta razón, muchos pequeños productores no pueden reunir los medios para comprar los insumos necesarios para mejorar los rendimientos, tales como papa-semilla de buena calidad, fertilizantes y herbicidas [FAO, 1991].

El control de plagas, la disminución en el uso de mano de obra intensiva, la disminución de la cantidad y uso de herramientas y la renovación menos frecuente de la semilla comprada o de producción propia por parte del productor son las principales variables que inciden sobre los costos de producción. Tanto por razones económicas como ambientales, la introducción de resistencia genética a los distintos patógenos representa la estrategia más adecuada para encarar esta cuestión. Sin embargo, tal como se comentará más adelante, en el caso de la papa, el mejoramiento tradicional es lento y laborioso, y tampoco se dispone de genes de resistencia adecuados para la mayoría de los patógenos que la afectan. En este marco, el uso de

técnicas de ingeniería genética para introducir genes de interés a partir de otros organismos, brinda una oportunidad para superar estos problemas. Este enfoque presenta además la ventaja de no demandar cambios en el manejo previo a la siembra, durante el desarrollo del cultivo, ni en la etapa posterior a la cosecha, dado que las modificaciones de interés están incorporadas en el material vegetal. En consecuencia, las mejoras podrían introducirse directamente en los actuales esquemas productivos con alta probabilidad de que los beneficios de su adopción se manifiesten en el corto plazo.

Importancia del cultivo en la Argentina

La producción de papa está destinada principalmente al mercado interno. El consumo anual per capita es uno de los más altos de Latinoamérica (61.2 kg). La principal región de producción está localizada en el Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, aunque también existen zonas de cultivo en la región Central y Noroeste del país. En estas últimas, las condiciones climáticas permiten la realización de dos cosechas anuales. La superficie total dedicada a esta cosecha fue de 115.000 ha en 1989, [FAO, 1991] registrándose una producción total de 1.836.000 tn y un rendimiento promedio de 24,7 tn/ha. Del área sembrada, unas 15.000 ha están dedicadas a la producción de papa-semilla. Las variedades más utilizadas para el consumo son Spunta (cerca del 60% del mercado), de origen holandés, Huinkul MAG, desarrollada en Argentina y otras variedades como Kennebec y Bonaerense la Ballenera, que son producidas en porcentajes menores para el consumo fresco y su procesamiento industrial. Excepto Huinkul MAG, en la que se introdujo tolerancia a campo a PVY, estas variedades son susceptibles a virus y otros patógenos en mayor o menor medida [Vigliola, 1986].

Problemas que obstaculizan la explotación plena del cultivo

La papa es susceptible a muchas enfermedades, algunas extendidas mundialmente y otras confinadas a áreas más limitadas. Los agentes fitopatogénicos incluyen bacterias, hongos, virus y nematodes [Mendoza, 1986]. Las enfermedades provocadas por estos patógenos provocan las mayores pérdidas de producción, razón por la cual la búsqueda de resistencia genética es de alta prioridad para los mejoradores de todo el mundo. Las enfermedades pueden reducir el rendimiento en cinco formas principales: a) causando la muerte prematura del follaje; b) inhibiendo el crecimiento y reduciendo la eficiencia fotosintética; c) disminuyendo el transporte de fotosintatos a los tubérculos; d) causando el pudrimiento de los tubérculos durante la siembra y antes de la recolección y e) afectando la conservación del tubérculo durante el estacionamiento [Rich, 1983].

VIROSIS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE PAPA.

Las infecciones virales producen pérdidas económicas significativas en tres formas: a) directas, a través de una disminución del rendimiento, con cifras que pueden llegar hasta el 50% en algunos años; b) indirectas, a través de un incremento en los costos debido a la producción de papa-semilla libre de virus (por ejemplo, del 20 al 25% del costo de producción en Argentina y del 40% en Brasil); c) por imposibilidad de obtener productos con fines de exportación, debido a las limitaciones internacionales impuestas a la comercialización de materiales fuera de las tolerancias fitosanitarias y de la calidad permitidas. Los altos costos de producción se deben a que las papas se multiplican clonalmente sembrando tubérculos o trozos de tubérculo. Este método de propagación favorece la transmisión y diseminación de los patógenos almacenados. El control se

basa en la siembra de material sano (fiscalizado y certificado) y en evitar la introducción de virus de fuentes externas [Vigliola, 1986]. Las plantas se liberan de virus a partir del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos sometidos a termo y quimioterapia. La propagación del material sano se realiza en zonas con bajos niveles de inóculo viral, lo que determina la producción de distintas categorías de semilla dependiendo del porcentaje de contaminación y del número de ciclos de multiplicación [Hammond, 1990].

Entre las enfermedades de importancia que afectan al cultivo de papa se encuentran las virosis, causadas principalmente por el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV, un luteovirus), el virus Y de la papa (PVY, un potyvirus) y el virus X de la papa (PVX, un potexvirus) cuyas características se detallan a continuación.

Características generales de los potyvirus.

El grupo de los potyvirus es el más grande y económicamente importante entre los 34 grupos y familias de virus de plantas actualmente reconocidos [Ward, CQ et al., 1991]. Contiene unos 180 miembros que representan más del 30% de los virus vegetales, que afectan distintos cultivos en todo el mundo [Ward, CQ et al., 1991]. La mayoría de los miembros de la familia posee un número de hospedantes limitado, y esta especialización minimiza la competencia entre ellos. En la naturaleza se transmiten mecánicamente, a través de semillas de plantas infectadas y mediante distintas especies de áfidos (y en menor proporción por ácaros y moscas blancas) en forma no-persistente. Se ha demostrado que la transmisión mediada por áfidos requiere de dos factores codificados por el virus [Pirone, TP, 1991]: la proteína de cápside y el componente auxiliar ("helper component", HC-PRO). Estas características, sumadas a la gran variedad de cultivos que son afectados por potyvirus, aseguran su presencia en el campo a lo largo de todo el año.

Todos los miembros de la familia comparten ciertas características. Las partículas virales tienen forma de bastones flexibles de 680-900 nm de largo y 11-15 nm de diámetro. El genoma está compuesto por una única molécula de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 10 kb de longitud. Los viriones están formados por unas 2.000 copias de una misma proteína de cubierta y una copia de la proteína VPg.

En contraste con lo que ocurre en la mayoría de los virus, algunas proteínas no estructurales se acumulan en cantidades sustanciales en las células infectadas, lo cual facilitó su estudio. Algunas de ellas se acumulan en el citoplasma formando cuerpos de inclusión en molinete ("pinwheels") que están presentes en todas las células infectadas con potyvirus, o cuerpos de inclusión amorfos (presumiblemente derivados de la proteína HC-PRO [de Mejia, MVG et al., 1985]), que se han detectado sólo en alguno de ellos. Otras (como la proteasa NIa y la replicasa NIb) se acumulan en el núcleo (presentes, por ejemplo, en el caso de TEV).

Hasta el momento se conoce la secuencia completa del TEV ("tobacco etch virus", [Allison, RF et al., 1985a] y [Allison, RF et al., 1986]), del TVMV ("tobacco vein mottling virus", [Domier, LL et al., 1986]), del PPV ("plum pox virus", [Maiss, E et al., 1989]), y del PVY [Robaglia, C et al., 1989], entre otros.

Organización genómica de los potyvirus

Las características principales del genoma de un potyvirus son:

a) Una región 5´ no codificante de ~144 nt, rica en A y U, que puede funcionar como un activador traduccional [Carrington, JC et al., 1990].

b) Un único marco abierto de lectura (de aquí en adelante llamado ORF) de unos 9160 nt (que codificaría para una poliproteína de 340-368 kDa).

c) una región 3´ no codificante de ~190 nt que finaliza en un tracto poliadenilado.

El AUG interno parece ser reconocido por un mecanismo de tipo "leaky scanning" [Riechmann, JL et al., 1991]. El marco abierto de lectura es transcripto y traducido en un único precursor polipeptídico, el cual es (a su vez) procesado por 3 proteasas diferentes (NIa, HC-PRO y P1) en forma co- y post-traduccional, para dar 8 o más productos maduros. Los productos finales (en orden, y a partir del extremo amino) son:

-La proteína P1 [Shukla, DD et al., 1991], cuyo dominio C-terminal tiene actividad de proteasa y es responsable de su propia escición en *cis* [Verchot, J et al., 1991].

Recientemente, Verchot y Carrington demostraron que estimularía en *trans* la replicación del genoma viral (1995a) y que cualquier mutación que debilite su capacidad proteolítica es responsable de la consiguiente inviabilidad del virus (1995b).

-La proteína componente auxiliar, involucrada en la transmisión mediada por áfidos [Thornbury, DW et al., 1985] [Ammar, ED et al., 1994], cuyo dominio C-terminal tiene actividad proteolítica y es responsable de clivarse autocatalíticamente a nivel de su extremo 3´ [Carrington, JC et al., 1989a].

Se ha observado que las mutaciones naturales que residen en la región amino terminal de esta proteína restringen la acumulación en tejidos infectados y disminuyen la gravedad de los síntomas [Thornbury, DW et al., 1990]. Por su parte, la región central podría interactuar con la proteína de cápside y estos complejos activos serían responsables del movimiento a distancia del virus (en especial, el pasaje a través de las células acompañantes hacia los vasos cribosos del floema) [Cronin, S et al., 1995].

-La proteína P3, cuya función no ha podido ser dilucidada hasta el momento debido a la escasa homología existente inclusive entre distintos potyvirus.

En base a la posición que ocupa, y por analogía con una proteína del CPMV ("cowpea mosaic virus"), se ha sugerido

que estaría involucrada en la regulación del procesamiento de la poliproteína viral [Riechmann, JL et al., 1992].

-Un péptido de 6 kDa ($6K_1$, ausente en TEV), presumiblemente involucrado en la replicación del genoma viral por comparación con el péptido 2B de los picornavirus [Lain, S et al., 1989].

-La proteína CI (que forma cuerpos de inclusión citoplasmáticos en forma de molinete) y tiene actividad de ARN helicasa y ATPasa [Riechmann, JL et al., 1992].

-Un segundo péptido de 6 kDa ($6K_2$), anclaría a NIa a la membrana nuclear previo al procesamiento del dipéptido $6K_2$/NIa [Restrepo-Hartwig, MA et al., 1992].

Además, y en base al fenotipo debilitado de variantes conteniendo sitios de clivaje mutados flanqueando esta proteína, los mismos autores propusieron que ambos deben ser funcionales para que la replicación viral sea eficiente [Restrepo-Hartwig, MA et al., 1994].

-La proteína de inclusión nuclear "a" (NIa) con función de VPg y proteasa (ver más adelante).

-La proteína de inclusión nuclear "b" (NIb), con función de ARN polimerasa-ARN dependiente [Domier, LL et al., 1987].

Usando el sistema de expresión de dos híbridos en levadura, Hong et al. (1995) detectaron interacciones entre NIa-NIb, y CP-NIb, y observaron que en este último caso la replicasa debía ser funcional. Por otra parte, la observación de que mutaciones en NIa cercanas al sitio de unión al ácido nucleico (Tir_{62}, ver luego) disminuían la interacción con NIb, les llevó a proponer que al igual que en el caso de los picornavirus, las VPgs de los potyvirus estarían involucradas en la síntesis de ARN de polaridad negativa y positiva, y por lo tanto, que deberían interactuar con la polimerasa en alguno de las estadíos del ciclo replicativo viral.

-La proteína de cápside viral (CP), la cual además de su rol en el ensamblaje y estructura del virión, está involucrada en el movimiento de célula a célula [Dolja, VV et al., 1995], la dispersión sistémica del virus en la planta

[Dolja, VV et al., 1994] y en la transmisión mediada por áfidos [Atreya, CD et al., 1990; Atreya, PL et al., 1991].

La organización general del genoma de los potyvirus (en particular, el de TEV) se muestra en la Figura a continuación.

Figura 1: Organización genómica de un potyvirus.

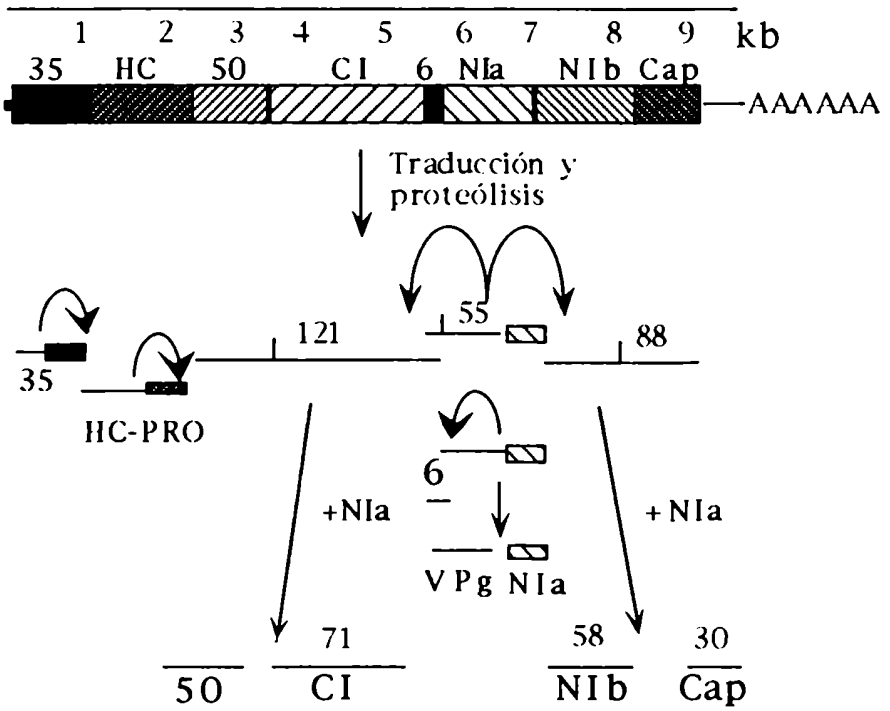


Figura 1: Las proteasas P1 y HC-Pro catalizan la proteólisis en sus respectivos extremos C-terminal únicamente. NIa cataliza el procesamiento proteolítico de la poliproteína en 5 posiciones diferentes [Carrington, JC et al., 1988a; Carrington, JC et al., 1987a] y, además, funciona como VPg. Las flechas indican los puntos de corte de las diferentes proteasas; π indica la región catalítica de las mismas.

La proteína de inclusión nuclear (NIa).

Los productos finales codificados por el genoma de los potyvirus surgen del clivaje proteolítico de un largo precursor polipeptídico. La proteasa NIa es responsable de varias etapas de este procesamiento, reconociendo y

clivando a nivel de un heptapéptido específico [Carrington, JC et al., 1988b]; [Dougherty, WG et al., 1988]:

Glu-X-X-Tir-X-Gln/Gli (o Ser)

NIa se libera de la poliproteína por autoprocesamiento, y es activa tanto en *cis* (en el procesamiento de polipéptidos que la contienen) como en *trans* (sobre una molécula distinta) [Carrington, JC et al., 1987a], tal como se desprende de la Figura 1.

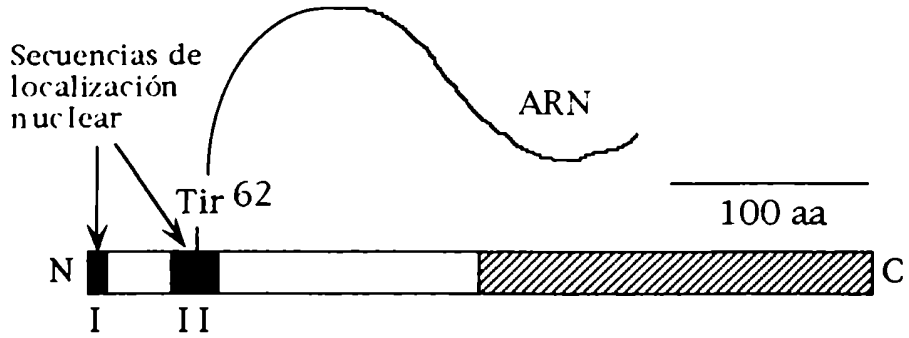
Dougherty y Parks (1989) propusieron que la eficiencia de proteólisis a nivel de los distintos sitios de clivaje podría actuar como un mecanismo regulatorio capaz de controlar las tasas de formación y procesamiento de los diferentes intermediarios polipeptídicos.

El dominio proteolítico de NIa está confinado a la mitad C-terminal de la proteína, mientras que el dominio VPg está localizado cerca del extremo N-terminal. En este último se han encontrado dos regiones que contienen señales de localización nuclear (SLN); la primera abarca los primeros 11 aminoácidos, y la segunda desde el residuo 43 hasta el 72 (Figura 2); se ha reportado que ambas actúan en forma parcialmente independiente aunque para una translocación óptima se requiere la presencia de ambas [Carrington, JC et al., 1991]. Si bien la mayoría de las moléculas de NIa son transportadas hacia el núcleo, se han encontrado partículas virales conteniendo NIa (VPg) unida al genoma viral dentro del citoplasma [Leseman, DE, 1988].

Dougherty et al. (1989) utilizaron mutagénesis dirigida para evaluar el efecto de la alteración de residuos individuales sobre la capacidad catalítica de esta proteasa. Sus resultados sugirieron que los aminoácidos involucrados serían His^{234}, Asp^{269} y Cis^{339}, lo cual es consistente con la hipótesis de que esta proteasa está estructuralmente relacionada a la familia de serin-proteasas similares a tripsina, con una sustitución por Cis a nivel del sitio activo nucleofílico.

La representación diagramática de la proteína NIa se observa en la Figura a continuación.

Figura 2: Representación diagramática de NIa.



1 11
I:GKKNQKKHKLKM

43 72
II:KRKGTTRGMGAKSRKFINMYGFDPTDFSYI

Figura2: En la Figura se muestran los distintos dominios de la proteína de 430 aa. La identificación del residuo tirosina (tir ^{62}) como sitio de unión VPg/ARN fue llevado a cabo por Murphy et al. (1991) y Carrington y Dougherty (1987b). Las secuencias de los 2 dominios de localización nuclear se muestran más abajo en la Figura.

El procesamiento en los extremos N y C-terminal de NIa está mediado por una reacción autoproteolítica. Del mismo modo, el corte en el extremo amino de la proteína de 6 kDa (que está localizada en forma adyacente al N-terminal de NIa en la poliproteína, ver Figura 1) ocurre preferencialmente en *cis* [Carrington, JC et al., 1987a]. El procesamiento de polipéptidos sintéticos en estos 3 sitios autocatalíticos es extremadamente ineficiente cuando la única NIa presente es suplementada en *trans.* En 1992, Restrepo-Hartwig y Carrington demostraron que la proteólisis ocurre primero en el extremo N-terminal de la proteína de 6 kDa, por lo cual se puede encontrar la forma 6

kDa/NIa en el citoplasma. Estos autores observaron además que la fusión de la proteína 6 kDa a NIa impide la translocación de esta última al núcleo. En 1994, los mismos autores reportaron que la proteína de 6 kDa está asociada directamente con la membrana y que estaría involucrada en la replicación viral. La proteína NIa "libre" se acumula principalmente en el núcleo (lo cual posiblemente responda a una estrategia del virus para reducir las concentraciones citoplasmáticas de esta proteína ya que se produce en cantidades equimoleculares a otras, estructurales). De este modo, el procesamiento a nivel del sitio 6 kDa/NIa, durante el ciclo de replicación viral, podría ser un punto de regulación de la concentración de NIa presente en el citoplasma.

Características generales de los luteovirus:

El virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) pertenece al grupo de los luteovirus. Los miembros de este grupo infectan una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas, en las cuales replican casi exclusivamente dentro del floema. Se los encuentra en los vasos cribosos, en las células acompañantes y ocasionalmente en las células del parénquima floemático. Este grupo ha sido difícil de estudiar debido, principalmente, a este hecho de estar confinados en el floema, aunque también a su incapacidad de ser transmitidos mecánicamente y al hecho que las partículas virales son inestables *per se*.

En la naturaleza, los luteovirus se transmiten únicamente a través de la infección persistente (circulativa no propagativa) de áfidos vectores [Duffus, J, 1977]. Las particulas virales son ingeridas junto con el contenido del floema de las plantas hospedantes infectadas y transportadas transcelularmente a través del intestino posterior hasta el hemocele . Las partículas así adquiridas se mantienen infectivas en la hemolinfa durante toda la vida del áfido, aparentemente sin replicación [Eskandari, F et al., 1979]. Una vez que se contactan con las glándulas

salivales, pueden ser transmitidas a través de las mismas, llegando finalmente al ducto salival del cual serían excretadas con la saliva en el momento en que el áfido se alimenta. Recientemente van den Heuvel et al. (1994) identificaron una proteína (llamada simbionina) como la responsable del mantenimiento persistente de PLRV, la cual es producida por una bacteria endosimbionte del áfido; los autores observaron que, en ausencia de simbionina, la proteína de cápside del virus es degradada.

Artificialmente pueden transmitirse, además, mediante injertos o por agroinfección [Leiser, RM et al., 1992].

Los luteovirus son virus icosahédricos pequeños (de 22-26 nm de diámetro). La secuencia nucleotídica completa del ARN genómico ha sido dilucidada para varios de los integrantes de este grupo, incluyendo los aislados PAV y RPV del BYDV ("beet yellow dwarf virus" [Miller, WA et al., 1988] [Vincent, JR et al., 1991]), el PLRV ([Van Der Wilk, F et al., 1989] [Mayo, MA et al., 1989] [del Vas, M, 1993]), el BWYV ("beet western yellow virus" [Veidt, I et al., 1988]) y el BMYV ("beet mild yellowing virus" [Guilley, H et al., 1995]).

Los virus pertenecientes a este grupo (como, por ejemplo, el BYDV -el virus del enanismo amarillo de la cebada- y el PLRV) tienen una marcada importancia desde el punto de vista económico, ya que infectan cultivos de interés comercial.

El PLRV produce una de las enfermedades más severas y antiguamente conocidas de la papa [Rich, 1983] provocando no sólo una marcada disminución del rendimiento sino también la necrosis del tubérculo. Entre las enfermedades de la papa la causada por PLRV es, tal vez, la de mayor importancia económica, por los efectos desvastadores de producirse una infección severa. Los rendimientos de plantas infectadas por PLRV pueden reducirse hasta un 50%. Se estima que en el mundo la infección con este virus provoca un 10% de disminución en el rendimiento, lo cual

equivale a una pérdida de hasta $2x10^7$ toneladas de papa por año [Van Der Wilk, F et al., 1991]. En realidad, estos datos son sólo una subestimación dado que los perjuicios podrían ser mayores si no se utilizaran prácticas de control como el uso de semilla saneada.

Los síntomas de las plantas infectadas por luteovirus son más vagos, generales y menos útiles para el diagnóstico que los correspondientes a otros virus y varían según la especie, la edad y las condiciones fisiólogicas de la planta al momento de infección. Durante la infección primaria, las hojas pueden tornarse amarillas (o rojas, según el caso), curvas y quebradizas ("vidriosas"). En la secundaria (es decir, en plantas crecidas a partir de tubérculos infectados) se observa una disminución en el crecimiento y desarrollo de las plantas infectadas, y enrollamiento de las hojas inferiores. Las superiores se tornan ligeramente cloróticas. Los carbohidratos se acumulan en las hojas afectadas debido a la alteración del transporte a través del floema [Harrison, BD, 1984].

Organización genómica del virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV).

El genoma de PLRV (así como el del resto de los luteovirus) consiste en una única molécula de ARN simple cadena de polaridad positiva de 5,8 kb, que tiene unida-a su extremo 5´- una proteína llamada VPg [Mayo, MA et al., 1982]. No presenta poliadenilación ni estructuras de tipo ARNt en el extremo 3´ [Tacke, E et al., 1989]. Hay pocos nucleótidos no codificantes y gran superposición de ORFs.

Dentro del grupo de los luteovirus se han encontrado ejemplos de dos tipos diferentes de organización genómica.

En el caso de PLRV y BWYV se han identificado 6 ORFs principales.

El ORF 1 se superpone con el ORF 2a y codifica para una proteína de unos 28 kDa, de función desconocida, si bien van der Wilk et al. (1989) propusieron que se trataría de

una proteasa que cliva el producto de 17 kDa (ORF 4) dando lugar a una VPg funcional más pequeña.

Los ORFs 2a y 2 b están solapados (Figura 3) y codifican para péptidos de 70 y 67 kDa que contienen motivos característicos de helicasas y ARN polimerasas-ARN dependientes, respectivamente. Por lo tanto, se postula que se tratarían de la replicasa viral [Pruefer, D et al., 1992]. En la zona superpuesta debería encontrarse el AUG correspondiente al ORF 2 b, y su falta llevó a Prüfer et al. (1992) a proponer la necesidad de un cambio - 1 en el marco de lectura. Experimentos de mutagénesis dirigida identificaron la región del cambio de fase, en el cual estaría involucrado un motivo desconocido hasta el momento (UUUAAAU) conjuntamente con una estructura adyacente en forma de horquilla ("stem-loop"). Esta horquilla contiene una región básica, que en la proteína de 108 kDa ("transframe protein") correspondería a un dominio de unión al ácido nucleico viral [Pruefer, D et al., 1992].

Dentro del conjunto de genes del extremo 3´, el ORF 3 codifica para la proteína de cápside viral [Tacke, E et al., 1989] el cual, en conjunto con el ORF 5 ubicado a continuación y en fase, da origen a una proteína de 79 kDa (ORF3/5) por supresión del codón de terminación ámbar ("readthrough"), y cuya presencia es característica de todos los luteovirus secuenciados hasta el momento. Esta proteína de alto peso molecular es poco abundante y puede encontrarse ensamblada en las partículas virales [Bahner, I et al., 1990]. Se ha propuesto que estaría involucrada en la transmisión mediada por áfidos [Jolly, CA et al., 1994].

El ORF 4 está contenido dentro del ORF 3, en un marco distinto de lectura. Codifica para una proteína de 17 kDa que se traduce a partir de un ARN subgenómico y es capaz de unir ácidos nucleicos de cadena simple en forma no específica, a través de su dominio C-terminal [Tacke, E et al., 1991]. Basándose en su pequeño tamaño, van der Wilk et al. (1989) postularon que se trataría de la proteína que se une al genoma viral (VPg). Pero sus niveles de expresión se contraponen a un rol exclusivamente regulatorio. Tacke et

al. (1993) demostraron que esta proteína se fosforila *in planta*, que es capaz de dimerizarse *in vitro* e *in vivo* y que tal dimerización está mediada por una α-hélice anfipática presente en una región acídica del extremo amino terminal.

Figura 3: Organización genómica de PLRV.

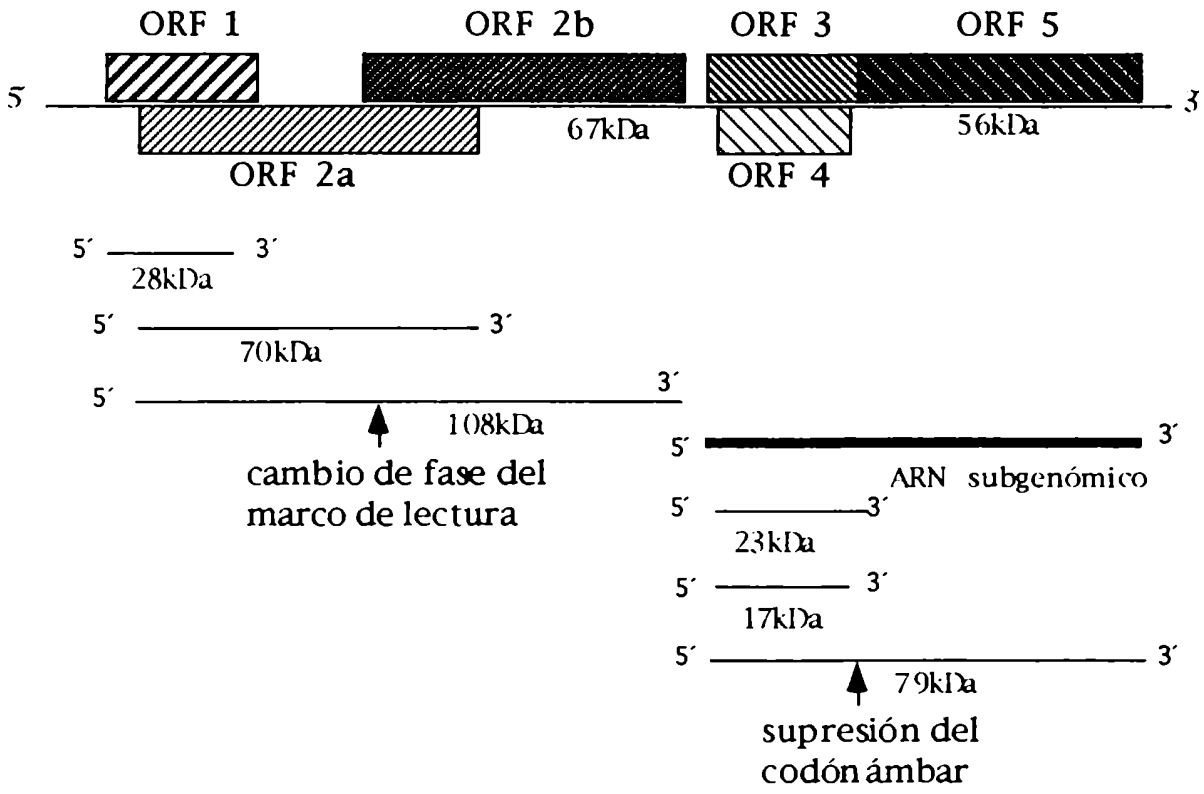


Figura3. Se indican los pesos moleculares propuestos para los distintos macros abiertos de lectura. Los cambios propuestos durante la traducción de los distintos ORFs se señalan con una flecha.

Características generales de los potexvirus.

El virus X de la papa (PVX) es el miembro tipo de este grupo [Bercks, R, 1970]. El genoma viral es ARN de cadena simple y polaridad positiva, de aproximadamente 6,4 kb de longitud [Bercks, R, 1970]. El extremo 5´ está unido a una estructura de tipo cap (m^7-Gppp) y el extremo 3´ está poliadenilado. Las partículas tienen forma de filamentos

ligeramente flexibles de 470-580 nm de longitud y 11-13 nm de ancho [AbouHaidar, MG et al., 1985]. Las cápsides virales están compuestas de monómeros de una única proteína de 18-28 kDa empaquetadas en una estructura de tipo helicoidal.

Este grupo incluye a un gran número de virus capaces de infectar especies tanto mono como dicotiledóneas. Si bien los potexvirus están ampliamente distribuídos e infectan un gran número de especies, los miembros de grupos individuales tienen, por lo general, un rango estrecho de hospedante En la naturaleza la transmisión ocurre mecánicamente y aún no se han descripto vectores. Los síntomas principales causados por estas virosis son la aparición de mosaicos y moteados, si bien algunos de ellos provocan necrosis, aparición de anillos cloróticos, clareado y bandeado de las venas. Las infecciones por potexvirus tienen como característica la aparición de agregados intracelulares (cuerpos de inclusión "en bandas") formados por grandes cantidades de partículas virales cuyos ejes mayores corren aproximadamente perpendiculares a la banda [Mentaberry, A et al., 1995].

Hasta el momento se conoce la secuencia nucleotídica de una serie de virus pertenecientes a este grupo (WClMV ("white clover mosaic virus", [Forster, RLS et al., 1988]); PaMV ("papaya mosaic virus" [Sit, TL et al., 1989]); NMV ("narcissus mosaic virus", [Zuidema, D et al., 1989]); varios aislamientos del PVX ([Skryabin, KG et al., 1988], [Huisman, MJ et al., 1988] y [Orman, BE et al., 1990]) y de todos ellos se desprende la misma organización genómica.

Organización del genoma de PVX.

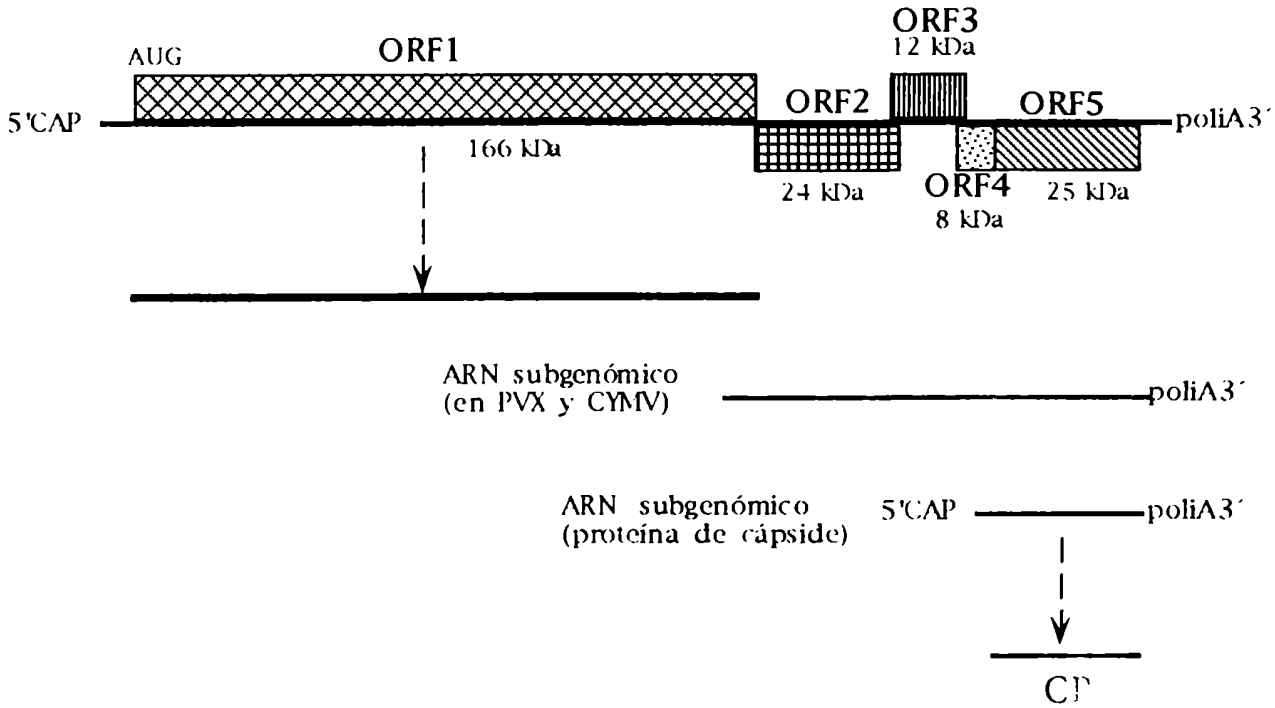
El análisis de la secuencia nucleotídica del ARN de PVX predice la existencia de 5 ORFs que codificarían para proteínas de 166 (ORF1), 24 (ORF2), 12 (ORF3), 8 (ORF4) y 25 (ORF5, la proteína de cápside viral) kDa [Huisman, MJ et al., 1988]. Los ORFs 1 y 2 están en fase. El producto del ORF1 tiene homología con 2 de los 3 dominios conservados

presentes en los productos de 126 y 183 kDa del TMV ("tobacco mosaic virus"), en particular hacia el extremo 3´, donde está presente el motivo GDD (característico de las replicasas virales); asimismo se han identificado dominios típicos de proteínas que unen ATP ó GTP [Huisman, MJ et al., 1988]. Los ORF2 y ORF3 están superpuestos a nivel del extremo 3´del ORF2 (Figura 4) y el ORF3, a su vez, se solapa con el ORF4 a nivel del extremo 3´.

Los ORFs están precedidos por una secuencia líder de 84 pb, mientras que la región 3´ no traducida comprende 76 nt, sin contar el tracto poliadenilado.

El análisis por mutagénesis del genoma del WClMV reveló que los tres ORFs centrales (ORF2-4) son requeridos para la dispersión del virus en hospedantes compatibles y no para su replicación en protoplastos, implicándolos de este modo en el movimiento de célula a célula. Estos tres ORFs se conocen con el nombre de bloque triple de genes ("triple gene block") [Beck, DL et al., 1991].

Figura 4. Organización genómica de PVX.



Infección conjunta de PVX y PVY en la naturaleza.

Una de las características notables del PVX es que produce infecciones sinérgicas al infectar, en forma conjunta con PVY, plantas de tabaco [Vance, VB, 1991]. Las primeras hojas infectadas con estos dos virus desarrollan síntomas severos (inicialmente, un aclaramiento de las venas seguido por un severo moteado y necrosis de las primeras hojas sistémicas infectadas), y el aumento en la respuesta de la planta se correlaciona con un incremento de 3-10 veces en los niveles de PVX, no así en el caso de PVY, para el cual las variaciones están en el rango de las observadas en las infecciones simples. Este efecto sinérgico en la acumulación de PVX se atribuye a un cambio en la regulación de la replicación del ARN en células doblemente infectadas [Goodman, RM et al., 1974a] [Vance, VB, 1991]. Si bien aún se desconoce el mecanismo por el cual este sinergismo tiene lugar, Vance et al. (1995) identificaron una región ubicada en el extremo 5´proximal de varios potyvirus (TVMV, TEV) que codifica para las proteínas P1, HC-PRO y al menos una porción de la P3, la cual es capaz de alterar la replicación del genoma de PVX. De las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno, la que sostenía que uno de los virus usaría la maquinaria transcripcional del otro queda descartada, ya que la región en estudio [Vance, VB et al., 1995] no contenía fragmento alguno de la replicasa potyviral. Aún queda por definir si este sinergismo está mediado por la expresión de un subgrupo de uno de los genomas virales o (alternativamente) si la secuencia en cuestión afecta la replicación de PVX en forma indirecta por interacción con un factor del hospedante que a su vez se relacionara con el PVX (como regulador negativo).

TRANSFORMACION GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM.*

Como se mencionó anteriormente, la transformación genética ofrece una laternativa de control basada en la resistencia genética.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo, gram negativa, capaz de infectar una amplia gama de dicotiledóneas al ponerse en contacto con una zona herida de la planta, provocando una enfermedad que se conoce como agalla de corona ("crown gall tumor") [Zambryski, PC, 1992].

Durante la inducción del tumor la bacteria se acopla a las células vegetales y luego transfiere parte de su plásmido inductor de tumores (Ti) a algunas de ellas. El ADN transferido (o "T-ADN", un segmento del megaplásmido delimitado por repeticiones directas imperfectas de 24 pb llamadas bordes izquierdo y derecho) se integra en alguno de los cromosomas de la célula vegetal por mecanismos aún no dilucidados completamente.

En la naturaleza, la expresión de los genes codificados en el T-ADN se traduce en la síntesis de proteínas involucradas en la producción de ácido indolacético (una auxina) y de isopentenil-AMP (una citoquinina), así como también en la síntesis de opinas; las hormonas vegetales son las responsables de la proliferación ilimitada y autónoma de las células que darán lugar al tumor; por su parte, las opinas producidas en los tumores pueden ser metabolizadas por las agrobacterias tumorigénicas y no por la mayoría de los organismos del suelo, creándose así un nicho favorable para las mismas.

Características del plásmido Ti.

Estos plásmidos tienen generalmente unas 200 kb, y su rango de hospedante se limita a *Rhizobiaceae.* Están presentes en la célula en un bajo número de copias, y sólo

pueden ser transferidos a otra bacteria via conjugación. Algunas opinas son responsables de la inducción de los genes involucrados en la transferencia conjugativa (*tra*), así como a la de aquellos involucrados en su propio catabolismo [Ellis, JG et al., 1982]. Beck von Bodmann et al. (1992) demostraron que la coregulación de los genes responsables del catabolismo de agrocinopina y la transferencia conjugativa del plásmido pTiC58 (de tipo nopalina) están mediadas por una misma proteína represora (AccR) que responde a la presencia de esta opina.

Aproximadamente la mitad del plásmido Ti codifica para las funciones involucradas en la replicación, el catabolismo de opinas y la conjugación. La restante contiene la región que se transfiere a la planta (el T-ADN) y la región de virulencia (Vir). Esta última comprende unos 40 kb, y está ubicada en forma adyacente al borde izquierdo de la región T. En los plásmidos octopínicos, la región Vir contiene unos 8 operones (*virA* a *virH*). Si bien las mutaciones que mapean en los operones *virA*, *virB* , *virD* , y *virG* eliminan la formación de tumores cualquiera sea la especie infectada, aquellas que ocurren en los otros loci (*virC*, *virE*, *virF*, y *virH*) resultan en la restricción del rango de hospedante o en la atenuación de la tumorigenicidad. A diferencia de los octopínicos, los plásmidos de tipo nopalina carecen de *virF* y *virH* pero contienen un gen accesorio denominado *tsz*. [Hooykaas, PJJ et al., 1994].

Los genes *vir* y el mecanismo de transferencia del T-ADN.

Los genes que conforman la región Vir forman un regulón, es decir, un conjunto de operones coregulados por las mismas proteínas.

Las proteínas VirA y VirG son responsables de mediar la expresión de los restantes genes *vir*. La inducción ocurre sólo si ciertos derivados fenólicos están presentes en el medio de cultivo y si su pH oscila entre 5 y 5.8 (es decir, el pH del exudado de la planta). La acetosiringona (cuya

producción se estimula en la planta como respuesta a una herida) es un inductor excelente de este grupo de genes.

La proteína VirA es un "sensor" pero actuaría indirectamente como receptor de los compuestos fenólicos ya que aún siendo una proteína de membrana interna, su dominio de unión reside en la porción citoplásmica. Esta proteína es capaz de autofosforilarse y de transferir el grupo fosfato a VirG, activándola consecuentemente.

La proteína VirG es citoplasmática y probablemente un activador transcripcional de los otros genes *vir* [Jin, S et al., 1990] ya que reconoce y se une -*in vitro*- a una secuencia consenso de 12 pb que está presente en la región 5´ no codificante de todos estos operones (inclusive en la de *virA* y *vir G*).

Uno de los primeros pasos en la inducción del tumor es la adhesión de la bacteria al sitio de la herida. Este paso ocurre conjuntamente (o tal vez previamente) a la inducción de los genes *vir*. Los genes responsables (*chvA*, *chvB*, *pscA*, *att*) son cromosómicos y estarían involucrados en la síntesis y transporte de β-glucanos y en la producción de polisacáridos extracelulares implicados en este proceso de adhesión. Durante esta etapa se requiere, además, de VirH, que es un grupo de proteínas del tipo del citocromo P450, que podrían cumplir su rol en la detoxificación de compuestos bactericidas presentes en el exudado de las células vegetales.

Una vez activados los genes *vir*, se genera una molécula de ADN de cadena simple (cadena T) por corte a nivel de los bordes del T-ADN. Miranda et al. (1992) encontraron que los bordes imperfectos son activos en una única orientación: el borde derecho es esencial para la tumorigénesis, mientras que el izquierdo es dispensable. Las rupturas ocurren en la cadena inferior, entre la 3er y 4ta base. Estos cortes actúan como punto de partida para la síntesis de ADN; la hebra de simple cadena se libera, entonces, por desplazamiento. Las proteínas VirD1 y VirD2 son las responsables de esta etapa. VirD2 tiene actividad endonucleasa por la cual, en conjunto con VirD1 -que tiene actividad topoisomerasa-,

cliva a nivel del borde derecho de la cadena T y simultáneamente se une covalentemente al extremo 5´ del T-ADN, donde se mantiene unida protegiéndola de la degradación exonucleolítica. Un segundo corte a nivel del borde izquierdo separa el complejo cadena T- VirD2 del plásmido Ti parental [Vogel, AM et al., 1992]. A su vez, el complejo puede ser recubierto por VirE2, que se une a cooperativamente a ADN de simple cadena en forma no específica (para formar lo que se conoce como el "complejo T"). Además, VirC1 se une específicamente a una secuencia activadora adyacente al borde derecho, lo cual es fundamental para la formación óptima de la cadena T.

Actualmente se piensa que el transporte de la cadena T hacia el poro nuclear (para su posterior ingreso al núcleo) ocurre por la presencia de secuencias de localización nuclear en el extremo C-terminal de VirD2, y que VirE2 facilitaría tal actividad manteniendo al complejo como una larga estructura desplegada [Rossi, L et al., 1993].

Tinland et al. (1995) usando un mutante de la proteína VirD2 demostraron que si bien la mutación reduce la eficiencia de la transferencia no modifica la integración del T-ADN *per se*; sin embargo, el análisis por Southern blot de los eventos de transformación ocurridos revelaron un patrón de integración aberrante con lo cual postularon que VirD2 debe participar en la ligación del extremo 5´ de la cadena T al ADN de la planta (y es justamente debido a que el proceso es eficiente y la integración precisa, que la transformación mediada por *Agrobacterium* es tan ampliamente utilizada).

El conjunto de proteínas derivadas del operón *virB* estarían localizadas en la membrana de las agrobacterias, donde formarían una estructura (pilus) necesaria para la transferencia del complejo T. Por ejemplo, las proteínas VirB11 y VirB4, de membrana interna, tienen actividad ATPasa y podrían proveer energía para el transporte del complejo T a través de la membrana bacteriana [Berger, BR et al., 1993].

Desarrollo de vectores para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium.*

Los trabajos realizados sobre el plásmido Ti y los mecanismos de transferencia del T-ADN condujeron al desarrollo de vectores plasmídicos utilizados para la transformación de plantas. Los primeros experimentos de transformación se llevaron a cabo utilizando plásmidos Ti oncogénicos, obteniéndose plantas transformadas que exhibían el fenotipo tumoral, el cual no podía ser luego eliminado.

Dos descubrimientos importantes condujeron al diseño de vectores no oncogénicos: a) La inserción de secuencias exógenas dentro de la región T del plásmido Ti posibilitó la transferencia de dichas secuencias al genoma de la planta [Hernalsteens, JP et al., 1980] y b) Los genes contenidos en el T-ADN no eran necesarios para la transferencia e integración en el genoma vegetal [Zambryski, P et al., 1983].

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores se construyó un plásmido Ti desarmado (pGV3850) para lo cual se delecionaron los genes responsables del fenotipo tumoral del T-ADN, reemplazándolos por secuencias del plásmido pBR322. Esto aportó una región de homología para la integración por recombinación homóloga (cointegración) de los vectores comúnmente usados en *E. coli*. Los plásmidos recombinantes, portando el gen de interés y el marcador de selección, se construyen en *E. coli* y se introducen por conjugación o técnicas directas (electroporación, transformación por el método de congelado y descongelado) en *A. tumefaciens*, que contiene el plásmido Ti. Dado que los replicones del tipo colE1 no se mantienen en *Agrobacterium*, sólo aquellas bacterias donde haya ocurrido recombinación con el plásmido Ti serán capaces de sobrevivir al seleccionar con los antibióticos adecuados. De esta manera, la información que se desea transferir a la planta queda correctamente situada entre los bordes de la región T.

Posteriormente, y luego de la observación de que la cadena T no necesita estar ligada físicamente a la región vir para ser transferida eficientemente [Hoeckema, A et al., 1983], se desarrollaron los plásmidos binarios. Este sistema consta de dos elementos: un plásmido Ti al que se le delecionó toda la región T, incluyendo sus bordes, pero que conserva la región vir (la cual actuará en *trans* sobre el otro elemento); un plásmido de amplio rango de huésped (capaz de replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*) que contiene un gen marcador de selección funcional en bacterias, un gen marcador de selección para plantas y un conjunto de sitios únicos de clonado donde introducir los genes que se desean transferir, todos ellos flanqueados por los bordes derecho e izquierdo del T-ADN.

APLICACION DE LA INGENIERIA GENÉTICA PARA EL MEJORAMIENTO.

La ingeniería genética permite la transferencia de genes de resistencia al fondo o "background" genético de los cultivares apreciados por el productor sin mayor modificación del mismo. El uso de la ingeniería genética para la introducción de resistencia a enfermedades en plantas es muy reciente y prometedora (para un revisión sobre el tema ver [Scholthof, KBG et al., 1993]). La prevención del desarrollo de enfermedades virales mediada por el patógeno fue propuesta por vez primera a comienzos de siglo, cuando Mc Kinney demostró que las plantas de tabaco podían ser protegidas frente a la infección con una cepa severa de TMV si, previamente, se las había inoculado con una cepa menos virulenta del mismo virus [McKinney, H, 1929]. Este tipo de medida, comúnmente denominada "protección cruzada", ha sido empleada en todo el mundo para varios cultivos de importancia económica, incluyendo tomate, papaya, cítricos, etc [Gadani, F et al., 1990]. En 1985 Sanford y Jonhston propusieron que la expresión de ciertos genes del patógeno en un hospedante alteraría el balance normal de los

componentes virales, interfiriendo, por lo tanto, con la replicación del virus, prediciendo que en los casos más exitosos, esto conduciría al impedimento de la replicación o del movimiento subsecuente del virus más allá de la primera célula infectada.

Hasta el presente, la mayoría de los virus para los cuales el concepto de resistencia derivada del patógeno (PDR) ha sido aplicado con éxito tienen genomas que consisten de ARN de polaridad positiva. Tales virus pertenecen a los grupos de tobamo-, cucumo-, potex-, poty-, lúteo-, carla-, ilar-, tobra-, alfalfa-, y nepovirus. A su vez, también a los tosposvirus (cuyo genoma es ARN de ambas polaridades), aunque sólo un caso exitoso ha sido reportado en el caso de un geminivirus (ADN de cadena simple) [Lomonossoff, GP, 1995].

Resistencia mediada por proteína de cápside:

Powell-Abel et al. (1987) fueron los primeros en obtener plantas de tabaco resistentes a la infección viral por expresión de la proteína de cápside (CP) de TMV. A partir de entonces se han publicado un gran número de trabajos [Fitchen, J et al., 1993] describiendo protección mediada por esta proteína, incluyendo el caso de PLRV ([Kawchuk, LM et al., 1990; Kawchuk, LM et al., 1991]; [Van Der Wilk, F et al., 1991] y [Barker, H et al., 1992]) y el de PVX en conjunto con PVY [Lawson, C et al., 1990].

Acerca del mecanismo de protección.

La protección mediada por proteína de cápside (CPMR) se define como la resistencia que resulta de la expresión en plantas transgénicas del gen que codifica para la CP de un virus. Tales plantas son resistentes a la infección y/o al desarrollo de síntomas al ser infectadas por el virus del cual proviene la CP u otros altamente relacionados [Nejidat, A et al., 1990a]. Más aún, el nivel de resistencia hacia otros tobamovirus está correlacionado positivamente con el grado

de homología a nivel de secuencia aminoacídica de la CP del virus desafiante respecto de la de TMV [Nejidat, A et al., 1990b].

El mecanismo de resistencia mediada por la proteína de cápside ha sido estudiado con profundidad especialmente en el caso de TMV y *N. tabacum.*

√ Análisis del mecanismo de resistencia en el sistema TMV/ *Nicotiana tabacum.*

En el caso específico de TMV (que se mueve a lo largo de la planta en forma de virión) se encontró que aquellas plantas que expresaban altos niveles del transgen (hasta un 0,2% de las proteínas solubles totales) no desarrollaron infección sistémica ni siquiera al ser inoculadas con 1μg/ml de TMV. En condiciones no tan extremas de niveles de expresión se vió que concentraciones crecientes de inóculo resultaron en una disminución gradual de la resistencia. A su vez, la acumulación de CP en plantas transgénicas no sólo inhibía o demoraba la aparición de síntomas en hojas sistémicas sino que también resultaba en la reducción de lesiones locales necróticas (sitios de iniciación de la infección) en hospedantes hipersensibles [Nelson, RS et al., 1987].

Este fenómeno estaría mediado por la propia proteína, dado que plantas transgénicas que expresaban versiones no traducibles de la CP no eran capaces de resistir a la infección ni aún al ser desafiadas con inóculos bajísimos [Powell-Abel, PA et al., 1990]; asimismo, si las plantas transgénicas eran transferidas por un período continuo a altas temperaturas (35°C), lo cual resultaba en acumulación de ARNm correspondiente a la CP pero disminución de la proteína (que es termosensible), dichas plantas eran incapaces de sobrepasar el inóculo viral [Nejidat, A et al., 1989].

Además, dado que la CPMR es sobrepasada casi completamente cuando se utiliza ARN de TMV como inóculo, se propuso que el mecanismo operaría durante una etapa temprana de la infección por TMV, provocando la inhibición

de un evento previo a la liberación del ARN del virión [Reimann-Philipp, U et al., 1993a].

Una evidencia más a favor de que es un paso temprano en el desensamblado del virus el inhibido en presencia de la CP endógena, provino de experimentos en protoplastos obtenidos de plantas transgénicas los cuales fueron desafiados con virus pretratados a pH=8, (tratamiento que resulta en la remoción de unas pocas moléculas de CP en el sitio correspondiente al 5´ del ARN genómico); los viriones pretratados fueron capaces de iniciar la infección tan eficientemente como el ARN viral desnudo, lo cual sugirió que la presencia de la CP impediría la remoción inicial de las subunidades en el citoplasma de protoplastos provenientes de plantas transgénicas.

Con respecto al desnudamiento, se sabe que ciertas condiciones provocan la remoción de unas pocas subunidades de la CP a partir del extremo 5´ del genoma viral, dejando al descubierto una porción pequeña de ARN al cual se unen los ribosomas, dando lugar a un desnudamiento (desensamblaje) co-traduccional del virus. Los ribosomas unidos a los viriones aún encapsidados forman estructuras que se han denominado "striposomas", los cuales están presentes en menor número en plantas transgénicas que expresan la CP respecto de las que no. Esta observación llevó a postular que en las plantas transgénicas se ve afectado el fenómeno que conduce a la desencapsidación.

El mecanismo que conduce a la pérdida de las primeras proteínas durante la desencapsidación aún no ha sido desentrañada. Se han postulado varias hipótesis, pero una de las manejadas en la actualidad es la que propone que el medio ambiente de la célula favorece la disociación de las CPs del virión. La resistencia podría resultar de un equilibrio entre la disociación de la CPs y la estabilización de la estructura del virión (e inhibición de la unión de los ribosomas al ARN viral) por presencia de la proteína transgénica [Reimann-Philipp, U et al., 1993a].

Por otra parte, la obtención de plantas transgénicas con construcciones conteniendo la CP expresada a partir de promores tejido-específicos, hizo evidente la necesidad de acumulación de la CP en el tejido inicialmente infectado para interferir eficientemente con la infección subsecuente por TMV [Reimann-Philipp, U et al., 1993b].

Hay evidencias de que la CP de TMV operaría no sólo a nivel de la desencapsidación sino también en pasos subsiguientes del proceso de infección. Cuando se inocularon plantas transgénicas con una alta concentración de ARN de TMV, se observó acumulación de virus en hojas inoculadas a niveles comparables con los controles no transgénicos; no obstante, el desarrollo de síntomas y acumulación de virus en hojas sistémicas fue menor, indicando que la CP interfirió con el transporte del virus a larga distancia [Wisniewski, LA et al., 1990]. Esta serie de resultados llevaron a Reimann-Philipp y Beachy (1993a) a proponer que la reiteración de la interferencia a lo largo del ciclo de infección sería un componente importante en la adquisición de CPMR.

Recientemente Clark, Fitchen y Beachy (1995) propusieron que si la resistencia proviene de un intercambio limitado de las subunidades del virión por la CP endógena en las células transgénicas, entonces la CP endógena debiera ser competente para ensamblarse con aquellas presentes en el virión. Para evaluar esta hipótesis los autores hicieron plantas transgénicas que expresaban genes deficientes para el ensamblaje; para ello recrearon (solas o en conjunto) las mutaciones presentes en un aislamiento de TMV, cuyas características (el lento movimiento a hojas no-inoculadas, la no recuperación de partículas infectivas a partir de tejido infectado, y el hecho que extractos de hojas infectadas contienen estructuras anormales en lugar de partículas virales al ser observadas por microscopía electrónica) son consecuencia de la presencia de sólo dos mutaciones puntuales. Si bien los clones infectivos en los cuales se reemplazó la CP salvaje por

estas versiones mutadas se comportaron del modo esperado (al ser inoculados en hospedantes susceptibles dieron lugar a la formación de partículas anormales), las plantas transgénicas que las contenían confirieron el mismo grado de resistencia que la CP salvaje (tanto en hospedantes susceptibles como en los hipersensibles). Estos resultados les permitieron concluir que la capacidad de la CP de ensamblarse dando lugar a viriones normales no es indispensable para obtener CPMR, al menos en el caso de TMV. Pero a su vez, y dado que los mutantes son incapaces de ensamblarse, queda descartada la posibilidad de que la CP estuviera actuando en algún estado de agregación distinto del de monómero.

Por otra parte, este trabajo debilitó la hipótesis que postula la existencia de un receptor intracelular en el sitio mismo donde el desnudamiento tiene lugar. En el caso de plantas resistentes este receptor sería ocupado por la CP endógena al momento de la infección, imposibilitando así el desensamblaje. La hipótesis perdió solidez al menos en el marco de que tal receptor debería reconocer la CP en contexto del virión. Lamentablemente, los autores no propusieron hipótesis alternativas [Clark, WG et al., 1995].

√Análisis del mecanismo de resistencia para PVX.

Si bien se ha encontrado un gran número de combinaciones virus/hospedante para los cuales la expresión de la proteína de cápside (y variantes de la misma) resulta en resistencia a infecciones ulteriores por el virus en cuestión, el modo en que la misma opera puede diferir ampliamente. Desde el punto de vista del mecanismo involucrado, la principal diferencia reside en la posibilidad de que sea la acumulación del ARN (no de la proteína en sí misma) la responsable del fenómeno de resistencia. En tales casos (como es el de PLRV y ToSWV, ver más adelante) se obtuvieron plantas transgénicas para versiones no traducibles de la proteína, y éstas eran comparablemente resistentes a aquellas que sí expresaban la CP, sugiriendo

que el ARN (no ya la proteína de cápside) sería la entidad activa. A su vez, existen otros ejemplos (como el de PVX) en los cuales la resistencia mediada por ARN es menos efectiva, o más fácilmente sobrepasada, que la mediada por la CP, lo cual indicaría una contribución menor por parte del ARN al proceso global de resistencia.

Hemenway et al. (1988) observaron que las plantas transgénicas de tabaco que expresaban la CP funcional de este virus desarrollaron un menor número de lesiones en hojas inoculadas, ausencia de síntomas en las sistémicas y acumulación reducida de virus en hojas inoculadas o sistémicas con respecto a plantas control. En este caso el grado de protección correlacionaba con el nivel de acumulación de la proteína transgénica. A su vez, y en contraste a lo observado para el caso de TMV, la protección era igualmente efectiva al desafiar las plantas trangénicas con el virión completo o su ARN, lo cual indicaría que la resistencia también estaría operando a nivel de eventos posteriores al desnudamiento.

De todos modos, la habilidad de resistir frente a la inoculación con ARN viral es aún compatible con el modelo que propone que el desnudamiento sería inhibido por la re-encapsidación del extremo terminal. La diferencia clave reside en que, para el caso de PVX, el ensamblaje de la cápside ocurre de 5´ a 3´ a partir de un origen de ensamblado cerca del extremo 5´ (por comparación con lo observado para otro miembro del mismo grupo, el PaMV [Lok, S et al., 1986]), de modo que la re-encapsidación de unas pocas subunidades pudiera bloquear la transcripción [Hemenway, C et al., 1988]. Por el contrario, en el caso de TMV, el núcleo de ensamblaje está alejado del extremo 5´, por lo cual viriones parcialmente desencapsidados son capaces de sobrepasar la resistencia (en oposición a lo que ocurre con PVX).

Se han publicado varios ejemplos de resistencia a PVX mediada por la CP en distintos cultivares de papa [Hoeckema,

A et al., 1989], [Jongedijk, E et al., 1992] y en conjunto con PVY [Lawson, C et al., 1990].

La aplicación comercial de la CPMR en cultivares transgénicos depende primordialmente de la estabilidad de la expresión del transgen a campo. Jongedijk et al. (1992) determinaron por inmunoblot una alta estabilidad de la expresión de la CP de PVX en varios clones crecidos a campo (cuyos niveles de expresión habían sido determinados previamente bajo condiciones controladas). Los autores observaron que aquellas plantas que originalmente expresaban niveles medios a altos de proteína mantenían tal capacidad a lo largo de toda la etapa de crecimiento.

√Análisis del mecanismo de resistencia en potyvirus.

En el caso de PVY, se reportó que plantas transgénicas de papa que expresaban la CP (hasta un 0,01%-0,05% de las proteínas totales) de PVY^O ([Lawson, C et al., 1990]; [Kaniewski, W et al., 1990]), exhibían un alto grado de resistencia a la infección al ser inoculadas mecánicamente, mientras que sólo algunas eran resistentes al ser inoculadas por áfidos vectores.

En contraste con lo descripto para TMV, la resistencia era mayor en aquellas plantas que acumulaban menores niveles de proteína. Esta observación coincidía con las realizadas por otros grupos para PVY^N [Van Der Vlugt, RAA et al., 1992]. Estos autores, en un intento por corroborar la falta de correlación positiva entre los niveles de proteína y el grado de resistencia obtenida, produjeron plantas transgénicas con la misma construcción pero que carecía de ATG, las cuales resultaron ser tan resistentes como las anteriores.

Para el caso de potyvirus, Lindbo y Dougherty (1992a, b) llevaron a cabo un análisis más detallado con TEV acerca de la naturaleza del fenómeno de CPMR. Encontraron que las plantas transformadas con el gen de cápside de TEV mutado

de manera tal de no producir CP (contenían codones stop en fase después del codón de iniciación) eran resistentes a dicho virus. Estos autores observaron que algunas de esas líneas mostraban un alto grado de resistencia a TEV al punto que ni siquiera las hojas inoculadas desarrollaban síntomas de la infección. Aún más, al inocular protoplastos obtenidos a partir de esas líneas resistentes con TEV no pudieron detectar ni la proteína de cápside ni partículas virales. Contrastando con esta observación, las plantas transgénicas que expresaban la CP funcional o su ARN antisentido presentaban una resistencia más débil (las plantas desarrollaban síntomas más lentamente que los controles no transformados; pero cuando se inocularon protoplastos éstos no fueron capaces de detener la replicación viral). Además, mientras que la expresión de la CP funcional generalmente confiere resistencia a virus relacionados, la de su ARN sentido sólo resultaba en resistencia al mismo virus.

Una explicación posible para el bloqueo en la infección viral observado en las plantas que expresan sólo ARN es que el ARN sentido no traducible, el cual estaría libre de ribosomas, sería capaz de hibridar con los genomas de polaridad negativa, y de este modo interferir con la replicación [Lindbo, JA et al., 1992b]. Estos autores también observaron que no había correlación positiva entre el grado de resistencia y el nivel de transcripto en estado basal.

Una posible justificación para explicar esta correlación inversa fue propuesta por Lindbo et al. (1993) quienes encontraron que si bien las plantas transgénicas que expresaban la CP (funcional o en forma truncada) se infectaban inicialmente, eran capaces de recuperarse a las pocas semanas, a partir de lo cual resultaban resistentes en el mismo grado que las transgénicas para ARN sentido. Esta elevada resistencia se evidenciaba exclusivamente luego del desafío con el virus y no parecía involucrar señales de tipo sistémicas (en lugar de eso, parecían resultar de la combinación de la expresión del transgén y la presencia del

ARN viral). Las plantas resistentes tenían bajos niveles de transcripto para la CP en estado basal (al menos un orden de diferencia con respecto a las plantas susceptibles). Un hecho sorprendente fue que la tasa de transcripción tanto en plantas no desafiadas como en las que se habían recuperado de la infección era la misma. Estos resultados sugirieron que la infección de plantas CP (+) resultaría en la degradación del transcripto transgénico y no en la reducción de la tasa de transcripción. Los autores propusieron que la presencia del virus podría estimular a la célula a reducir los niveles tanto del transcripto transgénico como del viral, en forma específica de secuencia. Así, las plantas que expresaban la versión no traducible de la CP mostraban un fenotipo "recuperado" aún en ausencia del desafío con el virus (lo cual equivale a decir que la expresión del transcripto no-traducible por sí misma estimularía el proceso celular responsable de reducir el nivel del transcripto transgénico conjuntamente con el del virus homólogo, de estar presente).

Smith et al. (1994) demostraron que en plantas de tabaco transformadas con una versión no traducible de la CP de PVY ocurría el mismo proceso descripto para TEV. Observaron que la expresión de este gen conducía a la planta a un estado altamente resistente, acompañado por bajos niveles de transcripto transgénico, altas tasas de transcripción y en algunos casos, inclusive metilación del transgen. En base a sus observaciones, los autores postularon la existencia de un mecanismo celular que resultaría en la degradación de transcriptos aberrantes o extraños que se hubieran acumulado hasta niveles por encima de un umbral crítico. Una vez activado, tal mecanismo causaría la degradación de ARNs homólogos al transgén y, por tanto del ARN viral. De este modo, en aquellas líneas con una elevada actividad transcripcional (debido a efectos de posición, por ejemplo), este sistema celular daría lugar al fenómeno de resistencia.

Con respecto a la naturaleza de tal mecanismo, Lindbo et al. (1993) propusieron que proteínas específicas de

secuencia con capacidad de unión al ARN podrían unirse a ARN aberrante o en exceso, haciéndolo blanco de procesos degradativos; en forma alternativa, postularon la existencia de una ARN polimerasa-ARN dependiente que produciría transcriptos cortos complementarios a los que se expresan exageradamente, los cuales se unirían a éstos haciéndolos blanco de procesos degradativos.

Goodwin et al. (1996) analizaron un número elevado de plantas transgénicas dihaploides (algunas de las cuales habían sido analizadas en trabajos reportados previamente y presentaban un alto grado de resistencia) al mismo tiempo que la progenie derivada de las mismas. Una vez más encontraron que había correlación entre el número de copias del gen, el fenotipo resistente y los niveles de ARN en estado basal, de modo que la presencia de un número de copias menor a 3 resultaba insuficiente para disparar el fenómeno que llevaba a la adquisición del fenotipo deseado. A su vez especularon que debía tratarse de un mecanismo de inactivación de la transcripción (metilación?) o de un proceso post-transcripcional. Para evaluar esta hipótesis analizaron el patrón de restricción del ADN genómico proveniente de plantas resistentes, plantas "recuperadas" antes y después del desafío con el virus, y de plantas susceptibles, con enzimas sensibles a la metilación, pero no encontraron ningún efecto suficientemente dramático que explicara los resultados observados. Luego hicieron ensayos de determinación de la tasa de transcripción (experimentos "run-on") y observaron que las líneas resistentes (que en estado basal -determinado por Northern blot- poseían bajos niveles de ARN) eran las que poseían una tasa de transcripción más elevada. Estos resultados tomados en conjunto con los ya descriptos (acerca del estado de metilación), los llevó a proponer que se trataría de un mecanismo post-transcripcional que requiere un nivel umbral de expresión del transgén. Al respecto, Lindbo et al. (1993) habían propuesto un mecanismo posible (ver párrafos anteriores). Con la intención de determinar si existían diferencias en las poblaciones de ARN derivadas del

transgén en plantas resistentes y susceptibles, Goodwin et al. (1996) aislaron ARN total y mensajero de un grupo representativo de plantas. Encontraron que en las plantas resistentes así como en las recuperadas luego de la infección, el porcentaje de ARN hibridizado que dio una banda a la altura esperada fue mucho menor, lo cual fue considerado como indicativo de la posible existencia de un mecanismo citoplasmático de degradación. En trabajos previos ([Lindbo, JA et al., 1993]) los autores habían propuesto que el transcripto completo podría estar accesible a tal degradación, que ocurriría al azar de modo tal que el ARN resultante debía ser heterogéneo en tamaño; sin embargo, los autores observaron la presencia de bandas discretas ([Goodwin, J et al., 1996], Figura 5) que podrían ser indicativas de la existencia de sitios blanco para el clivaje. En un intento por identificar dichos sitios extrajeron ARN de plantas resistentes y susceptibles usando la técnica de "primer extension", lo cual les permitó mapearlos; no obstante el análisis de dichas secuencias no reveló ningún consenso que pudiera considerarse típico de este fenómeno. El sistema funcionaría en base al clivaje en esos mismos sitios del ARN genómico viral, lo cual lo dejaría incapaz de replicarse, dando como resultado el fenotipo resistente.

Otros autores propusieron un mecanismo similar para explicar el fenómeno de resistencia mediado por la expresión de genes no estructurales ([Swaney, S et al., 1995], [Mueller, E et al., 1995]).

√ El fenómeno de resistencia en el caso de PLRV.

En cuanto a PLRV, la introducción de genes quiméricos que codifican para la CP resultó en plantas con resistencia al virus. En plantas transformadas con la CP, Kawchuck et al. (1991) fueron capaces de detectar CP en la mayoría de las plantas transgénicas, mientras que Barker et al. (1992) sólo en algunos individuos y Van der Wilk et al. (1991) en ninguno. Por su parte, el gen de la CP en orientación antisentido fue comparablemente eficaz en conferir

protección. Esto constituye una diferencia fundamental con respecto a la resistencia mediada por CP hallada para otros virus. En el caso de PVX [Hemenway, C et al., 1988] o CMV [Cuozzo et al., 1988], las construcciones antisentido sólo confirieron protección frente a inóculos bajos, y en todos los casos fueron menos eficientes que aquellas en orientación sentido. La transmisión de PLRV, al contrario que estos virus, ocurre mediante áfidos vectores de manera persistente. La acumulación viral es lenta y los títulos permanecen bajos, lo que provocaría que el transcripto antisentido tenga una mejor oportunidad para interferir con la replicación viral. Kawchuck et al. (1991) propusieron que los transcriptos sentido o antisentido interferirían con la hebra de ARN viral de polaridad opuesta. Dado que los niveles de ARN viral positivo y negativo difieren durante el curso de la infección, los autores sugieren que la resistencia ocurriría en una etapa tamprana del proceso de infección, en la que tanto los niveles de ARN positivo como negativo son bajos. El proceso de infección también podría estar afectado por una posible competencia entre el ARN proveniente del transgén y el del virus desafiante por factores esenciales (por ejemplo, la replicasa) del virus u hospedante.

Barker et al. (1993) propusieron como conclusión de sus observaciones que la resistencia a PLRV podría estar mediada por el transcripto y no la proteína en si misma. Un hecho a considerar es que la falta de correlación entre los niveles de CP acumulada y el grado de protección podría en parte atribuírse a que la determinación de la cantidad de proteínas es imprecisa y podría no reflejar las concentraciones relevantes de la misma. En el caso específico de PLRV, que sólo invade las células del floema, se requiere que sólo la CP presente en ese tejido sea activa. Sin embargo, las muestras tomadas normalmente incluyen sólo una pequeña proporción de este tejido [Fitchen, J et al., 1993].

OBTENCION DE PLANTAS CON RESISTENCIA COMBINADA.

La finalidad aplicada del proyecto en el cual esta tesis está inserta es obtener plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* cv Huinkul-MAG) múltiples resistentes a PVX, PVY y PLRV por expresión simultánea de las respectivas cápsides virales. Tal como se mencionó al comienzo de la presente introducción, estas virosis -en particular PLRV y PVY- son causa de importantes pérdidas económicas por el modo en que afectan la producción de este cultivo.

En este contexto, se pueden desarrollar varias alternativas con el fin de obtener dicha resistencia conjunta:

1-Cotransformación utilizando a la vez las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo cada una de las cápsides virales.

2-Retransformación de la planta transgénica -para una única construcción- capaz de resistir en mayor grado la infección viral con las construcciones restantes.

3-Construcción de un vector múltiple de clonado.

La utilización de diferentes vectores (cada uno portador de uno de los genes de interés) involucra el uso de promotores múltiples, lo cual implica en sí mismo un problema derivado de la variabilidad en los niveles que expresión obtenidos a partir de cada uno de ellos [Matzke M. et al., 1993]. Para citar un ejemplo en papa, los niveles relativos de expresión de dos genes que codifican para dos proteínas de cápside viral que fueron introducidos via un único vector derivado del Ti, resultaron muy distintos en diferentes líneas (Lawson et al., 1990).

Una opción alternativa, es decir, la retransformación de plantas comprobadamente portadoras de una de las caracterísicas deseadas, puede inducir efectos indeseables como el silenciamiento de genes [Fujiwara T et al., 1993].

En el caso de papa en particular, tampoco es recomendable el cruzamiento de distintos individuos (cada uno portador de una característica deseada) por la dificultad intrínseca

que ello implica. Por otro lado, las variedades de papa actualmente comercializadas son híbridos (heterocigotas) que deben su rendimiento a efectos epistáticos no fácilmente reconstituíbles, al desarmar el híbrido pasando por la etapa de meiosis. Por otra parte se ha observado que en otras especies esta aproximación ha derivado en aumento o inhibición de la expresión génica, dependiendo del número de copias que se integran y de la naturaleza de dicha inserción [Hobbs S., WT et al., 1993].

Como una alternativa para el control de múltiples virosis en papa, se estableció un proyecto conjunto con los Drs. José Marcos y Roger Beachy (The Scripps Research Institute, División Biología Molecular de Plantas) para la utilización, y eventual mejoramiento, de un cassette de expresión desarrollado por los mismos [Marcos, JF et al., 1994].

Características del cassette de expresión:

El cassette de expresión PRO1 [Marcos, JF et al., 1994] permite la síntesis de un polipéptido que contiene las proteínas de interés conjuntamente con la proteasa NIa de TEV, el cual luego de sufrir procesamiento postraduccional, da lugar a los productos maduros.

El cassette fue ensamblado sobre el plásmido pBluescript II KS (+) (Stratagene, USA) bajo el control del promotor de la polimerasa del fago T7. Contiene 2 sitios únicos de restricción romos para permitir el clonado de dos genes distintos (uno río arriba y el otro río abajo de la proteasa) conservando el marco de lectura de la misma, es decir, los sitios SmaI (en 5') y StuI (en 3'). Estos sitios están flanqueados por el heptapéptido de clivaje de la proteasa. En el caso de PRO1, dichas secuencias corresponden a las que se encuentran naturalmente a los costados de NIa. La Figura 5 muestra un esquema de PRO1.

Figura5. Esquema de PRO1.

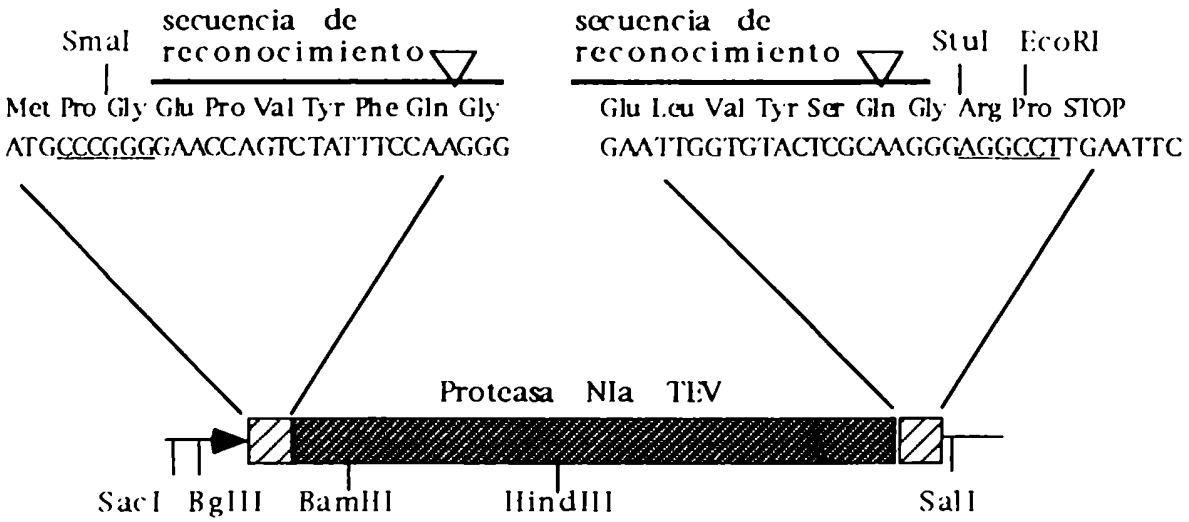


Figura 5:
Las áreas rayadas -amplificadas en la parte superior de la figura- corresponden a la secuencia de reconocimiento y clivaje de Nla a ambos extremos de la proteína; el sitio de corte de la proteasa (entre Gln y Gly) se indica con una flecha abierta. La flecha negra río arriba de Nla indica la posición de la región 5' no codificante, proveniente de TEV (5'-NTR).

La versión inicial del cassette de expresión fue probada en plantas transgénicas de tabaco expresando diferentes proteínas (la proteína de cápside del virus del mosaico del tabaco -TMV-, el virus del mosaico de la soja -SMV-, en el sitio ubicado en 5', 3' o en ambos) y en todos los casos, se detectaron -por western blot- bajos niveles de acumulación; esta reducción es más marcada en aquellas proteínas que se expresan a partir del sitio localizado hacia el extremo 3' de la proteasa (J. Marcos, comunicación personal).

OBJETIVO

El finalidad de este proyecto es la evaluación de estrategias conducentes a la obtención de plantas de papa de un cultivar local (Huinkul-MAG) con resistencia combinada a los virus PLRV, PVY y PVX, por expresión de los genes que codifican para sus respectivas proteínas de cápside.

Para lograrlo se eligió aplicar nuevas estrategias (como es el uso de un cassette que resulta en la expresión coordinada de varios genes) así como otras de uso corriente (como por ejemplo, la cotransformación).

El objetivo de una primer etapa fue la construcción de un vector único (sobre la base de PRO1) que codifique para la proteínas de cápside viral de los 3 virus de interés. En vista de los antecedentes comentados en párrafos anteriores, se decidió realizar una serie de modificaciones sobre el gen de la proteasa (intentando, por ejemplo, modificar la localización subcelular de la misma) para luego, en una segunda etapa llevar a cabo el clonado de los genes en la nueva versión del cassette.

Paralelamente se realizaron varios ensayos de transformación conjunta utilizando cepas de *Agrobacterium* preexistentes en nuestro laboratorio y el del Dr. A. Mentaberry (INGEBI-CONICET), cada una de las cuales porta uno de los genes de interés, y que habían sido previamente caracterizadas en cuanto a la transformación para un único carácter ([del Vas, M, 1993] y [Bravo-Almonacid, F, 1992]).

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Escherichia coli: Se utilizaron las cepas DH10B, XL1-blue y Sure (Stratagene, USA) electrocompetentes o hechas competentes por el método de Hanahann según se indica en cada caso.

Todos los cultivos se hicieron en medio LB (triptona 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l, según Maniatis et al., 1989) a menos que se especifique lo contrario. La temperatura fue 37ºC y la agitación 250 rpm.

Agrobacterium tumefaciens: Se utilizó la cepa GV3111 SE ([Fraley et al., 1985], que porta resistencia a cloranfenicol, 25 mg/l y kanamicina, 50 mg/l) para los derivados del plásmido pMON316 (que confiere resistencia a estreptomicina/ espectinomicina, seleccionada a 50 mg/l). La cepa GV3111SE contiene el plásmido pTiB6S3, en el cual toda la región oncogénica así como también el borde derecho del T-ADN, fueron removidos y reemplazados por el gen de resistencia a kanamicina y regiones de homología para favorecer la recombinación con plásmidos cointegrativos.

Asimismo se utilizó la cepa LB4404 pAL4404 ([Hoeckema, A et al., 1983], que porta resistencia a rifampicina (25 mg/l) y estreptomicina (50 mg/l) para los derivados del pBI121 (que confiere resistencia a kanamicina, 50 mg/l).

Para los ensayos de cotransformación se utilizaron conjuntamente las cepas LB4404 (pAL4404/pBIcpPLRV) provista por la Dra. del Vas [del Vas, M, 1993], LB4404 (pAL4404/pBI-PVY) provista por el Dr. Bravo-Almonacid [Bravo-Almonacid, F, 1992] y LB4404 (pAL4404/pBOPVX), provista por la Dra. Orman, los últimos pertenecientes al INGEBI-CONICET.

En todos lo casos las bacterias se cultivaron en medio 5S3 (sacarosa 10 g/l; hidrolizado enzimático de caseína 8

g/l; extracto de levadura 4 g/l; $K_{2}HPO_{4}$ 2 g/l; $MgSO_{4}$ 0,3 g/l) a 28ºC.

Genotipos vegetales empleados.

Las plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum* cv Xanthi NN o SX (nn), utilizadas en los ensayos de transformación vegetal fueron crecidas en invernáculo bajo condiciones de temperatura y fotoperíodo controladas, durante 4-6 semanas.

Las plantas de papa, *Solanum tuberosum* cv Huinkul-MAG empleadas para los ensayos de transformación se mantuvieron por micropropagación de estacas en medio PS [Tendille, C et al., 1974] en cámaras de cría reguladas a 21-22 ºC bajo un fotoperíodo de 16 hs luz - 8 hs oscuridad.

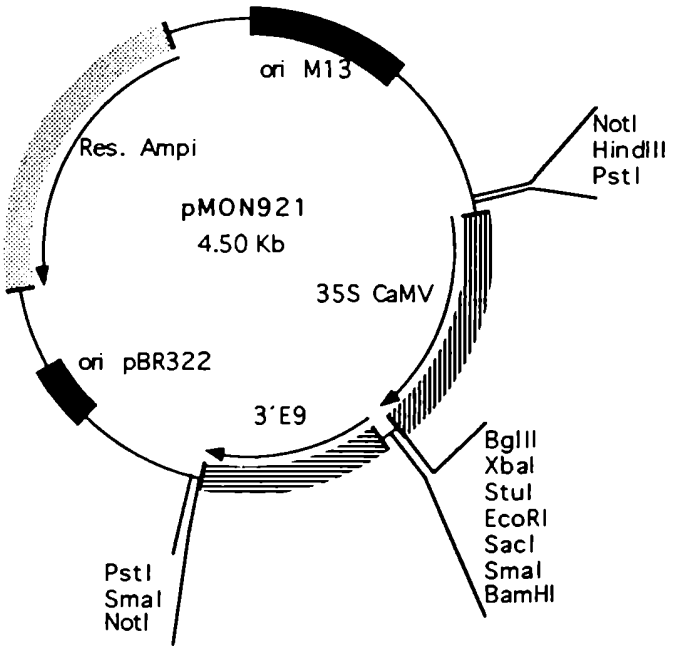
Vectores de clonado.

Las versiones iniciales de todas las construcciones se llevaron a cabo en pBlueScript KS (+) (Stratagene, USA), bajo el control del promotor del fago T7.

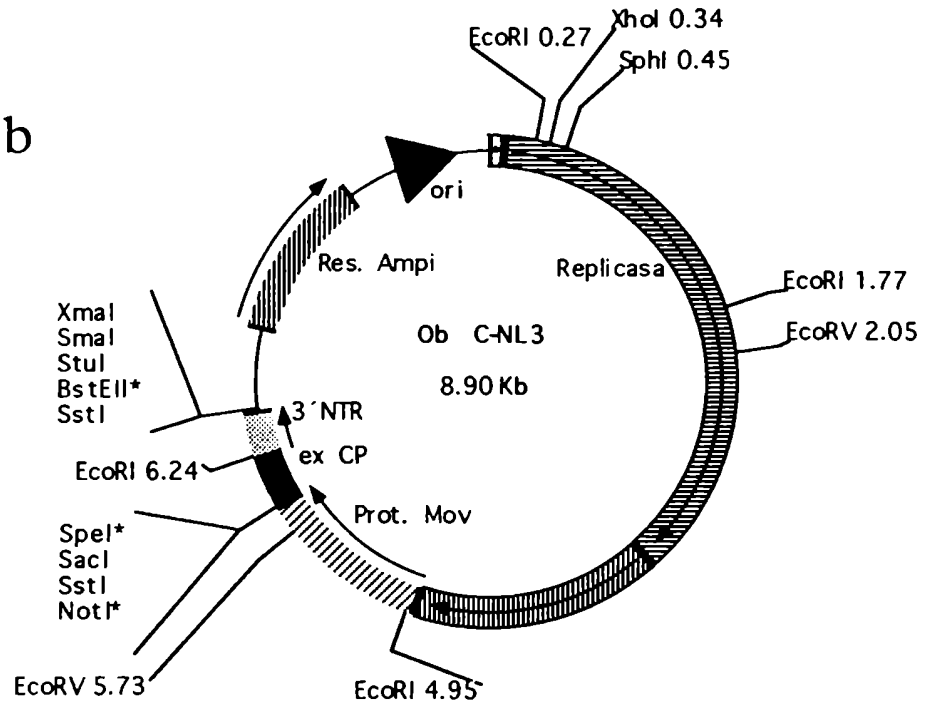
Para los experimentos de expresión transitoria en protoplastos se emplearon dos tipos de vectores, el pMON921 (Monsanto Co, ver Figura 1a) y ObNL3-ΔC, como vector viral de expresión (provisto por el Dr. Hal Padgett TSRI, ver Figura 1b).

Figura 1. Diagrama de los vectores utilizados en experimentos de expresión transitoria.

1a



1b

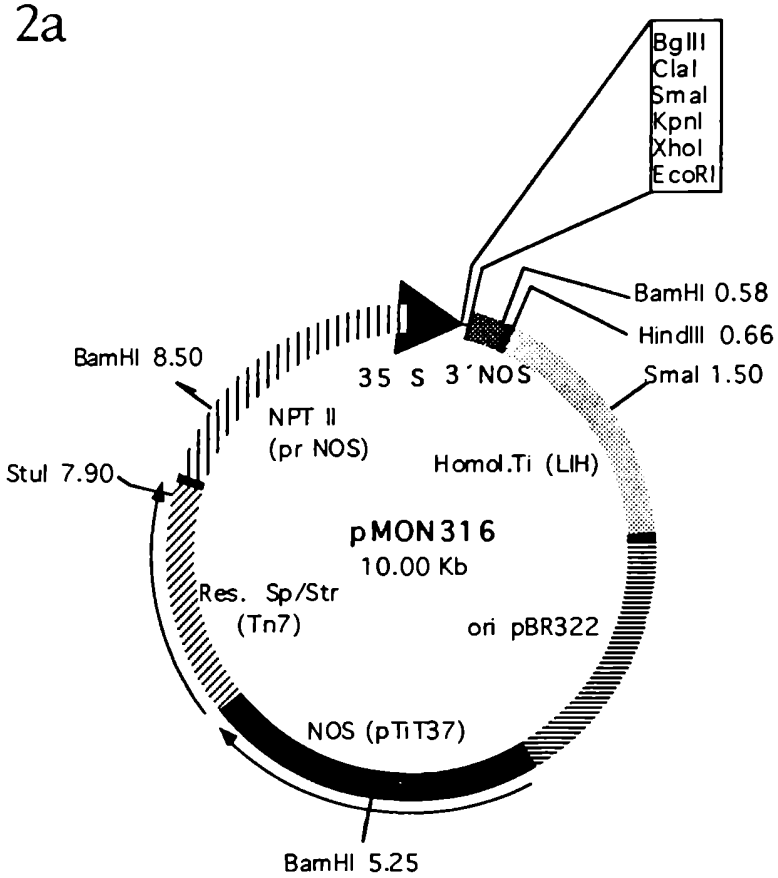


Para los experimentos de transformación estable de plantas, se empleó el pMON316 (Monsanto Co, ver

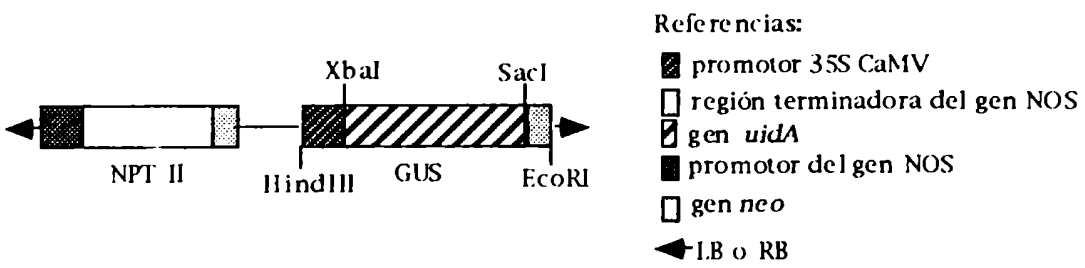
Figura2a) en el caso de las construcciones múltiples (tanto para tabaco como para papa) o el pBI121.2 en los experimentos de cotransformación de papa (Figura 2b).

Figura2. Esquema de los vectores usados en la transformación de plantas.

2a



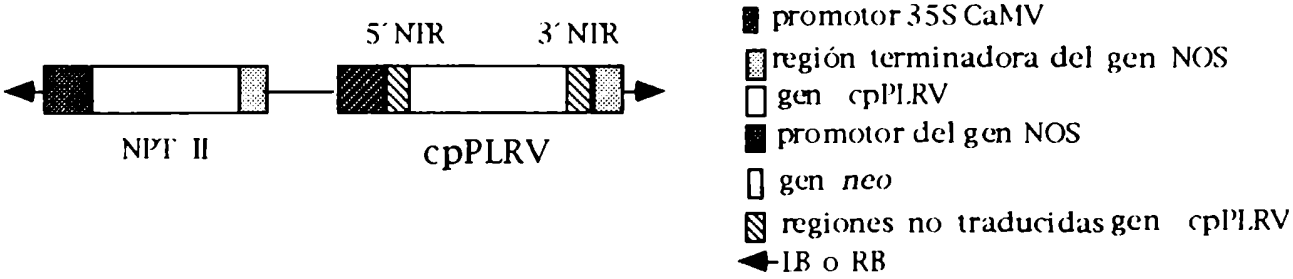
2b



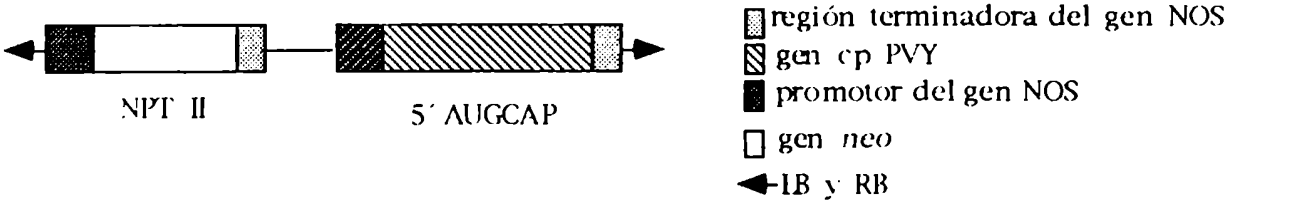
Se utilizó el plásmido pBScpPLRV (cedido por la Dra. Mariana del Vas, de nuestro laboratorio, así como las versiones en pBI121.2) como fuente del gen de cápside de PLRV [del Vas, M, 1993]. Este plásmido contiene el ORF3 completo del virus del enrollamiento de la papa clonado en los sitios HindIII-EcoRI, el cual está flanqueado por 100 pb de la región 5´no codificante (5´NTR) y 59 pb del extremo 3´. Asimismo, y como fuente del gen de cápside de PVY, se utilizó el plásmido pBS35AUGCAP [Bravo-Almonacid, F, 1992] que contiene el ORF completo así como la región 3´del gen que codifica para la ARN polimerasa viral. Este plásmido (al igual que su derivado en pBI121.2) fue cedido gentilmente por Dr. Fernando Bravo-Almonacid, del INGEBI-CONICET, del mismo modo que el que contiene el gen de la cubierta de PVX (pBScpPVX). Los plásmidos se muestran en la Figura3.

Figura 3 Esquema de los vectores utilizados en los ensayos de cotransformación.

pBI121 cpPLRV



pBI-PVY



CLONADO, SECUENCIACION Y CONFIRMACION DEL PROCESAMIENTO CORRECTO *IN VITRO* DE LAS CONSTRUCCIONES REALIZADAS.

Las técnicas clásicas de ADN recombinante tales como la digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción, la electroforesis de ADN en geles de agarosa, el rellenado de extremos 5´ protruyentes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, el tratamiento de los vectores de clonado con fosfatasa alcalina de timo de ternera, la ligación de ADN y transformación de *Ecoli* con ADN plasmídico, etc, fueron llevadas a cabo según Maniatis et al. (1989).

En todos los casos, el ADN plasmídico fue purificado utilizando un sistema de columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa) provistas por Qiagen (Qiagen Inc., Alemania) de 200ng. Los fragmentos de restricción a clonar fueron separados en geles de agarosa y posteriormente purificados por Geneclean (Bio101, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Construcción de los plásmidos derivados de PRO1.

Para obtener PRO1.NG, se digirió tanto PRO1 (vector, de 3,5kb) como PRO1.SNG (fuente del gen GUS, de 2,8 kb) con BamHI y EcoRI. Se purificaron los fragmentos resultantes y 25 ng de vector y 75 ng de inserto se ligaron utilizando 5 U/µl de T4 ADN ligasa, durante toda la noche a 12ºC. Con 1 µl de reacción se transformaron 20 µl de *Ecoli* DH10B electrocompetentes, del modo detallado más adelante. Se extrajeron plásmidos de 12 clones resultantes por el método de "boiling" y se liberó el inserto con las mismas 2 enzimas, para comprobar que se trataba de verdaderas colonias recombinantes.

Para obtener PRO1 ΔBNG se digirió PRO1.NG con SmaI y luego se realizó una extracción con fenol-cloroformo, seguida por precipitación con NH4ACO 7,5M y etanol (los buffers restricción de las 2 enzimas utilizadas no son compatibles). Luego se digirió con BamHI, y se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para hacer romos los extremos dejados por la enzima de restricción. Se purificó en gel de agarosa el fragmento de ADN del tamaño adecuado y se utilizó una cantidad pequeña de ADN (~10 ng) en la reacción de ligación, para favorecer la ligación intracatenaria.

Para obtener PRO1.G, se procedió de un modo similar al descripto para PRO1 ΔBNG. El plásmido PRO1.NG se digirió con SmaI y posteriormente con StuI, para quitar completamente el gen que codifica para la proteasa.
En ambos casos, se utilizó 1 μl del producto de reacción para transformar 20 μl de *Ecoli* DH10B electrocompetentes. Se extrajeron plásmidos de 6 clones independientes (para cada subclonado) y se confirmó que portaban la deleción correspondiente utilizando otras enzimas de restricción.

Para obtener PRO1.ΔHNG fue necesario realizar una serie de digestiones parciales sobre PRO1.NG, ya que este plásmido posee 3 sitios HindIII (uno de ellos necesario para realizar la deleción del dominio VPg en fase). A tal efecto, se realizaron digestiones con diluciones seriadas de HindIII (4,22; 1,2; 0,34; 0,09 U/μl) durante una hora a 37 ^{o}C. Se corrieron en un gel de agarosa 1,2% y se identificó la banda del tamaño adecuado (es decir, la que resultó del corte en los sitios que se encuentran dentro de NIa), la cual se purificó por el sistema Geneclean mencionado arriba. A continuación, se trató con Klenow y se redigirió con SmaI. Al igual que en los clonados ya descriptos, se utilizó 1 μl de la reacción de ligación para transformar células electrocompetentes. Se extrajeron plásmidos de 10 clones

independientes, y se identificaron los positivos por restricción.

Para obtener PRO2.6KNG, se digirió PRO2.6KN (fuente de vector, de 3,7kb) y PRO1.SNG (fuente de inserto, de 2,8kb) con BamHI y EcoRI. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de agarosa y se purificaron por Geneclean. Se procedió del mismo modo que con los restantes subclonados. Los plásmidos recombinantes se identificaron por restricción.

Construcción de las fusiones a GUS.

Para obtener todas las variantes de la proteasa fusionadas a GUS se digirió tanto PRO4.NG (fuente de vector) como PRO1.NG, PRO1.ΔBNG, PRO1.ΔHNG, y PRO2.6KNG con BglII y SpeI. En todos los casos, se utilizó 4 μl del producto de reacción para transformar 200 μl de *E coli* XL1-blue competentes. Se extrajeron plásmidos de 6 clones independientes (para cada subclonado) y se confirmó que eran recombinantes utilizando otras enzimas de restricción. Los clones resultantes se denominaron PRO3.NG, PRO3.ΔBNG, PRO3.ΔHNG y PRO4.6KNG.

Clonado de los productos de PCR:

Para obtener PRO10 se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como templado PRO1.ΔHNG; el oligonucleótido correspondiente al extremo 5' contiene un sitio único de clonado SmaI (que se había perdido durante la deleción interna) inmediatamente río abajo del ATG y a continuación, la secuencia correspondiente al heptapéptido de clivaje de la proteasa (que se cambió por el que se encuentra naturalmente entre NIb-CP).

La reacción de PCR tuvo las siguientes características:

Inicialmente una incubación 94ºC durante 1 min para desnaturalizar completamente al templado.

Cada ciclo involucró:
Desnaturalización a 94 °C, por 30 seg.
Hibridación a 45°C, por 30 seg.
Extensión a 72°C, por 1 min.
N° de ciclos: 25
Extensión final por 2 min.
El producto de PCR (de ~800 pb) se corrió en un gel de agarosa 1% para confirmar la amplificación de una banda específica (única). El resto se extrajo con fenol:cloroformo y se precipitó con NH_4AcO y etanol. A continuación se digirió con SmaI y EcoRI en forma secuencial y se clonó en PRO1 abierto con las mismas dos enzimas.

Para clonar los genes que codifican para las proteínas de cápside de PVX (PVX-CP), PVY (PVY-CP) y PLRV (PLRV-CP) se llevaron a cabo reacciones de PCR siguiendo el esquema detallado en el párrafo anterior, con la salvedad de las temperaturas de "anillamiento", que variaron dependiendo del par de oligonucleótidos utilizados (56°C, en el caso de PVX; 49°C en el de PVY y 51°C en el de PLRV; los oligonucleótidos se detallan en la Tabla1). Nuevamente una alícuota de los productos de la reacción fue chequeada en gel de agarosa y la restante extraída con fenol:cloroformo y precipitada posteriormente. A continuación los insertos, al igual que el vector pBS KS (+), se digirieron con Kpn I y Eco RI (en forma secuencial) .
Dos a tres clones independientes de cada clonado fueron secuenciados según el método de Sanger, utilizando el kit comercial Sequenase (USB, USA).

Tabla I.

*en reacciones de PCR:

5'PD-NIa	5'TGG CCC GGG GAG AAT CTT TAT TTT CAG AGTTG TTT AAG GGA CCA CG 3'
NIaC	5'GAA TTC AAG GCC TCC CTT GCG AGT ACA CCA ATT CA 3'
5'PVY	5'GGA ATT CAT GCC CGG GGA GAA TCT TTA TTT TCA GAGGT AAA TGA TAC AAT TGA TGC 3'
3'PVY	5'CCG GTA CCG ATA TCC ATG TTT TTG CCT CCA AGC 3'
5'PVX	5'GGA ATT CAT GGA TAT CAC TAC ACC AGC CAA CAC C 3'
3'PVX	5'CCG GTA CCG ATA TCT GGT GGG GGT AGT GAA AC 3'
5'PLRV	5'GGA ATT CAT GGA TAT CAG TAC GGT CGT GGT TAA AGG 3'
3'PLRV	5'CCG GTA CCG ATA TCT TTG GGG TTT TGC AAA GCC 3'
5'PLRV-PC	5´TGC GAT GAA TTC TTA ATG AGT ACG GTC GTG GTT AA 3´
3´PLRV-PC	5´CCA GGC TCT GGT CTA GAG TCT ACC TAT TTG GGG TT 3´
35 S	5´ATC TCC ACT GAC GTA AGG GA 3'
3´ PVY-3	5´CGT GAT AGC CTT GAT TCT CG 3´
3´ PVX-2	5´GCC CGG CTG ACC CCA TTG GA 3´
5´ NPT II	5´CGG CTA TGA CTG GGC ACA ACA GAC A 3´
3´ NPT-II	5´ CGT AAA GCA CGA GGA AGC GGT CAG C 3´

*en reacciones de secuenciación:

5'NTR	5'GAG CTG AGA TCT AAA TAA CAA ATC TCA ACA CAA CA3'
5'PVY-2	5'AGG TTT GAC TGT ATG CTG C 3'
NIaC7	5'CTC AGT ATT GTG GGG GGG C3'

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.
En negrita se señalan los sitios de restricción incorporados a la secuencia; la región subrayada corresponde al heptapéptido de clivaje específico de la proteasa.

Obtención de las construcciones conteniendo los genes de cápside viral.

Para obtener PRO1O.YN se digirió aproximadamente 1μg de PRO10 con SmaI y de pBScpPVY con SmaI+EcoRV; esta última digestión se realizó en forma secuencial, siendo necesaria una precipitación con NH_4AcO y etanol para reemplazar el buffer de digestión de la primera enzima. El vector se trató con fosfatasa alcalina de timo de ternera. Los fragmentos deseados se purificaron de un gel de agarosa y se ligaron con 40U de ADN ligasa del fago T4. Tres μl del producto de ligación se usaron para transformar

200µl de células Sure® (Stratagene) competentes por el método de Ca^{2+} Los clones recombinantes se identificaron por restricción con SmaI+EcoRI. Uno de los clones recombinantes fue secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos para confirmar la no interrupción del marco abierto de lectura, la existencia del sitio SmaI y del heptapéptido de clivaje.

Para obtener PRO10.XYN y PRO10.YNX se abrió PRO1O.YN (fuente de vector) con SmaI o StuI (respectivamente) y se digirió pBScpPVX con EcoRV. Una vez obtenidos los fragmentos correspondientes (~4,5 kb, vector y 0,7 kb en el caso de la cp de PVX) se realizaron las reacciones de ligación ON a 14ºC, utilizando 40U de al ADN ligasa de fago T4. Nuevamente se transformaron 200µl de células Sure® (Stratagene) con una alícuota de las reacciones. Las colonias resultantes se chequearon para la presencia y orientación del inserto utilizando PstI+EcoRV. Un clon positivo para cada subclonado fue secuenciado del modo descripto anteriormente.

Para obtener PRO10.LRYN se procedió del mismo modo que para conseguir PRO10.XYN. Los clones recombinantes se confirmaron por restricción con BamHI+EcoRV.

Por último, para obtener PRO10.LRYNX, se digirió PRO10.YNX (fuente de vector, ~4 kb) y PRO10.LRYN (fuente de inserto, ~2,1 kb) con SacI (que tiene un sitio único en la región 5' no codificante) y SpeI (que corta dentro del gen de NIa). En este caso se utilizaron 5U de ADN ligasa de fago T4 y la reacción de ligación se prolongó por espacio de 2 hs a temperatura ambiente.

Los clones obtenidos se analizaron por restricción con BamHI para confirmar la presencia del inserto. Un clon positivo se secuenció del modo detallado anteriormente.

Obtención de los clones derivados de ObNL3-ΔC.

En un principio se intentó obtener todos los subclonados deseados linearizando el vector ObNL3-ΔC (8,9 kb) con SpeI (que tiene un sitio único río abajo del promotor de la CP viral) y obteniendo los insertos (provenientes de las versiones en PRO10 descriptas en el párrafo anterior) por digestión con BglII y EcoRI. Los sitios protruyentes se hicieron romos por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el vector se trató con fosfatasa alcalina. La ligación fue ON a 14ºC y 5μl del producto de la reacción de ligación se usaron para transformar 200μl de células Sure® (Stratagene). Se obtuvieron clones recombinantes en la orientación deseada sólo en el caso de ObΔC-LRYN y ObΔC-ΔHNG, dos de los cuales fueron secuenciados.

Para obtener ObΔC-3NG se digirió ObΔC-ΔHNG y PRO3.NG con SwaI (que corta en la región 5´ no traducible) y SpeI (que tiene un sitio único dentro de NIa). Los fragmentos de interés (11,1 kb en el caso del vector y 1 kb, del inserto) se purificaron en un gel de agarosa al 0,8%. Distintas alícuotas del producto de ligación se utilizaron para transformar 200 μl de células Sure® o 50 μl de XL1-blue electrocompetentes. Los clones recombinantes se identificaron por digestión con SphI, EcoRV, y SwaI+SpeI y uno de ellos se secuenció por el método de los dideoxinucleótidos.

Para obtener ObΔC-XYN por PCR se digirió ObΔC-LRYN y PRO10.XYN con SwaI y NsiI en forma secuencial. Los fragmentos de interés, de 9,77 kb y 1,58 kb respectivamente, se purificaron a partir de un gel de agarosa 0,7%. Luego de la ligación ON a 14ºC, el producto de la misma se digirió con BstXI para disminuir el fondo debido a contaminación con el vector parental, y con 2 μl de la digestión se transformaron células XL1-blue

electrocompetentes. Se hizo un relevamiento por PCR de 60 colonias, amplificando el gen de cápside de PVX por medio de los iniciadores detallados en la TablaI. Se obtuvieron 23/60 clones positivos, 3 de los cuales se secuenciaron usando los oligos Ob-FOR y REV (TablaI).

Para obtener ObΔC-YNX y ObΔC-LRYNX se reemplazó el fragmento SwaI-SalI en ObΔC-LRYN por el correspondiente en las construcciones PRO10.YNX y PRO10.LRYNX respectivamente. Los fragmentos de interés (~9kb en el caso del vector, 2,3 kb y 2,9 kb para los insertos) se purificaron del modo acostumbrado. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR directa y 36/48 colonias resultaron positivas para YNX, mientras que 4/9 para LRYNX. Se eligieron al azar 6 clones de YNX y los 4 de LRYNX para una caracterización posterior por mapeo de restricción (SpeI, EcoRI). La correcta inserción de fragmentos y mantenimiento de secuencias se reconfirmó por secuenciación de un ejemplar de cada clon recombinante.

Purificación de ADN plasmídico por el método de ebullición ("Boiling method").

-Se crecieron entre 1 y 3 ml de cultivo en medio 4YT (NaCl 5 g/l; triptona 32 g/l; extracto de levadura 20 g/l) durante toda la noche.
-Se centrifugaron las células por 15 seg a 6000 xg (microcentrífuga Eppendorf, Alemania)
-Se resuspendió el pellet en 200 μl de buffer STET (sacarosa 80 g/l; TRIS-HCL pH=8 10mM; EDTA 50mM; tritón X-100 0,005%) utilizando un vórtex.
-Se agregaron 15 μl de una solución de lisozima (20 mg/ml) y RNAsa A (10 mg/ml). Esperar 5 min a temperatura ambiente.
-Se hirvió a 100 ^{o}C por 45 seg.
-Se centrifugó a máxima velocidad por 30 min a 4°C (15000 xg, microcentrífuga Eppendorf, Alemania)

-Se decartó el precipitado. A 200 μl del sobrenadante se les agregaron 100 μl de NH_4AcO 7,5 M y 600 μl de etanol.

-Se centrifugó a máxima velocidad (15000 xg) durante 15 min a temperatura ambiente.

-Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70 %

-Se resuspendió en 100 μl de H_2O o TE.

Relevamiento directo de colonias bacterianas por PCR [Biotechniques (1995) 18: 225]

-Se hizo una solución base para reacciones de PCR de 40 μl de volumen final:

4 μl buffer de reacción (Tris-HCl pH=9 10 mM; KCl 50mM; Tritón X-100 0,1%)

1,75 mM $MgCl_2$

0,2 mM dNTPs

70 ng de cada oligonucleótido

0,3 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL, USA)

-Usando puntas de micropipeta de tipo "amarillas" se transfirieron células pertenecientes a colonias (de más de 1 mm de diámetro) a cada alícuota, se mezcló levemente y se hizo una estría en una placa de LB agar conteniendo los antibióticos adecuados.

-Se agregó una gota de aceite mineral y se llevó a cabo la reacción de PCR usando el programa que se describe a continuación:

1 ciclo a 95°C 10 min.

20 ciclos a 92°C 1 min, 42 °C 1 min, 72 °C1 min.

1 ciclo a 72 °C 5 min.

-Para analizar el resultado, se corrieron 10-15 μl en un gel de agarosa o se agregaron directamente a una reacción de digestión.

Preparación y electroporación de células competentes de *E.coli* .

-Se usó una colonia fresca para inocular 50 ml de SOB (triptona 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; $MgCl_2$ 10 mM; $MgSO_4$ 10 mM) en un erlenmeyer de 500 ml. Se crecieron las células durante toda la noche con agitación vigorosa.

-Se diluyó 0,5 ml del cultivo en 500 ml de SOB fresco (sin magnesio) en un erlenmeyer de 2,8 l. Se creció durante 2-3 hs con alta aireación a 37 ºC hasta que el cultivo alcanzó una $D.O_{550nm}$ de 0,8.

-Se cosecharon las células centrifugando a 2600g durante 1(en 500 ml de WB estéril y preenfriado (10% de glicerol redestilado).

-Se centrifugó la suspensión de células a 2600 g por 15min y cuidadosamente se decantó el sobrenadante ni bien el rotor se detuvo (las células lavadas en WB por segunda vez no forman un pellet firme).

-Se resuspendieron las células en un volumen final de 2ml de WB (aproximadamente 1 x 10^{11} células/ml). Las células pueden ser usadas inmediatamente o congeladas en alícuotas de 0,2 ml usando un baño de etanol y hielo seco. Se guardaron a -70 ºC.

-Se transfirieron 20 μl de células a un Eppendorf preenfriado. Se adicionó no más de 1 μl de cada muestra de ADN. Se mezcló rápidamente.

-Se suspendió la mezcla de células y ADN entre los electrodos de la microcubeta.

-Se electroporaron las células a 2400 V y 4 kV (Cell Porator, BRL, USA).

-Se removieron 10 μl de las células electroporadas y se las incubó a 37 ºC por una hora en SOC (SOB suplementado con 20 mM glucosa).

-Se plaqueó en medio selectivo.

Transcripción y traducción *in vitro* de las construcciones derivadas de PRO1

1) Preparación del ADN a utilizar como templado:

-Se digirieron 20 µl de ADN plasmídico (purificado a través de columnas de intercambio iónico, Qiagen, Alemania, 200 ng/µl) en una mezcla de reacción conteniendo:

5 µl de buffer Sal I 10X
5 µl 10X de BSA
18 µl de H20
2 µl de Sal I.

-Se incubó 2 hs a 37 °C y se analizó una alícuota en un gel de agarosa en buffer TAE.

-Se agregó 2 µl de proteinasa K (10 µg/µl) y se incubó en las mismas condiciones por otros 30 min.

-Se hicieron dos extracciones con fenol: cloroformo (1:1) y se precipitaron 40 µl de fase acuosa con 20 µl de NH_4AcO 7,5 M y 150 µl de etanol. Se dejó a -20 °C por una hora.

-Se centrifugó a máxima velocidad, se lavó con etanol 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 12 µl de H_2O previamente tratada con dietilcarbonato de sodio (DEPC, [Maniatis, T et al., 1989]).

2) Transcripción *in vitro*.

-Se preparó una mezcla de reacción conteniendo:

25 µl H_2O DEPC
10 µl buffer de transcripción 5X (Promega Biotech, USA)
5 µl ditiotreitol (DTT) 5 mM
1,5 µl inhibidor placentario humano de ARNsa (RNAsin, 40 U/µl Promega Biotech, USA)
2,5 µl mezcla de ribonucleótidos (NTPs) 10 mM
5 µl ADN templado linearizado (~1 µg)

1 μl ARN polimerasa del fago T7 (50 U/μl, Epicentre Technologies, USA).

-Se incubó a 37ºC durante una hora.

-Se hicieron 2 extracciones con fenol: cloroformo (1:1) y se precipitaron 40 μl de fase acuosa del modo detallado en el párrafo anterior.

-Se resuspendieron en 12 μl de H_2O DEPC.

-Se analizó una alícuota (1-2 μl) en gel de agarosa-TAE desnaturalizando previamente las muestras a 90 ºC por 2 min.

3) Traducción*in vitro*:

Las traducciones en sistemas libres de células de ARN mensajeros previamente transcriptos *in vitro* se llevaron a cabo utilizando el sistema de reticulocitos de conejo comercializado por Promega Biotech (USA).

-Se precalentaron las muestras de ARN 10 min a 70ºC, y luego se mezclaron suavemente:

17,5 μl lisado

1 μl rARNsin (40 U/μl, Promega Biotech, USA)

0,5 μl mezcla de aminoácidos (sin metionina)

4 μl ARN

2 μl ^{35}S-metionina (Amersham, Inglaterra, 1000Ci/mmol, 15mCi/ml).

-Se incubaron 30 min a 30 ºC.

-Se analizaró 5 μl de la muestra (diluídas en 15 μl de buffer 4 X de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS descripto por Laemmli [Maniatis, T et al., 1989], hervidas inmediatamente por 3 min antes de sembrar en un gel de poliacrilamida 12%, acorde con Maniatis et al., 1989).

-Se mantuvieron a -80ºC.

Inmunoprecipitación de proteínas.

-Se equilibró la suspensión proteína A-sepharosa con TBSN (Tris-HCl pH=8 25mM; NaCl 150mM, Nonidet P40 1%).

-Se incubaron las muestras (10 μl provenientes de la traducción *in vitro*) con 10 μl de la proteína A en 80 μl de TBSN durante 15 min en hielo (agitando ocasionalmente).

-Se centrifugó a 10K por 3 min, para separar la proteína A (que se descarta).

-El sobrenadante (40 μl para cada reacción) se pasó a un tubo conteniendo 60 μl de una dilución 1/80 del anticuerpo (cuya concentración es 1mg/ml). Las IgG anti PVX, PVY y PLRV fueron preparados por la compañía Monsanto, Co (USA).

-Se mantuvieron agitando cabeza-cola por un período entre 1-3 hs a 4°C.

-Se agregó 10 μl de proteína A (que puede haber sido o no preincubada con lisado frío) para precipitar los complejos Ag-Ac; mantener en idénticas condiciones por otras 1-1,5 hs.

-Se centrifugaron por a 1K 3 min a 4°C y lavar con:

0.2M LiCl	1X
TBSN	2X

-Se resuspendieron los complejos [proteína A-Ac-Ag] en 120 μl de buffer de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS descripto por Laemli 1X [Maniatis, T et al., 1989]; se hirvieron a 100°C por 3-4 min y se centrifugaron por 2 min a 12000 xg.

-Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 15%, del modo descripto anteriormente.

El tratamiento realizado a este gel es similar al detallado previamente para los de las traducciones *in vitro*.

ENSAYOS DE EXPRESION TRANSITORIA EN PROTOPLASTOS

Reacciones de transcripción *in vitro* con el fin de obtener transcriptos infecciosos.

-Se digirió el templado (1-2μg) con la enzima apropiada (en el caso de los derivados de Ob es BstEII, que tiene un sitio único de corte en el extremo 3´del genoma viral)
-Se hicieron dos extracciones de la digestión con fenol:cloroformo, evitando cuidadosamente la interfase.
-Se extrajo la fase acuosa una última vez con cloroformo.
-Se precipitó con NH_4AcO 2,5M final y etanol.
-Se mantuvo a -80ºC por 15 min.
-Se centrifugó a máxima velocidad 15 min, se secó el pellet y se resuspendió en H_2O DEPC hasta una concentración final de 0,5 μg/μl.

-Se preparó la reacción de transcripción agregando a temperatura ambiente (y en el siguiente orden):
2 μl de templado linearizado.
4,3 μl de H_2O DEPC.
2,5 μl DTT 100 mM.
2,5 μl seroalbúmina bovina (BSA) 1mg/ml.
5 μl buffer de transcripción.
0,6 μl ARNsin (Promega Biotech, USA).
-Se incubó 15 min a temperatura ambiente.
-Se agregó:
5 μl 5 x NTPs (ATP, UTP, CTP 5mM; GTP 0,5 mM)
1,3 μl análogo de CAP (New England Biolabs, USA).
1,3 μl de ARN polimerasa del fago T7 (Epicentre Technologies, USA).
-Se incubó a 37ºC durante 60 min.
-Se confirmó la integridad de los transcriptos mediante la electroforesis en gel de agarosa (1,2%) de una alícuota de los productos de las reacciones de transcripción.

Mantenimiento y cultivo de las suspensiones celulares.

Se utilizó una suspensión celular de *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow como fuente de obtención de protoplastos [Ikeda, T et al., 1976].

-Se subcultivó la suspensión de células una vez por semana, en una dilución 1/20, en medio B Y - 2 (sales de MS (Sigma Chemical Co, USA) 2,2 g/l; tiamina-HCl 1 mg/l; mio-inositol 0,1g/l; sacarosa 30 g/l; 2,4D 0,2 mg/l ; pH= 5,8; esterilizar en autoclave)

-Los cultivos se agitaron a 100 rpm y se mantuvieron en oscuridad o bajo luz difusa.

Obtención de protoplastos y electroporación.

-Se tomó un cultivo de 2-3 días (diluído 1/10) y transferir a un tubo descartable estéril de 50 ml.

-Se dejó decantar los protoplastos por 10 min.

-Se retiró el medio de cultivo y los protoplastos se resuspendieron en manitol 0,4M.

-Se dejó a temperatura ambiente o en una cámara a 30ºC durante 10 min, para provocar la plasmólisis celular.

-Se retiró el manitol y se adicionó la solución enzimática (manitol 0,4M; celulasa Onozuka RS 1% (Japón); pectoliasa Y-23 0,1% (Japón)) a través de un filtro de esterilización de 0,22 μm.

-Se transfirió a una placa de petri estéril y se mantuvo a 28ºC por 2,5-3 hs. Luego de los primeros 30 min se pipeteó la suspensión celular para liberar las conglomerados de células que pudieron haberse formado.

-Se centrifugó a 6 xg por 5-7 min, se descartaron los restos de solución enzimática y se agregó manitol 0,4M hasta completar la mitad del tubo.

-Se resuspendió y centrifugó a 6 xg y se retiró el manitol dejando las células en mínimo volumen.

-Se realizó el recuento del número de células en un hemocitómetro, usando diacetato de fluoresceína (Sigma Chemical Co., USA).

-Se prepararon alícuotas conteniendo aproximadamente $1x10^6$ células/ tubo y se centrifugaron nuevamente a 6 xg.

-Se adicionaron 0,6 ml por tubo de buffer de electroporación (manitol 0,3M; MES 5mM pH=5,8; KCl 70 mM).

-Se resuspendieron inmediatamente antes de mezclar con el ADN requerido para la transformación.

-Se mezclaron con 10 μg de ADN (o la mitad de una reacción de transcripción *in vitro*) previamente diluídos en 0,2 ml del mismo buffer de electroporación.

-Se transfirieron a la cámara de electroporación.

-Se aplicó la descarga de voltaje (150 μF, 300 V, utilizando el BioRad Gene Pulser, BioRad, USA)

-Se transfirió al tubo original y se mantuvo en hielo por 30 min.

-Luego de 5 min a temperatura ambiente se adicionó medio de cultivo de protoplastos (sales de MS 2,2g/l; tiamina-HCl 1 mg/l; mio-inositol 0,1g/l; sacarosa 10g/l; manitol 72,88 g/l; 2,4D 0,2 mg/l; pH=5,8) hasta una densidad $1-2x10^5$ protoplastos/ml

-Se alicuotó en placas de petri e incubó en oscuridad o iluminación muy suave a aprox. 24 °C.

Determinación de la actividad GUS.

-A diferentes tiempos de incubación, tomar una alícuota de las células en cultivo y centrifugar a 6xg por 5-7 min.

-Se retiró la mayor parte del sobrenadante y se adicionaron 500 μl de buffer de extracción GUS (Na_2PO_4 pH=7 50 mM; DTT 5 mM; Na_2EDTA 1mM; sarcosil 0,1%; Tritón X-100 0,1%).

-Se vortexeó durante 1-2 min y se centrifugó a máxima velocidad por 5min. Se mantuvo a -80°C hasta el momento de la cuantificación.

-Se adicionaron 50 μl de buffer de extracción (conteniendo el lisado de protoplastos) a 450 μl de buffer de ensayo (MUG 1mM en buffer de extracción). Se incubó 10 min a 37ºC y se tomó una alícuota (100 μl) para considerar como blanco (color de fondo o "background" de la reacción por lisis espontánea del MUG). Se detuvo por adición de Na_2CO_3 0,2M.

-A distintos tiempos de incubación (hasta 2 hs) se retiraron alícuotas para seguir el desarrollo de la reacción.

-Se determinaron los niveles de fluorescencia en cada muestra utilizando un fluorómetro (absorción: 365nm; emisión: 455 nm) y se compararon con stándards (MU en buffer de extracción GUS) de concentración conocida, usando un Perkin-Elmer LS-5B Luminiscence Spectrometer (USA).

Marcación *in vivo* de proteínas.

Los protoplastos se obtuvieron del modo descripto en párrafos anteriores y se incubaron en alícuotas conteniendo 1-2 x 10^5 protoplastos en presencia de 30 μg/ml de Actinomicina D (Calbiochem, USA), que es un inhibidor de la síntesis de proteínas eucarióticas.

-A distintos tiempos se adicionaron 5 μCi/ml de una mezcla de ^{35}S-metionina y cisteína (NEG-072 EXPRE^{35}S^{35}S, New England Nuclear, USA, 11.O mCi/ml) diluídos 1:100 en medio de cultivo de protoplastos.

-Al cabo de una hora de marcación, las células se cosecharon por centrifugación a 6 xg, el medio se retiró y se adicionó medio volumen de buffer Laemli 2X, en el cual las células se resuspendieron y lisaron.

-Los lisados se hirvieron por 3-4 min y se centrifugaron a máxima velocidad por 5 min.

-Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15%, de acuerdo a [Maniatis, T et al., 1989].

Extracción de ARN de protoplastos en cultivo.

-Se cosecharon 1-2x10^5 células a baja velocidad (6 xg).
-Se retiró el medio de cultivo y reemplazó por 200 µl de buffer de extracción (Tris-HCl pH=8.0 50mM; NaCl 100mM; EDTA 1mM; SDS 0,25%; Brij-58 1%; Na-ácido deoxicólico 0,4%; Na-sarcosil 1%) y 200 µl de fenol saturado en H_2O
-Se agitó mediante un vórtex durante 3 min.
-Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min.
-Se realizó una nueva extracción fenólica a la fase acuosa.
-Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo Eppendorf y agregó 500 µl de etanol.
-Se dejó precipitando 1-2 hs a -20 ºC.
-Se centrifugó a 15K por 15-20 min a 4 ºC.
-Se lavó el pellet con etanol 70% y resuspendió en 100 µl de TE o H_2O DEPC.
-Se reprecipitó con NaAcO 0,3M final y etanol.
-Se mantuvo a -80ºC.

Inoculación de plantas de tabaco con los transcriptos infectivos.

-Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi NN) transgénicas para el gen de la proteína de movimiento del TMV [Deom, C, M, et al., 1991] de 4-5 semanas de edad, mantenidas en cámara de cultivo en condiciones controladas.
-Se diluyeron las transcripciones al medio en buffer fosfato 10mM (de concentración final).
-Se aplicó carborúndum sobre la superficie de la media-hoja a infectar, e inoculó con la alícuota correspondiente.
-Se dejó aproximadamente 2 min y enjuagó suavemente con H_2O
-Se mantuvo en una cámara de cría bajo condiciones controladas hasta la aparición de síntomas.

TRANSFORMACION Y CHEQUEO DE LAS AGROBACTERIAS

Conjugación triparental

-Se crecieron las cepas en forma independiente en presencia de los antibióticos correspondientes. (*E coli* conteniendo la construcción de interés, *E coli* pRK2013 -aporta las funciones de movilización y transferencia- y *A tumefaciens* GV3111SE -que es la cepa receptora-)

-Se transfirieron 250 µl de cada cultivo a un único tubo Eppendorf. Se centrifugaron las células y descartó el sobrenadante.

-Se resuspendieron en 100 µl de LB fresco.

-Se plaquearon en medio sin antibióticos y crecieron a 28ºC durante 24-36 hs.

-Se estriaron en una placa conteniendo los 3 antibióticos, para seleccionar los transconjugantes. Se crecieron a 28ºC.

Extracción de ADN total de *Agrobacterium.*

(basado en el método publicado por [Dhaese, P et al., 1979]).

-Se inocularon 5 ml de medio 5S3 con una colonia aislada. Se crecieron ON a 28ºC.

-Se transfirieron 1,5 ml de cultivo a un tubo Eppendorf y cosecharon las células por centrifugación a 12000 xg por 5min.

-Se descartó el sobrenadante y resuspendió en 300 µl de TE.

-Se agregaron 100µl de Sarcosil (de un stock 5%) e invertió el tubo para homogenizar bien.

-Se agregaron 150µl de una solución de pronasa (Sigma Chemical Co., USA, 5 mg/ml en TE) y se mezcló bien.

-Se incubó a 37ºC por espacio de una hora.

-Se agregaron 500µl de fenol:cloroformo y se pipeteó la solución viscosa a través de una punta de micropipeta de tipo "azul" unas 5 veces, para romper la masa viscosa de membranas bacterianas que se ha formado.

-Se separaron las fases por centrifugación a 12000 xg durante 5min.

-Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se extrajo 3 veces más.

-Se agregó 0.05 volúmenes de NaCl 5M y 3 volúmenes de etanol preenfriado a -20ºC. Se dejó a -20ºC por 2 hs.

-Se centrifugó a 12000 xg por 10 min. Se descartó el sobrenadante y lavó el pellet con etanol 70%.

-Se removió el sobrenadante con extremo cuidado y secó parcialmente bajo vacío.

-Se resuspendió en 50μl de H_2C

OBTENCION Y CHEQUEO DEL MATERIAL TRANSGÉNICO:

Transformación de papa mediada por *Agrobacterium.*

(El protocolo utilizado es una modificación del de [Rocha-Sosa, M et al., 1989], según se describe en [del Vas, M, 1993]).

Las hojas a transformar se obtuvieron de plantas micropropagadas de unas 4 semanas de edad, mantenidas en cámaras de cría.

-Las hojas se hirieron haciendo un corte perpendicular al pecíolo con un bisturí. Se colocaron aproximadamente 15 explantos con el envés hacia arriba en una placa de Petri conteniendo 10 ml de medio P líquido suplementado con sacarosa al 2%.

-Los explantos se cocultivaron agregando 30 µl de un cultivo de *Agrobacterium* en fase logarítmica tardía.

-Se incubó a 22ºC, a baja intensidad de luz, durante 48 hs.

-Los explantos se colocaron en forma individual en medio de regeneración (sales de MS, glucosa 1%, zeatina 2µg/ml, cefotaxime 300µg/ml, kanamicina 50µg/ml, agar 0,6%, pH=5,7). Se subcultivaron a medio fresco cada semana, reduciendo a la mitad la concentración de cefotaxime al cabo de un mes.

-Se separaron los brotes diferenciados (de más de 0,5 cm de altura) y transfirieron individualmente a medio de enraizamiento (medio P de micropropagación suplementado con cefotaxime y kanamicina).

Transformación de tabaco mediada por *Agrobacterium.*

-Se inoculó 4ml de medio 5S3 (o YM, que incrementaría la virulencia de la bacteria) conteniendo los antibióticos apropiados con 2-3 colonias aisladas de *Agrobacterium* tomadas de una placa fresca.

-Se diluyó el cultivo ON hasta que alcanzó una DO_{550nm} de 0,8.

-Se tomaron 1-2 hojas sanas de una planta joven crecida en invernáculo (4-6 semanas).

-Inmediatamente, se esterilizaron las hojas sumergiéndolas durante 8 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20% (a partir de una solución comercial que es 5,25% P/V) y 0,1% SDS. Se dejó secar dentro del flujo laminar.

-Una vez que la hoja estuvo seca, se la sumergió en una solución de etanol 70% durante 5s.

-Con un sacabocado de diámetro 0,35 cm se obtuvieron los explantos a partir de la hoja ya esterilizada, dejándolos caer directamente sobre una placa de medio MS10 sólido (sales para medio básico de Murashige -Sigma, USA- 0,44%; sacarosa 3%; ANA 0,1 mg/ml; BAP 1mg/ml; agar 0,7%; pH=5,8). Se dispusieron aproximadamente unos 30-40 discos de hoja por placa.

-Se volcó el contenido del cultivo líquido en la placa con los explantos. Se homogenizó bien.

-Con un pipeta estéril se removió el exceso de líquido y los explantos se dispusieron con el envés hacia la placa.

-Se coincubaron por 24-48 hs (dependiendo la tasa de crecimiento de la bacteria en particular) a 26-28ºC y bajo un fotoperíodo de 14 hs luz.

-Pasado este período, se transfirieron no más de 20 discos de hoja (por placa) a nuevo MS10 suplementado con kanamicina (100µg/ml) y carbenicilina .

-Aproximadamente cada 3 semanas los discos fueron transferidos a placas frescas.

-Al cabo de unas pocas semanas a partir de la masa de *callo* empezaron a formarse yemas; Una vez que éstas poseían 3-4 hojas bien desarrolladas (y un tallo de 3 mm) eran transferidas a medio de enraizamiento (MS10 sin hormonas) conteniendo kanamicina (100µg/ml) y carbenicilina (350µg/ml).

-Luego de 2 semanas las raíces empezaron a hacerse evidentes; cuando desarrollaban un sistema radicular, eran transplantadas a tierra.

Extracción de ADN de plantas de tabaco.

(El método utilizado es una modificación del reportado por [Dellaporta et al., 1983]).

-Se molieron 100-200 mg de tejido joven en presencia de N_2 líquido en un Eppendorf de 2 ml de capacidad. El polvo permaneció congelado hasta la adición del buffer de extracción.

-Se agregó 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl pH=8 10mM; EDTA 50 mM; NaCl 500mM; β-mercaptoetanol 10mM).

-Se agregaron 55µl de SDS 20%, mezclando vigorosamente.

-Se incubó a 65ºC por 10 min.

-Se agregaron 220µl KAcO 6M y se mezcló vigorosamente; Se dejó 15 min a 0ºC.

-Se centrifugó a máxima velocidad a 4 ºC por 15 min.

-Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo conteniendo 0,7 ml de isopropanol; Se dejó precipitando a -20ºC por 20 min.

-Se centrifugó a máxima velocidad a 4 ºC por 15 min.

-Se descartó el sobrenadante y dejó secar el pellet invirtiendo el tubo sobre un papel de filtro por 10 min.
-Se resuspendió en 200 µl de H_2O bd.
-Se hizo una extracción con fenol:cloroformo (1:1).
-Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y reprecipitó con NaAcO 0,3M final y 0,5 vol de isopropanol.
-Se centrifugó a 4ºC por 5 min a máxima velocidad.
-El pellet se lavó con 500 µl de etanol 80%; se lo dejó secar invirtiendo el tubo sobre un papel de filtro por 10 min.
-Se resuspendió en 20-30 µl de H_2O bd o TE.

Extracción de ARN a partir de tejidos vegetales

(según el método de [Logemann, J et al., 1987], para muestras con bajo contenido de almidón)

-Se homogenizó el tejido con N_2 líquido.
-Se agregaron 2 volúmenes de buffer guanidinio (cloruro de guanidinio 8M; MES pH=7 20 mM; EDTA 20mM; β-mercaptoetanol 50mM; preparado fresco para cada extracción) a 200 mg de tejido.
-Se agregó 0,2- 1 volúmen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó por 45 min a 10000 xg.
-Se tomó la fase acuosa y se le agregaron 0,7 volúmenes de etanol y 0,2 de ácido acético (preenfriados).
-Se dejó a -20ºC ON o a -80ºC durante 60 min.
-Se centrifugó a 10000 xg por 10 min.
-Se lavó el pellet dos veces con NaAcO 3M pH=5,2.
-Se centrifugó a 10000 xg por 5 min.
-Se hizo un lavado final con etanol 70%.
-Se resuspendió en H_20 DEPC.

Tanto los Southern como los northern blots (hechos en geles desnaturalizantes en presencia de formaldehido) se realizaron de acuerdo con Maniatis et al. (1989) para membranas de nitrocelulosa BA-S ("optitran supported

NC", Schleicher & Schüll, Alemania) y transferencias no alcalinas.

Las sondas radiactivas se prepararon usando productos de PCR purificados en geles de agarosa y se marcaron por la reacción de marcación de hexanucleótidos al azar, según las especificaciones del fabricante (Prime-a-gene kit, Promega Biotech, USA)

Las sondas fueron purificadas a través de columnas MicroSpin (Pharmacia Biotech, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se utilizaron aproximadamente 50 ng de ADN y se obtuvo una sonda de actividad específica de ~10^8 dpm/μg de ADN.

Las fotos correspondientes a los geles de agarosa fueron realizadas con un digitalizador de imágenes "Foto analyst" de Fotodyne Corporation y analizadas con los programas Collage y NIH para computadoras Macintosh.

Resultados y Discusión

1 -CONSTRUCCION DE VARIANTES DEL CASSETTE DE EXPRESION PRO1.

Construcción de PRO1.NG y sus derivados.

Con el fin de caracterizar la actividad del plásmido PRO1 y sus derivados in vivo, se procedió a subclonar el gen uidA que codifica para la ß-glucuronidasa (en adelante, referida como GUS) río abajo del sitio de clivaje en 3' (Figura 1.1). Este gen marcador es de uso corriente en ensayos de protoplastos debido a la relativa sencillez de los métodos para detectar su actividad y a la estabilidad de la enzima.

Se digirieron PRO1 y PRO1.SNG con BamHI y EcoRI. El producto de las digestiones se corrió en un gel de agarosa y se purificaron las bandas del tamaño deseado (Geneclean, USA). Se identificaron los clones recombinantes capaces de liberar el inserto por digestión con las mismas enzimas utilizadas para clonar.

El plásmido seleccionado, PRO1.NG (Figura1.1), fue utilizado como base para la construcción de una serie de versiones diferentes del cassette, con intención de mejorar los niveles citoplasmáticos de proteínas obtenidos a partir del mismo.

Para optimizar los niveles citoplasmáticos de las proteínas obtenidos a partir de la versión original del cassette, se ensayaron modificaciones del gen de la proteasa.

Con el objeto de aumentar los niveles citoplasmáticos de la poliproteína, se decidió delecionar la región que contiene las señales de localización nuclear (posiciones 161 a 407), dando origen al clon PRO1.ΔBNG (Figura 1.1).

A tal efecto, se digirió PRO1.NG con SmaI y BamHI, se hicieron romos los extremos protruyentes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, se purificó la banda del tamaño deseado y se llevó a cabo la reacción de ligación usando una baja concentración de ADN, para favorecer la ligación intracatenaria.

Tal como se comentó en la introducción, Dougherty y Dawn-Parks (1991) encontraron que existía un sitio de clivaje interno en la proteasa NIa que podría delimitar bioquímicamente los dominios VPg (el amino terminal) y proteolítico (el carboxi-terminal). Los autores comprobaron que los 241 aminoácidos C -terminales (27 kDa) de NIa podían funcionar independientemente como una proteasa aún cuando fueran expresados como parte de polipéptidos de mayor tamaño.

Con el mismo fin descripto en párrafos previos se procedió a delecionar todo el dominio VPg de la proteína (posiciones 161 a 752), lo cual resultó en el clon PRO1.ΔHNG (Figura 1.1).

En este caso fue necesario llevar a cabo una digestión parcial de PRO1.NG, del modo descripto en Materiales y Métodos, dado que una de las enzimas (HindIII) necesarias para llevar a cabo la deleción sin alterar el marco de lectura abierto de la proteasa, posee un sitio interno de corte.

Para contar con un control apropiado a utilizar en futuros ensayos de electroporación de protoplastos, se delecionó en forma completa el gen que codifica para NIa, de manera tal que el gen *uidA* se exprese a partir de las mismas secuencias regulatorias que en las restantes construcciones.

Para ello, se digirió PRO1.NG con SmaI y StuI, se purificó la banda del tamaño apropiado y se llevó a cabo la reacción de ligación en las condiciones descriptas anteriormente para favorecer la ligación intracatenaria.

El plásmido resultante se llamó PRO1.G (Figura 1.1).

En un diseño alternativo para aumentar los niveles citoplasmáticos de la poliproteína, se decidió utilizar el clon PRO2.6KN, en el cual se había clonado previamente la proteína de 6 kDa -de TEV- en el extremo 5' del gen de la proteasa; a su vez, se había realizado una mutación puntual sobre la secuencia de clivaje entre las 2 proteínas, con el fin de evitar el procesamiento de la poliproteína a ese nivel. Se espera que la fusión 6 kDa/NIa retenga a la proteasa en el

citoplasma [Restrepo-Hartwig, MA et al., 1994]. Nuevamente, se procedió a subclonar el gen de la ß-glucuronidasa río abajo del sitio de corte en 3', utilizando BamHI y EcoRI, y el clon resultante se denominó PRO2.6KNG (Figura 1.1).

La Figura 1.1 resume en un esquema todas las construcciones realizadas.

Figura 1.1.

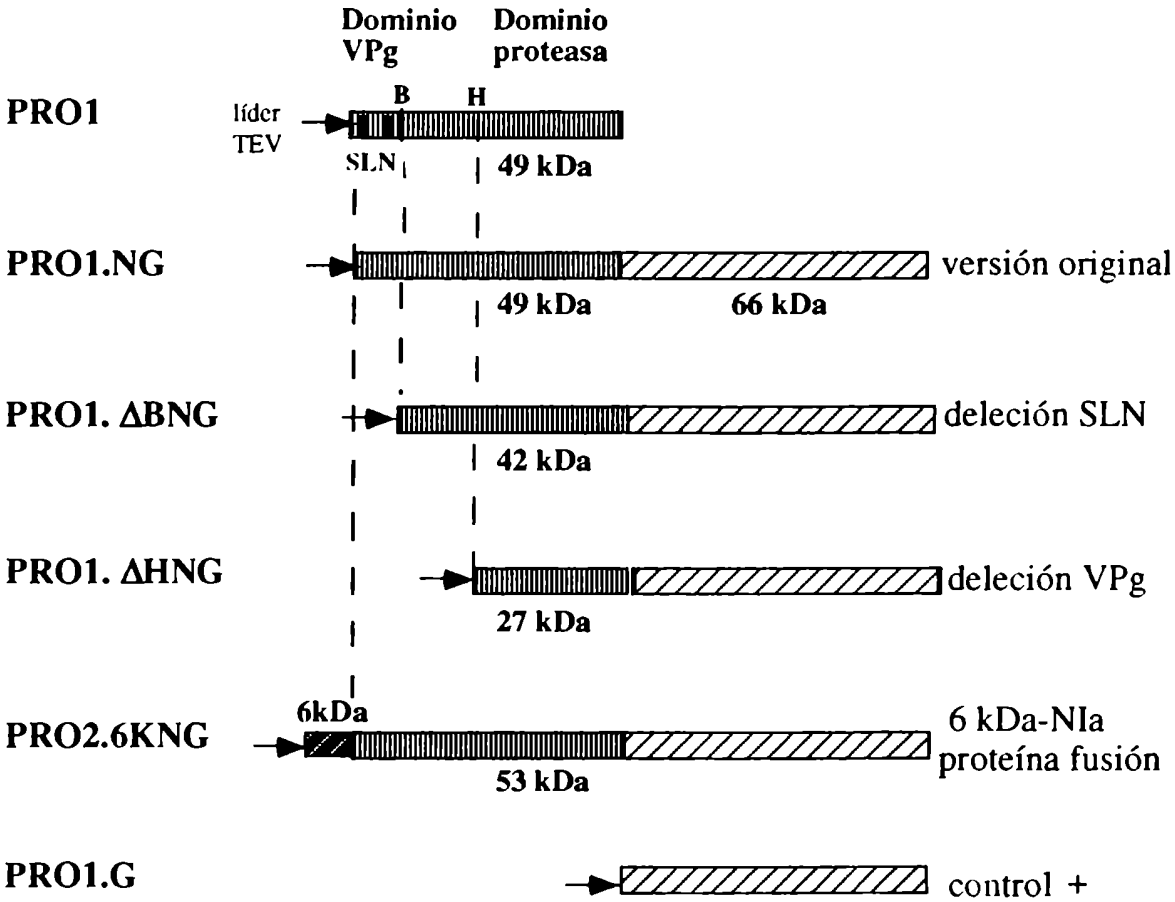


Figura1.1. Esquema de las construcciones derivadas de PRO1. En rayado oblícuo, el gen *uidA*. En rayado vertical, la proteasa NIa. Se indican las deleciones internas llevadas a cabo en cada construcción, así como los pesos moleculares esperados de las proteínas resultantes. La flecha indica la posición del líder de TEV. B: sitio BamHI. H: sitio HindIII. SLN: posición relativa de las señales de localización nuclear.

La Figura 1.2 muestra los clones recombinantes seleccionados para la posterior caracterización de su capacidad proteolítica en experimentos *in vitro*.

Figura1.2.

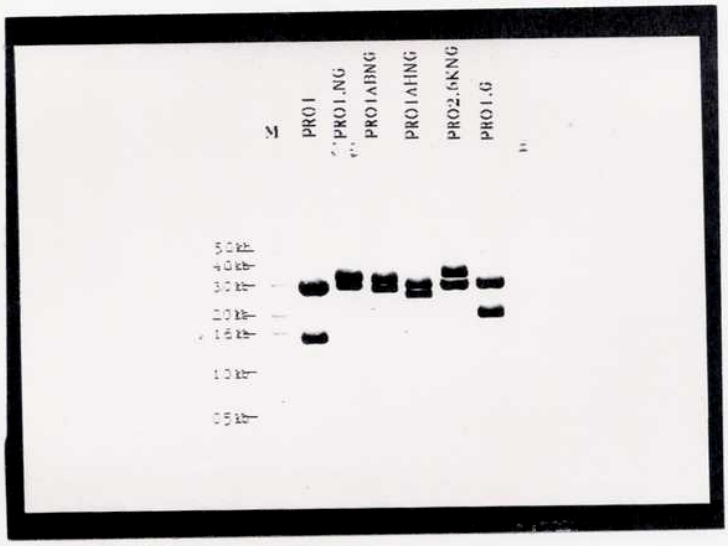


Figura1.2.
Patrón de restricción de los distintos clones que se muestran en la Figura 1.1 con BglII y EcoRI, enzimas que liberan el cassette completo. En el margen izquierdo, escalera de 1 kb (GIBCO-BRL) como marcador de tamaño molecular. Calle 1: PRO1. Calle 2: PRO1.NG. Calle3: PRO1.ΔBNG. Calle 4: PRO1.ΔHNG. Calle 5: PRO1.6KNG. Calle 6: PRO1.G.

Caracterización del procesamiento *in vitro* de las distintas versiones de NIa.

Con la intención de caracterizar la actividad proteolítica de las versiones delecionadas de NIa, y como paso previo a la utilización de los distintos clones en experimentos de expresión transiente, se realizaron reacciones de transcripción y subsecuente traducción *in vitro* con cada uno de ellos.

Figura 1.3.

Figura 1.3. Transcriptos *in vitro* correspondientes a los clones que se indican en la Figura. Calle 1, PRO1. Calle 2, PRO1.NG. Calle 3, PRO1.ΔBNG. Calle 4, PRO1.ΔHNG. Calle 5, PRO1.G y Calle 6, PRO1.6KNG. En el margen izquierdo, ADN de fago lambda digerido con HindIII y EcoRI (λHindIII-EcoRI) como marcador de tamaño molecular.

Todas las construcciones (incluyendo a PRO1 como control positivo) se linearizaron con SalI (que tiene un sitio único hacia el 3' del cassette); una alícuota se corrió en gel de agarosa para confirmar que la digestión fue completa; en caso contrario se procedió a purificar la banda correspondiente a la forma lineal del plásmido. Las transcripciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 1.4 se muestra la autoradiografía de un gel en el que se corrieron proteínas marcadas con ^{35}S-metionina, obtenidas en los experimentos de transcripción y posterior traducción *in vitro* descriptos anteriormente.

Figura 1.4.

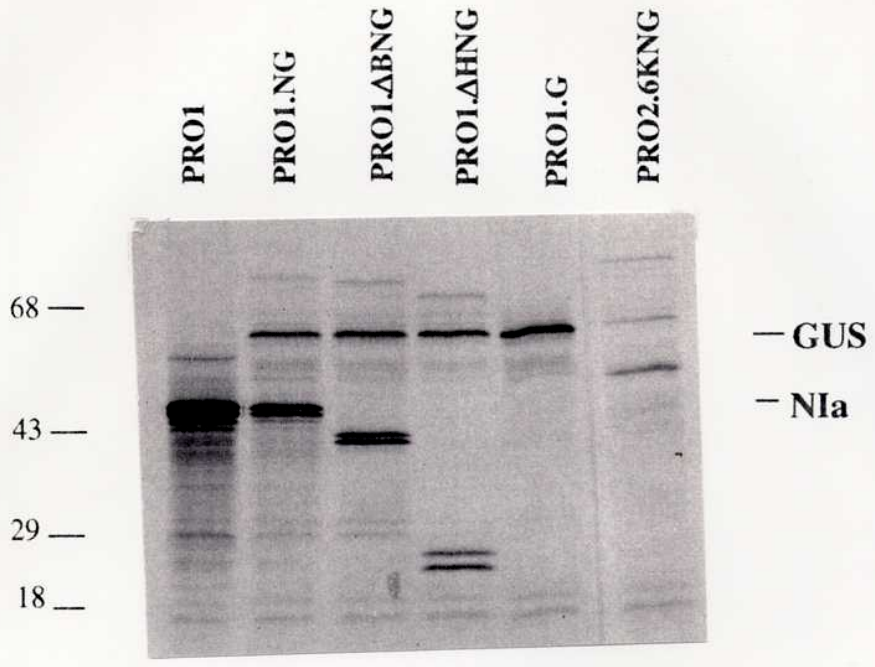


Figura 1.4. Patrón de proteínas obtenidas a partir de la traducción *in vitro* de los transcriptos provenientes de las distintas construcciones. En el margen izquierdo se indica la posición de los patrones de tamaño molecular conocido.
Se tomaron 7 µg de ARN de cada clon para usar como templado en las traducciones *in vitro*. La reacción se llevó a cabo del modo indicado por la ficha técnica del proveedor (Promega, USA) en presencia de ^{35}S-metionina (Amersham, USA). Se analizó una alícuota de cada traducción en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. El gel se fijó y se secó en un secador de geles durante una hora a 60°C. Se dejó exponiendo durante toda la noche con film X-Omat (Kodak).

En la Figura anterior se evidencia la presencia de bandas de tamaño molecular correspondientes a las proteínas NIa (49, 42, 27 y 55 kDa, calles 2, 3, 4 y 6, respectivamente) y GUS (~60 kDa, calles 2-6); Este hecho es indicativo de que ha ocurrido procesamiento postraduccional en todos los clones, lo que a su vez implica que las deleciones internas realizadas sobre NIa no produjeron ningún cambio en el marco de lectura de la misma y que la proteasa continúa siendo activa. Asimismo, la movilidad electroforética de la banda correspondiente a NIa varía, en total concordancia con las deleciones internas efectuadas sobre esta proteína. Marcos y Beachy (1994) demostraron que este tipo de

procesamiento es específico de NIa y no un artefacto de la técnica.

Una última observación da cuenta de que el procesamiento es altamente satisfactorio y comparable en todas las variantes de la proteasa (PRO1.NG, PRO1.ΔBNG y PRO1.ΔHNG), aún cuando en los 3 casos se evidencia una banda débil a la altura de la poliproteína indicando que no fue completo.

En la calle correspondiente a PRO2.6KNG se ven las bandas correspondientes a GUS y a 6 kDa/NIa (que corre ligeramente por encima de NIa); sin embargo, y contrariamente a lo descripto en el párrafo anterior, la banda de "precursor no procesado" es -en proporción- más abundante. Una posible explicación de esta observación sería que la fusión de la proteína 6 kDa a NIa inhibiera el procesamiento a nivel del segundo sitio (río arriba respecto de GUS).

Estos resultados alentadores nos llevaron a pensar que todos estos clones tenían capacidad potencial de ser funcionales *in vivo*.

Caracterización de la actividad *in vivo* de los diferentes clones.

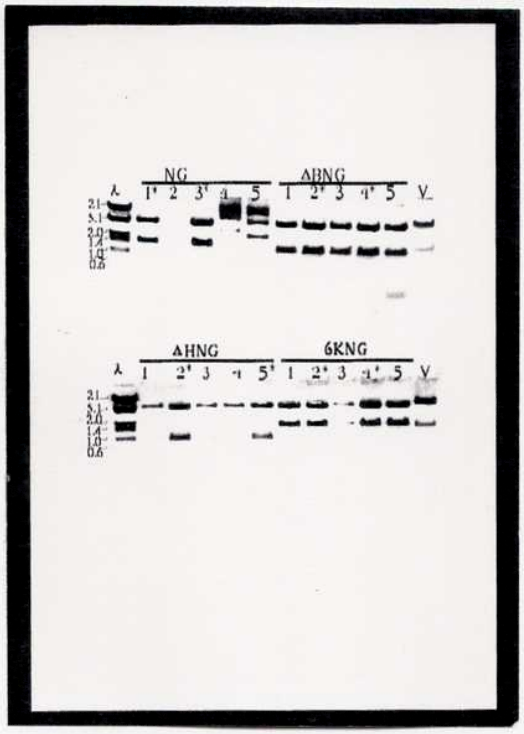
Subclonado en pMON921.

Para poder llevar a cabo la caracterización *in vivo* de las distintas versiones del cassette, fue necesario subclonarlas en un plásmido adecuado, es decir, aquel que posea secuencias regulatorias funcionales en plantas. Se eligió el plásmido pMON 921 que contiene un sitio múltiple de clonado conveniente bajo la regulación de un promotor doble del transcripto de 35S del virus del mosaico del coliflor y la región 3' no codificante del gen de la nopalina sintetasa (donde se encuentran las señales de poliadenilación, etc).

Para llevar a cabo los subclonados se digirió ADN de PRO1.NG, PRO1.ΔBNG, PRO1.ΔHNG, PRO1.G y PRO2.6KNG con BglII y EcoRI (que liberan el cassette completo incluyendo la secuencia 5' no codificante), así como también al vector (utilizando las mismas enzimas de restricción). Los clones recombinantes se identificaron por restricción (Figura 1.5). Los plásmidos obtenidos se denominaron pMON.NG, pMON.ΔBNG, pMON.ΔHNG, pMON.G y pMON2.6KNG.

A fin de contar con una cantidad apropiada de ADN de cada construcción para los subsiguientes experimentos en protoplastos, se realizaron maxi preparaciones de ADN utilizando las columnas de DEAE-celulosa de Promega (USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Figura1.5.



Patrón de restricción de 5 clones independientes perteneciente a cada experimento de subclonado (NG: pMON.NG; ΔB: pMON.ΔBNG; ΔH: pMON.ΔHNG; 6K: pMON.6KNG). Los clones seleccionados para utilizar en ensayos subsiguientes se indican con un asterisco. En el margen izquierdo, ADN de fago lambda digerido con HindIII y EcoRI (λHindIII-EcoRI) como marcador de tamaño molecular. V: vector parental.

Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

A fin de comparar la capacidad *in vivo* de cada una de las construcciones de expresar el gen marcador GUS, se transformaron protoplastos de tabaco con las diferentes

construcciones.

Para ello se obtuvieron protoplastos de tabaco a partir de una suspensión de células en cultivo del modo detallado en Materiales y Métodos. Luego de realizar el recuento del número de células y comprobar una alta viabilidad de la preparación de protoplastos, se procedió a la transformación. En todos los casos se utilizaron aproximadamente 1 x 10^6 protoplastos viables y 30 µg de ADN. Las condiciones de electroporación fueron puestas a punto anteriormente. Las utilizadas en esta serie de experimentos fueron 300 V (volts) y 150 µF (microfaradios).

Luego del shock eléctrico en presencia del ADN los protoplastos se cultivaron por 24 hs, se cosecharon por centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en mínimo volumen. Se les adicionó buffer de extracción para la reacción de GUS y se lisaron mediante agitación con un vórtex (1-2 min). Se llevó a cabo la detección de la actividad GUS incubando una alícuota del lisado con el buffer que contiene el sustrato fluorométrico de la enzima GUS (MUG). Para ello, se tomó una muestra a los 10 min de iniciada la reacción de modo de conocer los niveles de fondo ("background" -debidos, por ejemplo, a la lisis espontánea del sustrato-); a las 2 hs se tomó otra alícuota (a este tiempo la curva de la reacción alcanza un *plateau*) para determinar los niveles de actividad GUS en cada una de las muestras. A su vez, se realizó una curva de calibración utilizando una serie de diluciones de concentración conocida con el producto de la reacción (MU).

Para poder comparar los datos obtenidos, se utilizó una nueva alícuota del lisado para cuantificar los niveles de proteínas presentes en cada muestra con una variante del método de Bradford.

Los datos se expresaron como cantidad de producto obtenido por unidad de tiempo (es decir, actividad GUS) por µg de proteína.

Figura 1.6.

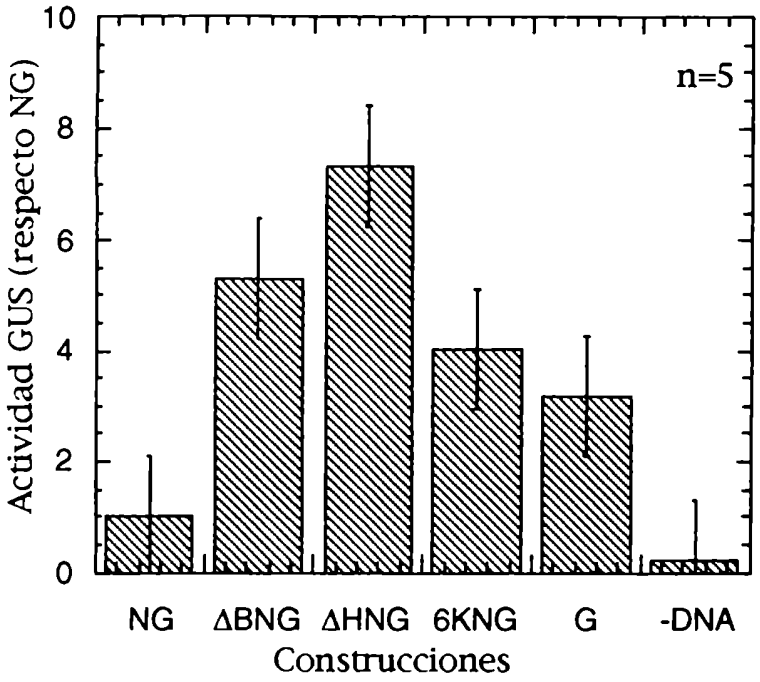


Figura 1.6. Comparación de la actividad GUS a partir de las diferentes construcciones.

El diagrama de barras muestra los valores de actividad enzimática a partir de cada construcción normalizados a los obtenidos al electroporar con la versión inicial del cassette (PRO1.NG). Cada barra es el promedio de 5 experimentos independientes (las barras incluyen el error estándar).

Estos resultados indican que las células transformadas con las construcciones que expresan las versiones modificadas de la proteasa (es decir, pMON1.ΔBNG y pMON1.ΔHNG) resultan en mayores niveles de actividad GUS, comparables -inclusive ligeramente superiores- a los obtenidos a partir del plásmido que codifica únicamente para el gen de la ß-glucuronidasa (pMON1.G). Tales valores fueron entre 2 y 8 veces superiores a los obtenidos a partir del gen completo que codifica para NIa (pMON1.NG). El clon pMON2.6KNG dio resultados intermedios, presentando mayor variabilidad

experimental.

Para disminuir la variabilidad experimental que podría dificultar la comparación de los niveles de actividad GUS obtenidos a partir de las distintas construcciones, se decidió llevar a cabo una serie de experimentos de cotransformación incluyendo en todos los casos la misma concentración de un segundo plásmido que porta el gen *luc* (que codifica para la luciferasa de luciérnaga, [Ow, DW et al., 1986]). Se esperaba que este segundo gen reportero se expresara en forma equivalente en los grupos de protoplastos transformados con las distintas construcciones; en lugar de eso se observó que los valores de actividad LUC seguían la misma tendencia que los de actividad GUS, con lo cual esta estrategia resultó inútil como alternativa para estandarizar los datos obtenidos a partir de los distintos grupos experimentales. Una hipótesis que podría explicar los resultados observados es que la expresión del gen de la proteasa de longitud completa resultara parcialmente tóxica para las células, alterando su estado fisiológico y con ello la expresión de los genes portados por el segundo plásmido.

DISCUSION

Al ser utilizado en la obtención de plantas transgénicas, la versión inicial del cassette de expresión PRO1 [Marcos, JF et al., 1994], que se basa en la expresión del gen que codifica para la proteasa NIa de longitud completa, dio como resultado bajos niveles de las restantes proteínas codificadas, de modo tal de hacer difícil su evaluación por técnicas de uso corriente [Marcos, JF et al., 1996]. En ese contexto se hizo evidente la necesidad de modificar esta primera versión con el fin de aumentar los niveles citoplasmáticos de las proteínas de interés. A tal efecto, se llevaron a cabo una serie de deleciones internas en NIa todas tendientes a alterar la localización final de la poliproteína.

De los resultados detallados en el presente capítulo se desprende que todas las modificaciones introducidas en NIa resultaron en versiones que mantuvieron su actividad proteolítica *in vitro*, inclusive aquella deleción que comprende los 190 aminoácidos N-terminales (que definen el dominio VPg de la proteína, [Murphy, JF et al., 1990]), la cual conservó su capacidad a niveles comparables con la original (Figura 1.4 y Figura 2 en [Parks, TD et al., 1992]). En particular, Parks, Smith y Dougherty (1992) demostraron que la tasa de procesamiento llevado a cabo por la p49 (NIa de longitud completa) no varía respecto de la p27 (sólo el dominio proteasa) a nivel del heptapéptido de clivaje que se encuentra entre NIb y la CP, mientras que sí a nivel del que se halla entre las proteínas P3 y CI. Estos autores llevaron a cabo este trabajo en un intento por demostrar que la secuencia del sitio de clivaje podría ser un punto extra en la regulación de la producción de proteínas durante el ciclo de replicación potyviral.

Si bien existen múltiples reportes acerca de la actividad de diferentes versiones de NIa *in vitro* ([Dawn-Parks, T et al., 1995]; [Rorrer, K et al., 1992]; [Parks, TD et al., 1992]; [Dougherty, WG et al., 1991], entre otros), ninguno de ellos hizo las comparaciones pertinentes *in vivo*.

Para ello se subclonaron las diferentes construcciones en un plásmido apto para la expresión transitoria en experimentos con protoplastos. Se utilizó el gen *uidA* como reportero, debido a la relativa sencillez, así como a la sensibilidad, de los métodos de detección accesibles.

Los resultados obtenidos (Figura 1.6) muestran claramente que todas las modificaciones llevadas a cabo en el gen NIa se tradujeron en un aumento (de magnitud variable para las distintas construcciones) en los niveles citoplasmáticos de proteína GUS con respecto a los expresados a partir de la poliproteína conteniendo el gen de longitud completa. Este hecho resultó alentador en contexto de los objetivos propuestos ya que posibilitó la elección de la mínima versión de la proteasa (en la cual se removió todo el

dominio VPg de la proteína) como "core" del nuevo cassette de expresión.

2-LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS DIFERENTES VERSIONES DE LA PROTEASA.

Para poner a prueba la hipótesis de que el aumento en los niveles de expresión obtenido a partir de las variantes del cassette se debe a un cambio en la localización subcelular de la poliproteína (que en teoría se acumularía en el citoplasma en lugar de dirigirse hacia al núcleo donde -luego de formar cuerpos de inclusión- sería sustrato de procesos degradativos) se decidió llevar a cabo la fusión carboxiterminal de las diferentes versiones de la proteasa al gen *uidA*, de modo de contar con una herramienta que permita seguir el destino de las variantes de NIa dentro de la célula en ensayos de expresión transiente mediante la detección de actividad GUS *in situ*.

Estas versiones no procesables a nivel del sitio 3' de clivaje de la proteasa se obtuvieron tomando como punto de partida el plásmido PRO4.NT [Marcos, JF et al., 1994] en el cual la secuencia de clivaje en ambos extremos de la proteasa fue mutada para incluir gli en lugar de his en la posición -1, lo cual inhibe el procesamiento específico llevado a cabo por NIa, según fue demostrado previamente ([Dougherty, WG et al., 1988] y [Dougherty, WG et al., 1989]).

Construcción de PRO3.NG y sus derivados.

Como punto de partida para obtener las versiones fusionadas proteasa-GUS se reemplazó el gen que codifica para la proteína de cápside de TMV por el gen *uidA* en PRO4.NT, dando como resultado PRO4.NG, el cual sirvió como base para los subclonados posteriores. En todos los casos se subclonó el fragmento BglII-SpeI de las diferentes versiones de la proteasa en PRO4.NG, dando lugar a PRO3.NG, PRO3.ΔBNG, PRO3.ΔHNG y PRO4.6KNG (Figura 2.1). El número "3" hace referencia a que sólo hay inhibición del

procesamiento a nivel del sitio de clivaje del extremo 3' [Marcos, JF et al., 1994].

Figura 2.1.

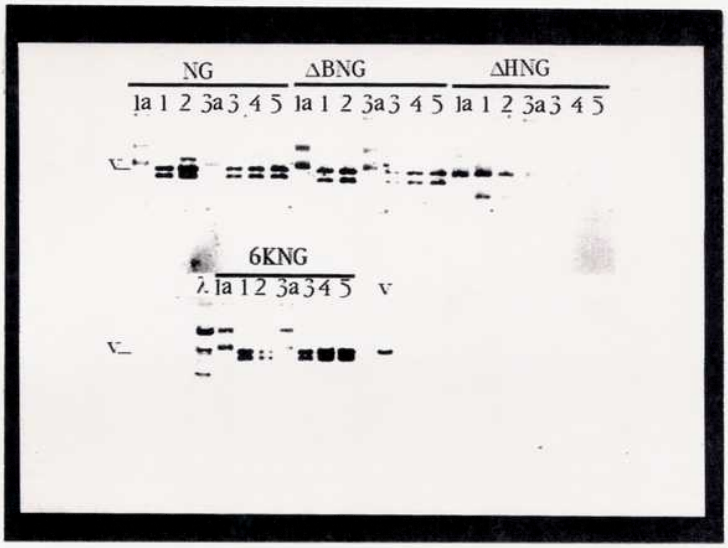
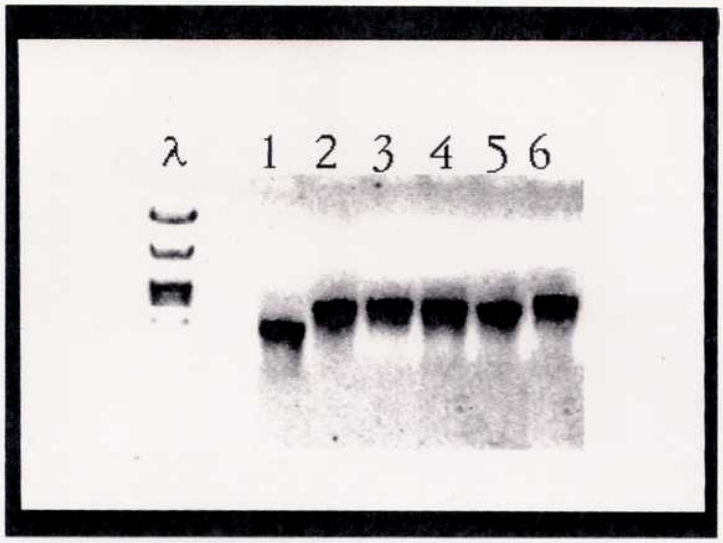


Figura2.1.
Patrón de restricción de 5 clones recombinantes independientes para cada una de las construcciones (NG: PRO3.NG; ΔB: ΔBNG; ΔH: ΔHNG; 6K: 6KNG; V: PRO4.NG). El ADN fue restringido con BglII y StuI para liberar el gen de la proteasa. Los clones seleccionados para experimentos posteriores se señalan con un asterisco. En el margen izquierdo se sembró λHindIII-EcoRI como patrón de tamaño molecular.

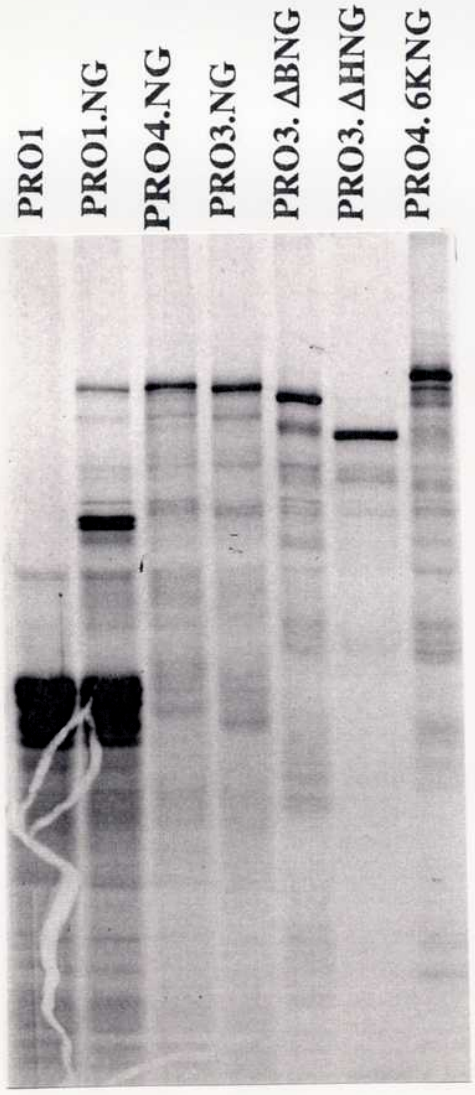
Para confirmar que las nuevas construcciones dan origen al transcripto NIa-GUS fusionado, y como paso previo a su utilización en experimentos de expresión en protoplastos, se realizaron reacciones de transcripción y subsecuente traducción *in vitro* con cada uno de ellos.

En la Figura 2.2 se observan los resultados obtenidos.

Figura 2.2.



a) Transcriptos correspondientes a los clones (1:PRO1.NG; 2:PRO4.NG; 3:PRO3.NG; 4:PRO3.ΔBNG; 5:PRO3.ΔHNG; 6:PRO4.6KNG) luego de electroforesis en gel de agarosa al 1,2%.



b) Patrón de proteínas obtenidas a partir de la traducción *in vitro* de los transcriptos fusionados, corridos en un gel SDS-PAGE. En el margen izquierdo se indica la posición de los patrones de peso molecular conocido.

En PRO1.NG se observan las bandas esperadas para NIa (49 kDa) y GUS (68 kDa); a su vez no se observa ninguna banda correspondiente a la fusión de ambas proteínas, lo cual es consistente con un completo procesamiento del precursor polipeptídico. Por el contrario, en todas las construcciones subsiguientes, la banda mayoritaria corresponde a una proteína de mayor PM, que oscila entre 100 y 120 kDa, de acuerdo a las deleciones realizadas en el gen de la proteasa, y que corresponde a la fusión NIa-GUS, con lo cual se concluye que las construcciones se comportan - *in vitro* - del modo esperado.

Caracterización de la actividad *in vivo* de las fusiones.

Subclonado en pMON921.

Para poder llevar a cabo la caracterización *in vivo* de esta serie de construcciones fue necesario subclonarlas en un vector eucariótico de expresión; nuevamente se eligió el plásmido pMON921. Para ello se digirió ADN de PRO3.NG, PRO3.ΔBNG, PRO3.ΔHNG y PRO4.6KNG, así como del vector, con BglII y EcoRI (de modo de liberar el cassette completo en cada una de las fuentes de inserto). Los clones recombinantes se denominaron pMON3.NG, pMON3.ΔBNG, pMON3.ΔHNG y pMON4.6KNG.

Con ellos se llevaron a cabo una serie de experimentos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco y posterior detección de la actividad GUS *in situ* de modo de estudiar la localización de las fusiones realizadas. Sin embargo esta aproximación resultó infructuosa, posiblemente debido a la baja eficiencia de la técnica de electroporación acompañada de detección de la actividad GUS *in situ.*

Subclonado en ObNL3ΔC.

Una estrategia alternativa fue el uso de un clon infectivo del virus Ob (que es un tobamovirus, [Padgett, HS et al., 1993]) como vector de clonado. Este vector viral fue ingenierizado de modo tal de contener algunos sitios de restricción hacia el 3´ del promotor que regula la expresión de la proteína de cápside -ObΔC- (que es el más eficiente de los promotores subgenómicos virales). Se eligió una variante (ObNL3-ΔC, [Padgett, H et al., 1996]) capaz de producir lesiones locales en hospedantes que contienen el gen N de resistencia (responsable de la respuesta hipersensible en tabaco; [Whitham, S et al., 1994]). Esto representa una ventaja al momento de confirmar la infectividad de los clones recombinantes como paso previo a su utilización en ensayos de expresión transitoria.

Se decidió subclonar en ObNL3-ΔC las fusiones conteniendo la proteasa de longitud completa así como también aquella versión en la cual el dominio VPg fue removido por completo.

Para ello se digirió PRO3.ΔHNG con BglII y EcoRI y el vector ObNL3 ΔC con SpeI. Los extremos se hicieron romos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el vector fue tratado con fosfatasa alcalina de intestino de ternero para disminuir el fondo ("background") debido a religamiento del vector. Se obtuvieron 4 clones recombinantes de los cuales 2 estaban en la orientación correcta y se denominaron ObΔC-3ΔHNG (clones 5 y 10, Figura 2.3a).

Para obtener ObΔC-3NG se reemplazó el fragmento SwaI-SpeI de ObΔC-3ΔHNG por el correspondiente proveniente de PRO1.NG, de modo de recrear el gen de longitud completa (SwaI tiene un sitio único en el 5´NTR, mientras que SpeI lo tiene en la región carboxi terminal de NIa). Se obtuvo un clon positivo que fue confirmado por restricción con varias enzimas (Figura 2.3-b)

Figura 2.3.

Figura 2.3.

a) Patrón de restricción de ObΔC (control, calle 1) y ObΔC-3ΔHNG clones 5 y 10 (calles 2 y 3) digeridos con EcoRV. A la derecha, λHindIII-EcoRI, como marcador de tamaño molecular.

b) Patrón de restricción de ObΔC-3ΔHNG (calles 2, 4, 6 y 8) y ObΔC-3NG (calles 1, 3, 5 y 7) digeridas con EcoRV (calles 1-2), SphI (3-4), EcoRI (5-6) y SpeI (7-8). A la izquierda, λHindIII-EcoRI.

Los clones recombinantes se secuenciaron por el método de los dideoxinucleótidos [Sanger, F et al., 1977] para confirmar la orientación del inserto así como la conservación del marco de lectura del cassette.

En la Figura 2.4 se muestran los resultados obtenidos en el caso de ObΔC-3NG.

Figura2.4.

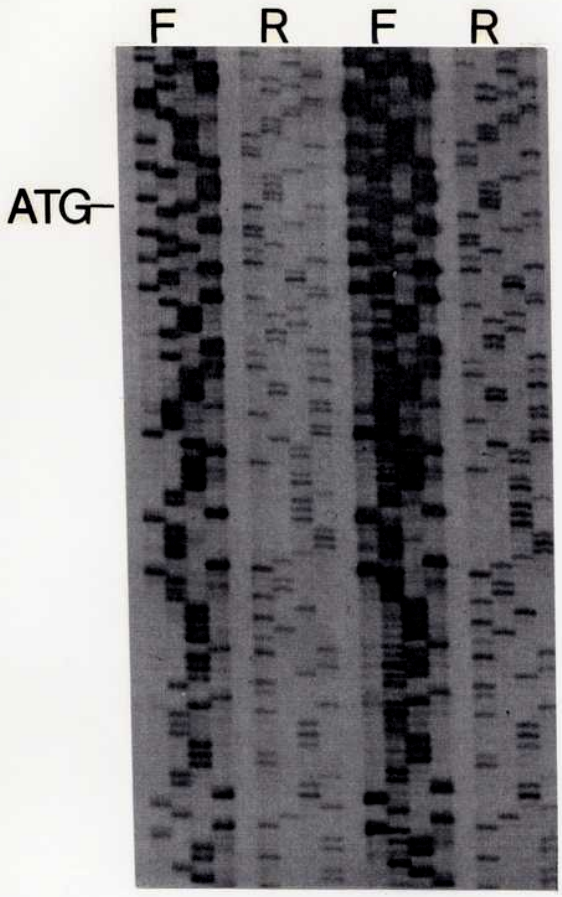


Figura2.4.
Fragmento de aproximadamente 100 nt del clon ObΔC-3NG secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos usando Ob-For y Ob-Rev (ver Tabla I) como iniciador. Se señala el ATG de iniciación de la traducción, así como el comienzo del gen de la proteasa.

Obtención y chequeo de los transcriptos infectivos.

Una vez identificados los clones recombinantes se los utilizó como templado en reacciones de transcripción *in vitro*. Los resultados de la electroforesis de los productos de transcripción se muestran en la Figura 2.5.

Figura 2.5.

Transcriptos correspondientes a los clones recombinantes construídos. Los clones se indican en la Figura.
Todas las construcciones (incluyendo a ObΔC-GUS, cedido amablemente por el Dr. Padgett, The Scripps Research Institute, para utilizar como control positivo) se linearizaron con BstEII (que tiene un sitio único hacia el extremo 3' del vector). Se corrió una alícuota en un gel de agarosa para confirmar que la digestión fue total; se extrajo el ADN restante dos veces con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol. Después de realizar las transcripciones *in vitro*, se separó una alícuota de cada transcripto para confirmar la integridad del mismo.

Los productos de transcripción se dividieron en dos alícuotas iguales, una para chequear la infectividad de los clones y la restante para su uso en experimentos de expresión transitoria.

Se realizaron las inoculaciones sobre plantas jóvenes de tabaco (*N. tabacum tabacum* NN, transgénicas para el gen de la proteína de movimiento de TMV [Deom, C, M, et al., 1991]).

Los productos de transcripción se diluyeron al medio en buffer fosfato y dos medias hojas (sobre las cuales previamente se había esparcido carborúndum para facilitar la abrasión) se inocularon manualmente con cada transcripto.

Los transcriptos derivados de ObΔC-3ΔHNG y ObΔC-3NG produjeron el mismo tipo de lesiones locales en tabaco que los controles correspondientes (Figura 4.5). No obstante, la aparición de las mismas fue posterior a la de los controles positivos, indicando alguna demora en la replicación de los virus recombinantes (una causa posible podría ser la longitud excesiva del inserto, aunque no se han realizado experimentos que avalen dicha hipótesis).

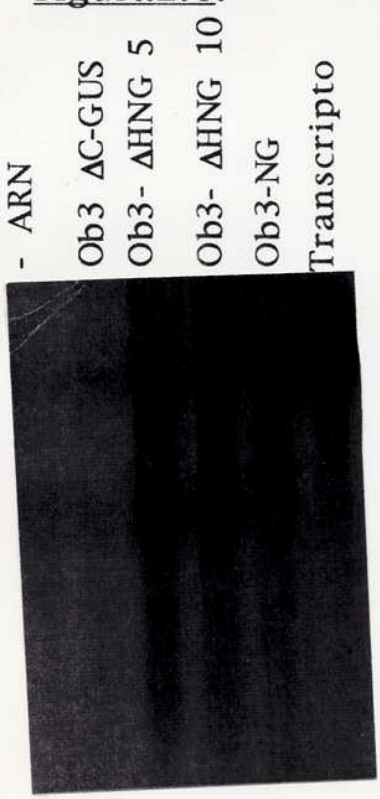
Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

Una vez confirmada la capacidad infectiva de los clones recombinantes se utilizó la segunda alícuota de los transcriptos para transfectar protoplastos obtenidos a partir de una suspensión celular de tabaco (BY-2).

Las condiciones de electroporación fueron las mismas que las utilizadas previamente para el caso de ADN. Las células se plaquearon a una densidad de $2x10^5$ células/ml. Se cosecharon alícuotas (conteniendo 2×10^5 células) a distintos tiempos para analizar la replicación de los virus (y, por consiguiente, la expresión de las fusiones).

24 hs post-electroporación se extrajo ARN de una alícuota de células transformada con cada construcción. Las mismas se cosecharon por centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en el buffer de extracción. Los ARN extraídos se mantuvieron en etanol a -80ºC hasta el momento de realizar el Northern blot. La Figura 2.6 detalla los resultados obtenidos.

Figura2.6.



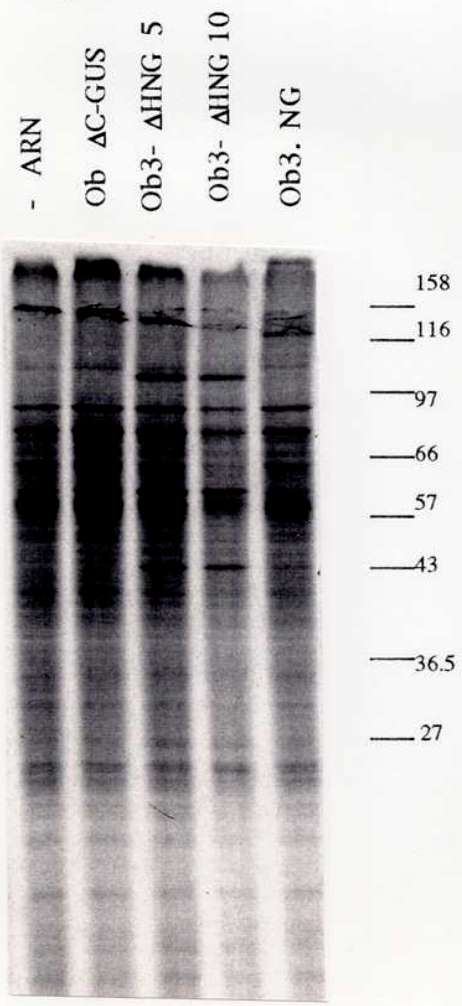
Autoradiografía de una membrana de nitrocelulosa a la cual se transfirió un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5%. En todos lo casos se sembraron 20 µg de ARN total. En la calle 1, ARN de células electroporadas en ausencia de transcripto (control negativo). Calle 2, protoplastos transformados con ObΔC-GUS. Calles 3 y 4, ObΔC-3ΔHNG 5 y 10, respectivamente. Calle 5, ObΔC-3NG. Calle 6,transcripto *in vitro* proveniente del clon ObΔC-3NG, como control positivo. La sonda utilizada fue ΔHNIa, amplificada por PCR y marcada por la técnica de iniciación al azar.

Tal como se desprende de la Figura anterior, todos los transcriptos fueron capaces no sólo de infectar sino también de replicar en protoplastos de tabaco, en congruencia con los resultados de infectividad.

En todas las calles se observa una serie de bandas que hibridan específicamente con NIa. Tal como se indica en la figura, dichas bandas corresponden al ARN genómico y a diversos subgenómicos [Dawson, WO et al., 1990]. La banda mayoritaria responde al subgenómico expresado a partir del promotor de la proteína de cápside. En el control positivo se evidencia una banda extra de mayor tamaño molecular, que correspondería al ADN lineal usado como templado de la transcripción *in vitro*.

A su vez, se realizó una marcación *in vivo* de proteínas, incubando a las células en presencia de una mezcla de aminoácidos radiactivos. Los resultados obtenidos se visualizan en la Figura 2.7.

Figura2.7.



Perfil proteico de los protoplastos incubados en presencia de aminoácidos radiactivos.
Se incubaron 2 x 10^5 células en una mezcla de aminoácidos marcados (^{35}S-met y cis) durante una hora y en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas (que afecta principalmente la síntesis de proteínas celulares por encontrarse en menor abundancia). Al cabo del período de incubación, las células se cosecharon por centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en buffer de electroforesis Laemli. Se corrió una alícuota de cada tratamiento en un gel de poliacrilamida al 15%. En el margen izquierdo se indica la posición de los marcadores de tamaño molecular conocido.

En las calles correspondientes a ObΔC-3ΔHNG (3-4) se evidencian bandas no existentes en el control de células electroporadas sin ARN, lo cual es índice de que ha ocurrido replicación viral. La banda diferencial de mayor tamaño molecular se ubica ligeramente por debajo del marcador de 97 kDa, lo cual coincide con el tamaño molecular aproximado de la fusión ΔHNIa-GUS (que es 95 kDa). Asimismo se observa una banda que ronda los 40 kDa, de naturaleza desconocida.

En la calle correspondiente a ObΔC-3NG (5) no se distinguen bandas diferenciales a la altura de la fusión (aproximadamente 117 kDa); sin embargo dicha banda residiría en una región poco resolutiva del gel, en la que además se observan otras proteínas celulares marcadas y que podrían impedir la visualización de la misma.

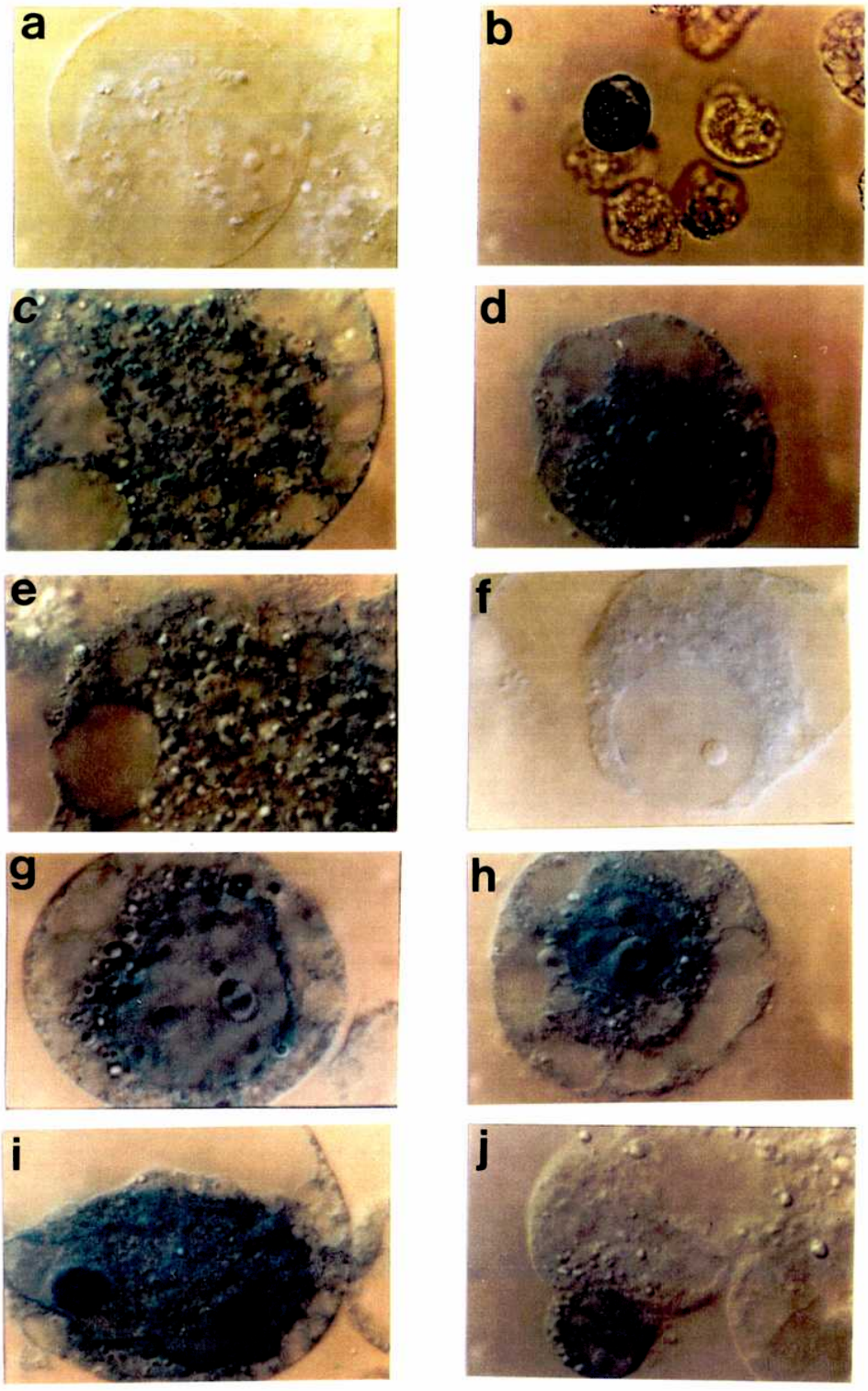
Del mismo modo, fue imposible detectar la proteína GUS en este tipo de experimentos, aun cuando es bien conocida su naturaleza altamente estable y que su contenido en met y cis es el apropiado para obtener una buena marcación. Se descarta que el problema resida en el transcripto, pues como resultará evidente en la sección que sigue, los protoplastos electroporados con el transcripto ObΔC-GUS desarrollaron un intenso color azul apenas unos minutos después de incubados en presencia del sustrato cromogénico.

Localización subcelular de las fusiones.

Con la intención de confirmar si las deleciones llevadas a cabo en el gen que codifica para NIa alteraron la acumulación de dicha proteína en los compartimientos subcelulares (de acuerdo a lo reportado por Restrepo-Hartwig y Carrington (1992)), se incubaron células provenientes de cada tratamiento en buffer fosfato conteniendo 1mM final del sustrato X-glu. Las células se mantuvieron a 28ºC por un lapso que varió entre 30 min y 2 hs, conforme progresaba la reacción.

Los resultados obtenidos se visualizan en la Figura 2.8.

Figura2.8.



Localización en protoplastos de las fusiones a GUS. a) Protoplastos electroporados en ausencia de ARN. b-c) Protoplastos electroporados con ObΔC-GUS. d-f) Distintas células transfectadas con ObΔC-3ΔHNG. g-j) Protoplastos electroporados en presencia de ObΔC-3NG. En todos los casos salvo en b) se utilizó un objetivo de inmersión de 1000X de magnificación en un microscopio Nikon (Nikon Optiphot EUD con un aditamento diascópico de Nomarski) con contraste de interferencia diferencial (DIC). El aumento utilizado en b) es 400X.

Tal como se observa en la Figura 2.8, los transcriptos dieron origen a una proteína de fusión GUS funcional, ya que es capaz de reconocer su sustrato cromogénico y así dar lugar a la aparición de la coloración azul (b-j). La expresión de los transcriptos ObΔC-GUS (como control positivo) y ObΔC-3ΔHNG (la versión de la proteasa en la cual las señales de localización nuclear fueron removidas) dio origen a células completamente teñidas de azul (b, d y f), sin ninguna localización en particular. No pudo descartarse que el tono azul de la región nuclear se deba a la superposición de citoplasma sobre el núcleo en el plano focal de la foto.

A su vez, el transcripto ObΔC-3NG dio lugar a la acumulación de coloración azul principalmente en la región del núcleo (j), y en especial en la membrana nuclear (g) y en los nucleolos (i), en concordancia con lo publicado hasta el presente.

DISCUSION.

Muchas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales y son dirigidas a distintos compartimientos subcelulares. La entrada de proteínas al núcleo, por su parte, requiere de la presencia de señales de transporte que actúan independientemente de la posición que ocupan en la proteína, las cuales no son removidas durante la translocación [Dingwall, C et al., 1986]. Tal como se comentó oportunamente, varios potyvirus inducen la formación de cuerpos de inclusión nucleares compuestos por dos tipos de proteínas no estructurales, una de las cuales es NIa. Restrepo, Freed y Carrington propusieron en 1990 el uso del sistema de fusión al gen que codifica para la β-glucuronidasa como el de elección para seguir el movimiento de las proteínas NIa y NIb en células infectadas con el virus TEV. Los autores realizaron ensayos de expresión transitoria en los que observaron que las fusiones carboxi-terminales a GUS (GUS/NIa o NIb) eran -al menos- un orden de magnitud más activas que las fusiones amino-terminales

(NIa o NIb/GUS). Como la intención de la primera etapa del proyecto era incrementar los niveles citoplasmáticos de las proteínas de interés (Capítulo 1), y en base a los resultados comentados en el párrafo anterior [Restrepo, MA et al., 1990], se eligió clonar el gen *uidA* en la situación más desventajosa desde el punto de vista de los niveles de expresión, es decir, en la forma NIa/GUS. Con el mismo criterio se realizaron las fusiones para seguir la localización de las versiones de NIa dentro de la célula.

Tal como se muestra en la Figura 2.2b, las distintas construcciones dieron lugar a productos de fusión del tamaño esperado, las cuales conservaron el marco de lectura correcto a juzgar por la actividad enzimática detectable en protoplastos infectados con derivados de las mismas (Figura 2.8).

La elección del vector viral Ob facilitó la visualización de los resultados de localización subcelular dada su capacidad de replicar autónomamente en el citoplasma de la célula, posibilitando así la amplificación del templado para la transcripción y subsiguiente traducción.

Se intentó una caracterización más completa sólo en el caso de las construcciones principales (es decir, la que contenía a NIa de longitud completa -NG- y la versión que comprendía únicamente el dominio proteasa -ΔHNG-, ambas como fusiones al gen *uid A*). Se obtuvieron los transcriptos correspondientes, los cuales probaron ser infectivos al dar origen a la formación de lesiones locales típicas cuando fueron inoculados en hospedantes hipersensibles. Una segunda alícuota de estos mismos transcriptos fue utilizada para ensayos de expresión transitoria en protoplastos. En ellos, si bien por la técnica de marcación *in vivo* de proteínas no pudo detectarse la proteína de fusión de mayor peso molecular (proveniente de Ob3.NG), su presencia se hizo evidente en los ensayos histoquímicos de detección de la actividad GUS (Figura 2.8 g-j). Estos experimentos mostraron que el transcripto ObΔC-3NG dio lugar a la

acumulación de pigmento azul en el núcleo, especialmente en la membrana nuclear y en los nucleolos, en concordancia con lo publicado hasta el presente. Por su parte, los transcriptos ObΔC-GUS y ObΔC-3ΔHNG dieron origen a células completamente teñidas de azul, sin ninguna localización en particular. Es de notar que este tipo de análisis requiere un manejo cuidadoso de la técnica, porque de esperarse tiempos suficientemente prolongados el sustrato cromogénico precipitado comienza a difundir y se pierde nitidez en la localización de la actividad.

Con esto se concluye que la localización subcelular fue efectivamente modificada (de nuclear a citoplasmática) con las deleciones introducidas.

3-CONSTRUCCION Y ANALISIS DE LOS CLONES CONTENIENDO LOS GENES DE CAPSIDE DE INTERÉS.

Como resultado de los experimentos descriptos en los capítulos anteriores se concluyó que la versión más pequeña del cassette (en la cual se delecionó todo el dominio VPg de la proteasa) era la más conveniente para clonar allí *las pro*teínas de cápside viral.

Como primer paso fue necesario rediseñar el cassette de expresión (PRO1.ΔHNG) de modo de recrear el sitio de clonado SmaI e incluir un nuevo sitio de procesamiento de la proteasa; con respecto a este punto se decidió cambiar el utilizado en la versión inicial del cassette (que era el que existe naturalmente río arriba de NIa) por el que se encuentra entre NIb-CP, que fue reportado como el de procesamiento más eficiente [Dougherty, WG et al., 1989b].

Para ello se diseñó un par de oligonucleótidos específicos, 5'PD-NIa y NIaC (cuya secuencia se detalla en la Tabla I), con los cuales se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como templado PRO1.ΔHNG. El producto de amplificación fue digerido en forma secuencial con SmaI y EcoRI y subclonado en el vector PRO1 previamente abierto con las mismas enzimas de restricción. El clon resultante se llamó PRO10 (Figura 3.1) y fue secuenciado completamente utilizando el método de Sanger, para descartar la ocurrencia de mutaciones durante el proceso de amplificación.

Clonado de los genes de cápside viral:

Los genes correspondientes a las proteínas de cápside de los virus PVX, PVY y PLRV (todos ellos procedentes de aislamientos locales) fueron cedidos gentilmente por el Dr Fernando Bravo-Almonacid ([Bravo-Almonacid, F, 1992],

los dos primeros) y la Dra. Mariana del Vas [del Vas, M, 1993], el correspondiente a PLRV.

Para contar con estos genes en el contexto de sitios de restricción apropiados fue necesario diseñar oligonucleótidos específicos (cuya secuencia se detalla en la Tabla I) de manera de adicionar sitios romos en fase que permitan clonarlos en PRO10 sin alterar el marco abierto de lectura del cassette de expresión.

Los genes de cápside fueron amplificados por PCR usando oligonucleótidos específicos y los templados apropiados. Los productos de amplificación fueron digeridos con EcoRI y KpnI y posteriormente clonados en el vector comercial pBS KS (+) abierto con las mismas enzimas, dando origen a pBScpPVX, pBScpPVY y pBScpPLRV, respectivamente. Al menos dos clones recombinantes para cada gen fueron secuenciados por el método de Sanger, en un intento por identificar aquellos que no contuviesen diferencias con respecto al templado, que fueron utilizados para realizar los clonados subsiguientes.

√ Obtención de PRO10.YN:

Como primer paso para obtener las contrucciones finales conteniendo las tres proteínas de cápside fue necesario clonar PVY-CP en el sitio localizado en el extremo 5' de la proteasa. Para ello se digirió secuencialmente pBScpPVY con SmaI y EcoRV y se linearizó el vector (PRO10) con SmaI. El clon resultante de la ligación se denominó PRO10.YN (Figura 3.1).

Para confirmar que la unión entre ambos genes habia ocurrido de modo tal de no distorsionar el marco abierto de lectura del cassette, los sitios de unión se secuenciaron usando los oligonucleótidos 5'NTR y 5'PVY-2 (que inician la síntesis en dirección 5'→3' y 3'→5' respectivamente), cuya secuencia se detalla en la Tabla I.

√ Obtención de PRO10.XYN y PRO10.YNX:

Como paso subsiguiente se decidió clonar el gen PVX-CP en los sitios río arriba de PVY-CP (en 5') o río abajo de NIa (en 3').

Para lograrlo se digirió la fuente de inserto (pBScpPVX) con EcoRV y se linearizó el vector (PRO10.YN) con SmaI o *con* StuI, según el caso. Los plásmidos recombinantes resultado de esta etapa fueron PRO10.XYN y PRO10.YNX (Figura 3.1). Nuevamente se secuenciaron los sitios de unión utilizando 5'NTR y 5'PVY-2, en el caso de PRO10.XYN, y NIaC7, en el caso de PRO10.YNX (ver Tabla I).

Estas construcciones permitirán comparar la expresión de PVX-CP a partir de los distintos sitios de clonado en plantas de tabaco transgénicas, en forma análoga a lo realizado por Marcos y Beachy para el gen de cápside de TMV (1994).

√ Obtención de PRO10.LRYN:

Posteriormente se decidió clonar PLRV-CP en el sitio 5' del gen de cápside de PVY, para lo cual se digirió el vector (PRO10.YN) con SmaI y el inserto (pBScpPLRV) con EcoRV. El plásmido resultante se denominó PRO10.LRYN, y al igual que en los casos anteriores los sitios de unión entre los genes fueron secuenciados utilizando 5'NTR y 5'PVY-2.

√ Obtención de PRO10.LRYNX:

Para construír el vector final conteniendo los genes que codifican para las tres proteínas de cápside, se digirió PRO10.YNX (vector) y PRO10.LRYN (inserto) con BglII y SpeI; el clon resultante fue PRO10.LRYNX (Figura 3.1). En este caso no fue necesario secuenciar el clon recombinante ya que las enzimas utilizadas dejan extremos protruyentes y no pueden llevar a cabo un cambio en el marco de lectura de la unidad transcripcional.

La Figura 3.1 resume en un esquema todas las construcciones realizadas.

Figura3.1.

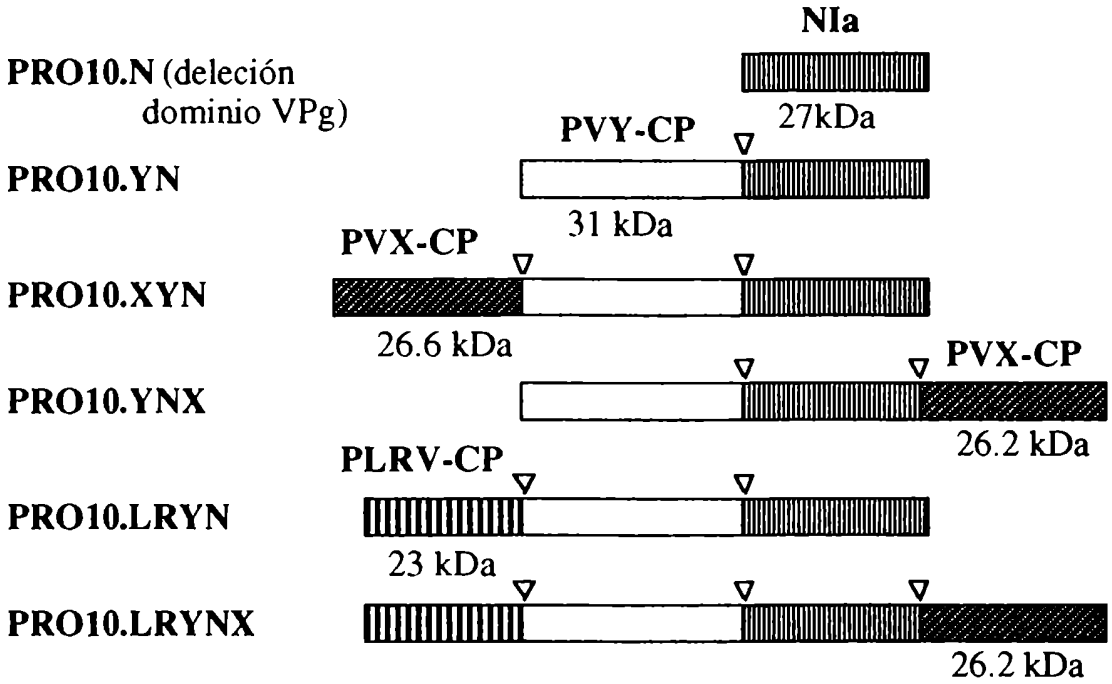


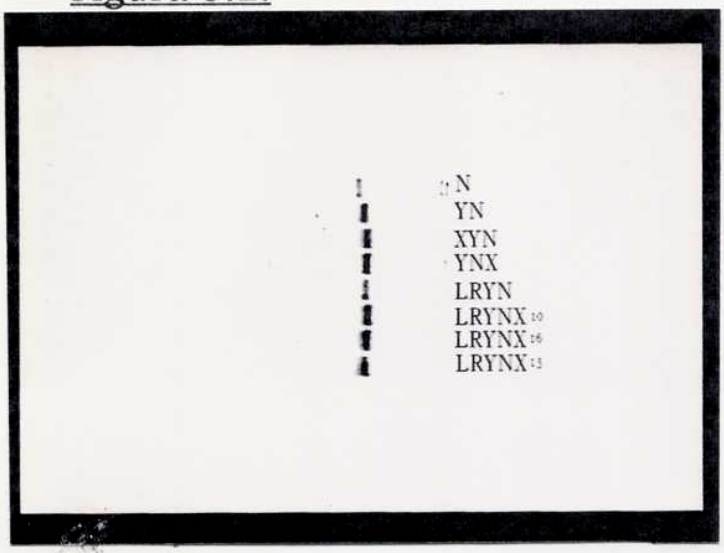
Figura3.1. Esquema de las construcciones derivadas de PRO10.
Se indican los pesos moleculares esperados para las proteínas resultantes.

Caracterización del procesamiento *in vitro* de las distintas construcciones

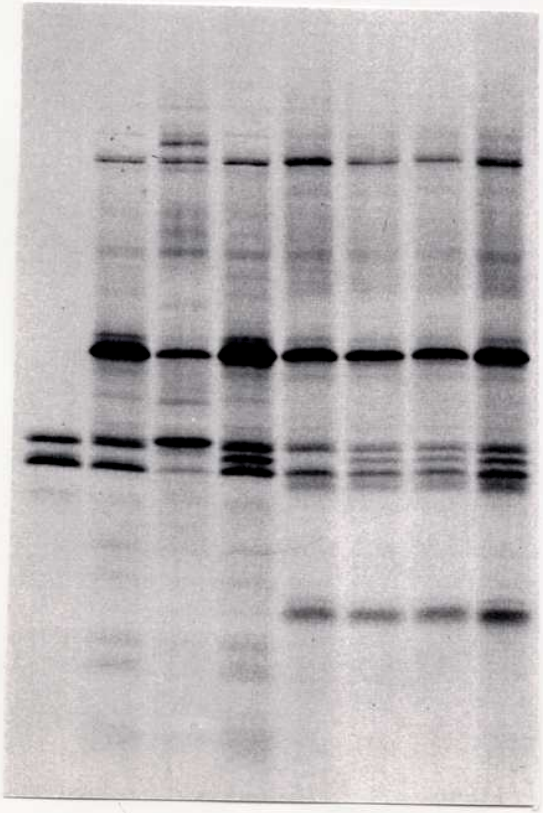
Con la intención de analizar el procesamiento de las distintas poliproteínas como paso previo a su utilización en experimentos *in vivo*, se llevaron a cabo reacciones de transcripción y subsecuente traducción *in vitro* con cada uno de los clones.

La Figura 3.2 muestra los resultados obtenidos.

Figura 3.2.



a) Transcriptos correspondientes a cada uno de los clones, teñidos con bromuro de etidio. Todas las construcciones (incluyendo PRO10 como control positivo) fueron linearizadas con SalI. Una alícuota se corrió en gel de agarosa para confirmar que la digestión fue completa. Las transcripciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.



b) Patrón de proteínas obtenidas a partir de la traducción *in vitro* de los transcriptos obtenidos en a). En el margen se indica la posición de los patrones de peso molecular conocido.

Tanto en la calle correspondiente a PRO10 (como en las restantes derivadas de esta construcción) se observa mayoritariamente la banda en doblete característica de la proteasa (la cual se debería a un subsecuente procesamiento a nivel del extremo C-terminal de la proteína, de función desconocida [Dawn-Parks, T et al., 1995]) de aproximadamente 27 kDa. Desafortunadamente la proteína de cápside de PVX posee un peso molecular semejante al de la versión delecionada de NIa usada en este trabajo, dificultando entonces su visualización en un gel de estas características. Es de notar que las proteínas expresadas a partir de los sitios localizados en el 5' contienen 6 aminoácidos extra (provenientes del heptapéptido de clivaje), mientras que las expresadas en el 3' sólo un aminoácido adicional. Esto justifica una diferencia en el patrón de corrida electroforética como el observado en el caso de PVX-CP en las calles correspondientes a PRO10.XYN y PRO10.YNX (y en PRO10.LRYNX, dado que la cápside de PVX ocupa la misma posición en ambas construcciones).

Asimismo, en todas las construcciones que portan el gen de cápside de PVY (PRO10.YN, XYN, YNX, LRYN y LRYNX) se observa una banda ligeramente superior a la esperada (es decir, de ~ 35 kDa en lugar de 31 kDa, que es el peso molecular esperado luego de la adición de los aminoácidos provenientes del sitio de clivaje). A su vez, en todos los casos excepto PRO10, se observan bandas de mayor peso molecular (en general minoritarias) que corresponderían a precursores procesados en forma incompleta.

De lo expuesto se desprende que el cistrón se expresa correctamente y que el producto de traducción se procesa *in vitro*, confirmando la funcionalidad de la proteasa modificada y su capacidad de reconocer y procesar a nivel de su sitio de clivaje.

En cuanto a PLRV, PRO10.LRYN y PRO10.LRYNX dieron origen a una banda de peso molecular similar al esperado.

Su visualización es más dificultosa probablemente debido a que el contenido de metioninas de esta proteína es inferior al de las restantes (1,9 % en lugar de 5,6 %, como es el caso de PVY) y por lo tanto, su actividad específica es baja.

Inmunoprecipitación de los productos de la traducción *in vitro*.

Para corroborar la naturaleza de las bandas provenientes de la traducción *in vitro*, se decidió llevar a cabo inmunoprecipitaciones usando anticuerpos específicos que reconocen a cada una de las proteínas de cápside.

Figura 3.3.

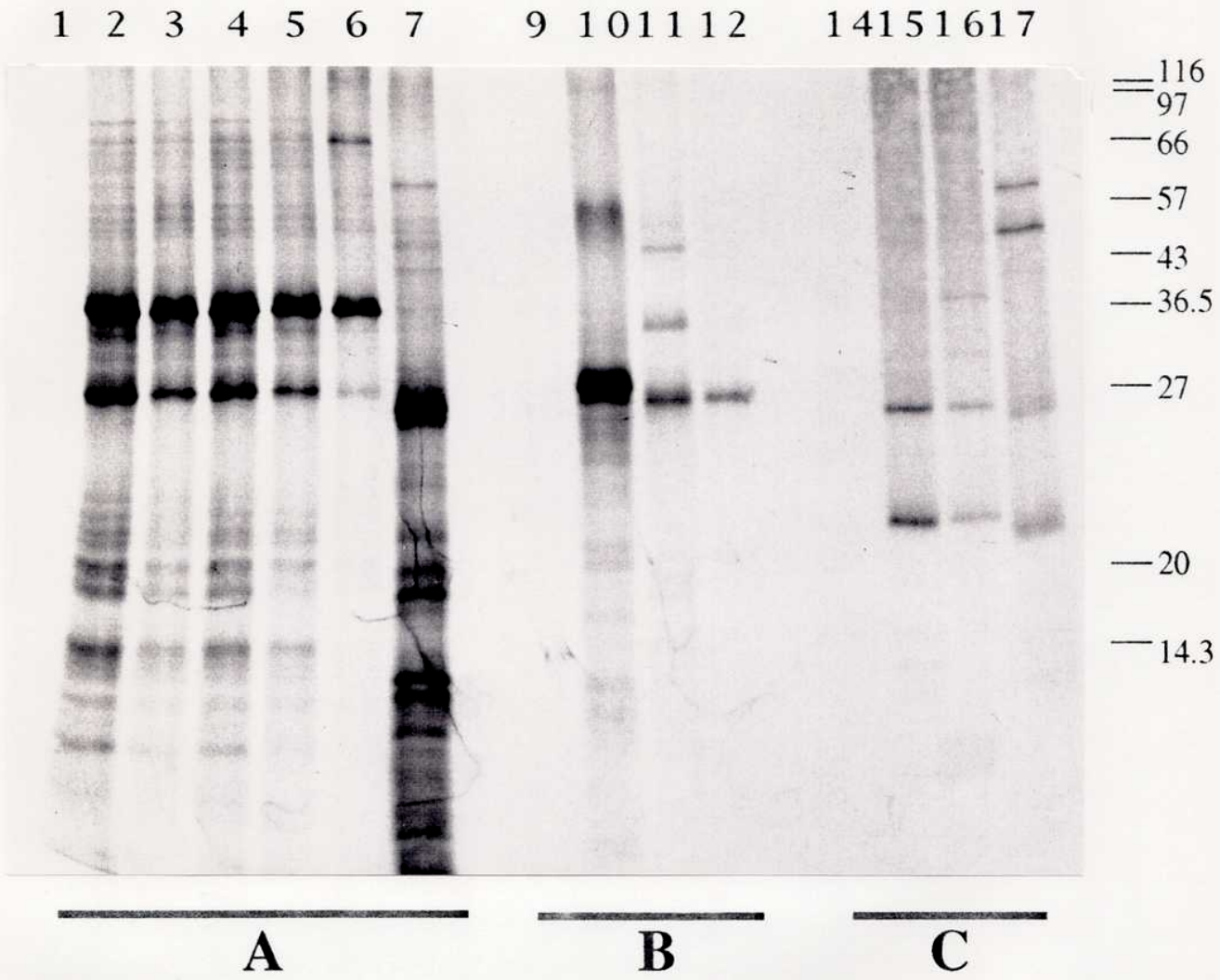


Figura 3.3. Autoradiografía de un gel de poliacrilamida al 15% en el que se sembró una alícuota de las traducciones *in vitro* inmunoprecipitadas con distintos anticuerpos. El gel fue tratado del modo descripto en la leyenda de la Figura 1.4. Calle 1: PRO10; Calles 2 y 9: PRO.YN; Calles 3, 10 y 14: PRO.XYN; Calles 4 y 11: PRO10.YNX; Calles 5 y 15, PRO10.LRYN; Calles 6, 2 y 16: PRO10.LRYNX. Calles 7 y 17: proteína de cápside de PVY y PLRV, respectivamente, traducidas *in vitro*, como controles positivos. Calles 1-7 (A), IgG anti PVY. Calles 9-12 (B), IgG anti PVX. Calles 14-17 (C), IgG anti PLRV. Se incluyeron construcciones relacionadas para utilizar como control negativo.

En la Figura 3.3 se observan los resultados obtenidos con los anticuerpos anti PVX, PVY y PLRV y las construcciones PRO10.YN, XYN, YNX, LRYN y LRYNX.

En el panel de la izquierda (Calles 1-7) las proteínas fueron incubadas con IgG anti PVY; en este caso se obtiene una banda a la misma altura en todas las construcciones que contienen este gen (PRO10.YN, XYN, YNX, LRYN y LRYNX) y que no se observa en PRO10, si bien es evidente cierta inespecifidad a juzgar por el número de bandas débiles que también se observan (las cuales podrían a su vez ser explicadas aduciendo un cierto grado de degradación en la proteína de interés para las de menor tamaño que el esperado, así como el reconocimiento de precursores polipeptídicos procesados en forma incompleta, para las de mayor PM). A su vez, el peso molecular de esta banda mayoritaria no coincide con el de la proteína obtenida a partir de la construcción pBScpPVY, lo cual fue discutido en párrafos anteriores.

En el panel subsiguiente (Calles 9-12) las proteínas fueron incubadas con IgG anti PVX; tanto en PRO10.XYN como en PRO10.YNX y PRO10.LRYNX se observa una banda preponderante y del tamaño adecuado; tal como se comentó oportunamente, la diferencia entre ambas bandas se debe a la adición de 6 aminoácidos en XYN, provenientes del sitio de reconocimiento de la proteasa.

En el de la derecha (Calles 14-17), las proteínas fueron inmunoprecipitadas con IgG anti PLRV; tanto en PRO10.LRYN como en PRO10.LRYNX y en el control positivo (pBScpPLRV) se observa una banda del tamaño adecuado, así como una segunda, de mayor peso molecular, que no puede atribuirse a ninguna de las restantes proteínas (ya

que la calle en la que se corrió el control negativo -PRO10.XYN-) no se visualiza banda alguna.

Dado que las construcciones realizadas se comportan del modo esperado *in vitro*, es decir, se obtienen las proteínas de cápside individuales a partir del procesamiento del precursor polipeptídico, se decidió proseguir con la caracterización de las mismas *in vivo*.

DISCUSION.

El procesamiento de la poliproteína que surge de la traducción del genoma potyviral es llevada a cabo por 3 proteasas, entre las cuales NIa es responsable del procesamiento a nivel de varios sitios.

Esta actividad proteolítica sería llevada a cabo por dos formas posibles de NIa: inicialmente la proteasa se liberaría como un precursor de 49 kDa en forma cotraduccional, el cual consiste de la VPg (21 kDa) en el extremo amino-terminal y la proteasa propiamente dicha (que comprende los 27 kDa carboxi-terminales). En etapas avanzadas del proceso de infección la proteasa también puede encontrarse en la forma de 27 kDa [Dougherty, WG et al., 1991]. Estructuralmente, se piensa que la proteasa de 27 kDa es similar a las serin-proteasas celulares del tipo de la quimotripsina o tripsina, e inclusive, a la proteasa 3C de los picornavirus.

Se han identificado 3 residuos que conformarían el sitio catalítico de la proteasa (histidina, ácido aspártico y cisteína -en lugar de serina-) el cual se asemeja al encontrado en otras proteasas virales [Dougherty, WG et al., 1989b]. Sin embargo, esta proteasa es única respecto de sus requerimientos de sustrato. Como parte del heptapéptido de clivaje, los aminoácidos que ocupan las posiciones P6, P3, P1

y P1' están conservados y son esenciales para un procesamiento óptimo de la poliproteína, mientras que los restantes modularían la tasa a la cual el procesamiento tiene lugar. Este motivo se repite en todos los sitios de clivaje de TEV, excepto en uno [Dawn-Parks, T et al., 1995].

La nueva versión del cassette de expresión fue diseñada en base a la proteasa en su mínima expresión, flanqueada por el sitio de clivaje presente entre las replicasa y la proteína de cápside, que es el que es procesado más eficientemente en la naturaleza [Dougherty, WG et al., 1989b].

Como se desprende de la Figura 3.2b, la proteasa fue capaz de reconocer y procesar a nivel de su sitio específico de clivaje las distintas construcciones conteniendo las proteínas de cápside de interés, inclusive en contexto de proteínas heterólogas, como es el caso de las CP de PLRV y PVX.

Por otra parte, tales proteínas son reconocidas por anticuerpos específicos, lo cual confirma no sólo la funcionalidad de la proteasa sino también la aplicabilidad del sistema de expresión en sí.

4-EVALUACION DE LAS CONSTRUCCIONES VIRALES *IN VIVO.*

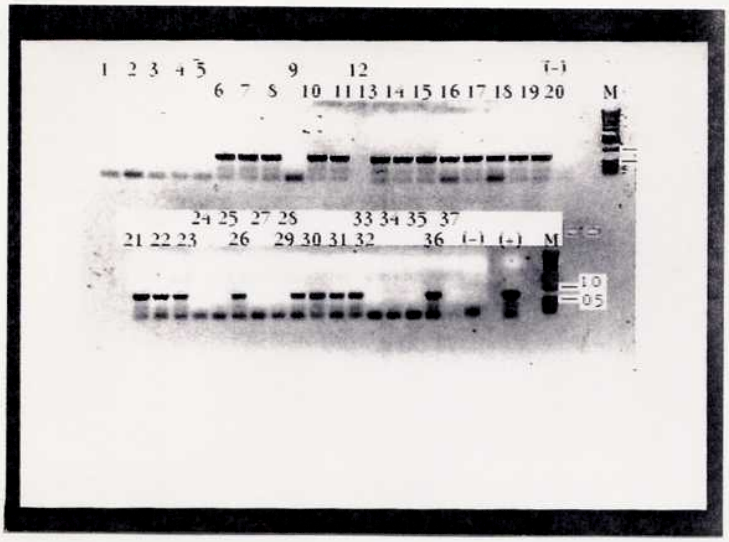
Subclonado en el vector de expresión ObΔC-NL3.

Para constatar que las construcciones descriptas en el capítulo anterior son procesadas eficientemente *in vivo*, se decidió utilizar nuevamente ObNL3 ΔC (cuyas características fueron descriptas oportunamente, capítulo 2) como vector de expresión.

Para ello, se subclonaron los distintos cassettes (PRO10.XYN, YNX, LRYN y LRYNX) en ObNL3 ΔC. Como primer paso, se digirieron las fuentes de inserto (PRO10.XYN, YNX, LRYN y LRYNX) con BglII y EcoRI y el vector ObNL3 ΔC con SpeI. Los extremos se hicieron romos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el vector fue tratado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Se obtuvieron varios clones recombinantes de cada subclonado, pero sólo uno de los correspondientes a LRYN estaba en la orientación correcta; Se lo denominó ObΔC-LRYN.

Para obtener ObΔC-XYN se reemplazó el fragmento SwaI-NsiI de ObΔC-LRYN por el correspondiente que proviene de PRO10.XYN, de modo de reemplazar la cápside de PLRV por la de PVX. Para identificar más efectivamente los clones recombinantes se examinó un alto número de colonias por PCR, usando los oligonucleótidos previamente utilizados durante el clonado de dicha cápside. El resultado del relevamiento se visualiza en la Figura 4.1.

Figura 4.1.



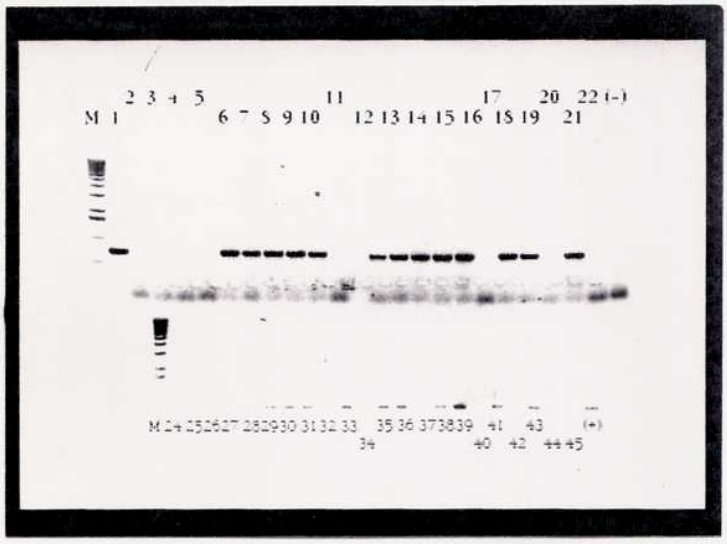
Electroforesis en gel de agarosa al 1% en el cual se sembró una alícuota de las PCRs llevadas a cabo para amplificar la cápside de PVX. Calles 1-19 y 21-38, colonias independientes. Calles (-), PCR utilizando colonias provenientes de la placa de vector religado (como control negativo). Calle (+), amplificación sobre una colonia de PRO10.XYN (como control positivo). A la derecha, se sembró una escalera de 1 kb (Gibco-BRL, USA), como marcador de tamaño molecular.

En un alto porcentaje de las colonias testeadas (23/60) se observa una banda del tamaño adecuado para la cápside de PVX (0.75 kb), así como la correspondiente a los iniciadores. Se preparó ADN de varios clones recombinantes y se realizó un mapeo con varias enzimas de restricción para confirmar el resultado de la PCR. Algunos clones positivos (1, 25 y 49) fueron secuenciados por el método de los dideoxinucleótidos utilizando Ob-FOR y Ob-REV (Tabla I) para confirmar que no ocurrió ninguna modificación en la región de unión entre el vector y el inserto.

Para obtener ObΔC-YNX y ObΔC-LRYNX se intentó en un principio digerir PRO10.YNX y LRYNX con EcoRI, rellenar los extremos protruyentes con nucleótidos adicionados con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, ligar "linkers" conteniendo el sitio de restricción correspondiente a NotI y finalmente digerir tanto las fuentes de inserto (PRO10.YNX y LRYNX) como el vector (ObΔC- LRYN) con SwaI y NotI, en forma secuencial. A pesar de repetir varias veces esta estrategia, no fue posible obtener clones recombinantes.

Posteriormente se intentó otra estrategia que involucró el subclonado del fragmento SwaI-SalI (SalI tiene un sitio en el 3´ de PRO10.YNX y LRYNX así como también en el vector ObΔC- LRYN) y que en un principio no se había elegido por involucrar la deleción de una región pequeña del vector. Nuevamente los clones recombinantes se identificaron por PCR; En el caso de ObΔC-YNX, por amplificación de la cápside de PVY y en el de ObΔC-LRYNX, la de PLRV. En la Figura 4.2 se muestran los resultados obtenidos en el subclonado de ObΔC- YNX.

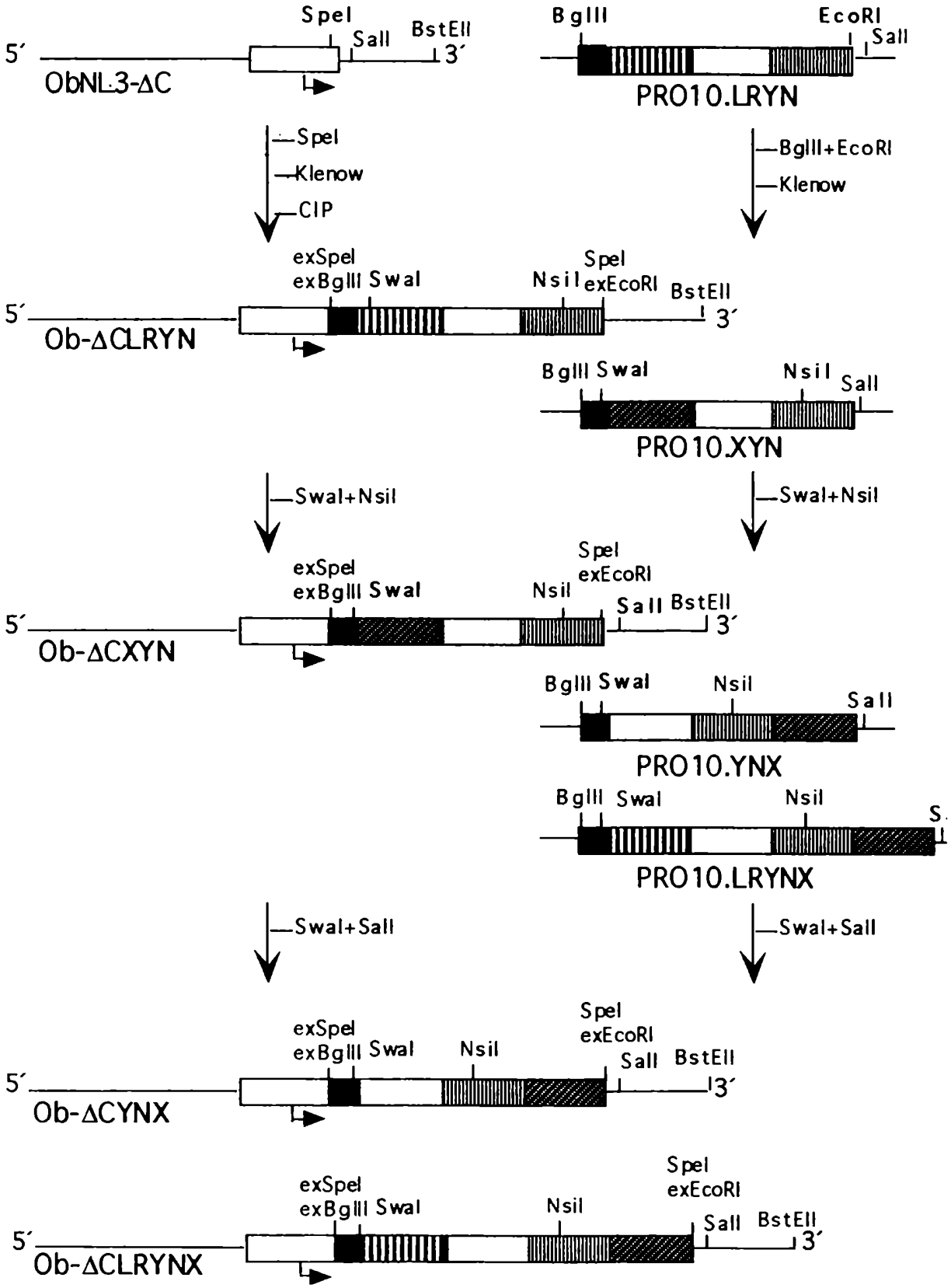
Figura 4.2.



Electroforesis en gel de agarosa al 1% en el cual se sembró una alícuota de las PCRs llevadas a cabo para amplificar la cápside de PVY. Calles 1-22 y 24-45, colonias independientes. Calles (-), PCR utilizando una colonia proveniente de la placa de vector religado (como control negativo). Calle (+), amplificación sobre una colonia de PRO10.YNX (como control positivo). A la izquierda se sembró una escalera de 1 kb (Gibco-BRL, USA), como marcador de tamaño molecular.

En la mayoría de las colonias analizadas (36/48 para ObΔC-YNX y 4/9, para ObΔC-LRYNX) se observa una banda del tamaño adecuado para la cápside de PVY (0.8 kb) o PLRV (0.7 kb). Se seleccionaron algunos clones positivos para analizar posteriormente por mapeo de restricción con el fin de confirmar el resultado de la PCR. Dos clones de ObΔC-YNX (1 y 20) y uno de ObΔC-LRYNX (50) fueron secuenciados por el método de los dideoxinucleótidos utilizando Ob-FOR y Ob-REV (Tabla I) para confirmar que no ocurrió ninguna modificación en la unión entre el vector y el inserto.

Figura 4.3: Esquema de la construcción de los derivados de Ob.

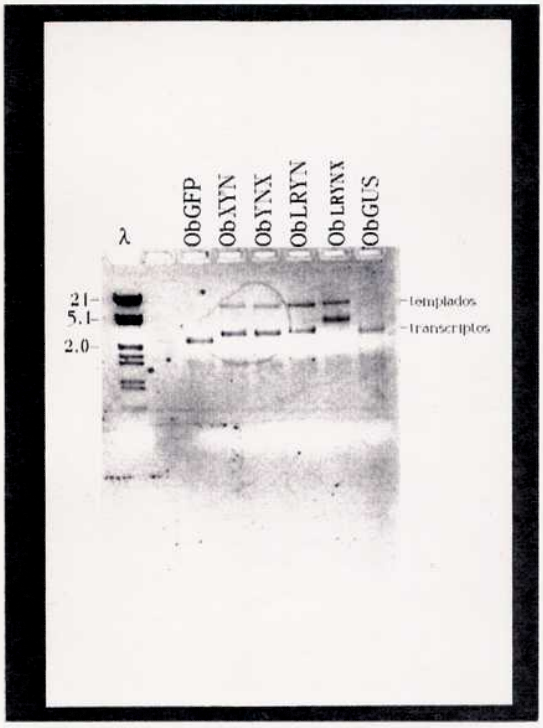


En la Figura 4.3 se presenta un esquema resumiendo los subclonados realizados.

Obtención y chequeo de los transcriptos infectivos.

Una vez identificados los clones recombinantes se utilizó el ADN plasmídico purificado y linearizado como templado de la ARN polimerasa del fago T7 en reacciones de transcripción *in vitro*. Los ARN así obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa

Figura 4.4.



Transcriptos obtenidos a partir de los clones que se indican en la Figura.
Todas las construcciones (incluyendo a ObΔC-GFP, cedido amablemente por Dr. Padgett, The Scripps Research Institute, para utilizar como control positivo) se linearizaron con BstEII, según se describe al pie de la Figura 2.5. Las transcripciones se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos. Una vez finalizada la reacción, se separó una alícuota de cada transcripto para confirmar la integridad del mismo.

Las transcripciones se dividieron en dos alícuotas iguales, una para chequear la infectividad de los clones y la restante para su uso en experimentos de expresión transitoria.

Las inoculaciones se realizaron sobre plantas jóvenes de tabaco (*N. tabacum* NN, línea 2005, ver capítulo 2).
Los productos de transcripción se diluyeron al medio en buffer fosfato y dos medias hojas (sobre las cuales previamente se había esparcido carborúndum para facilitar

la abrasión) se inocularon manualmente con cada transcripto. En la Figura 4.5 se muestran los síntomas obtenidos en algunas de las hojas inoculadas.

Figura4.5.

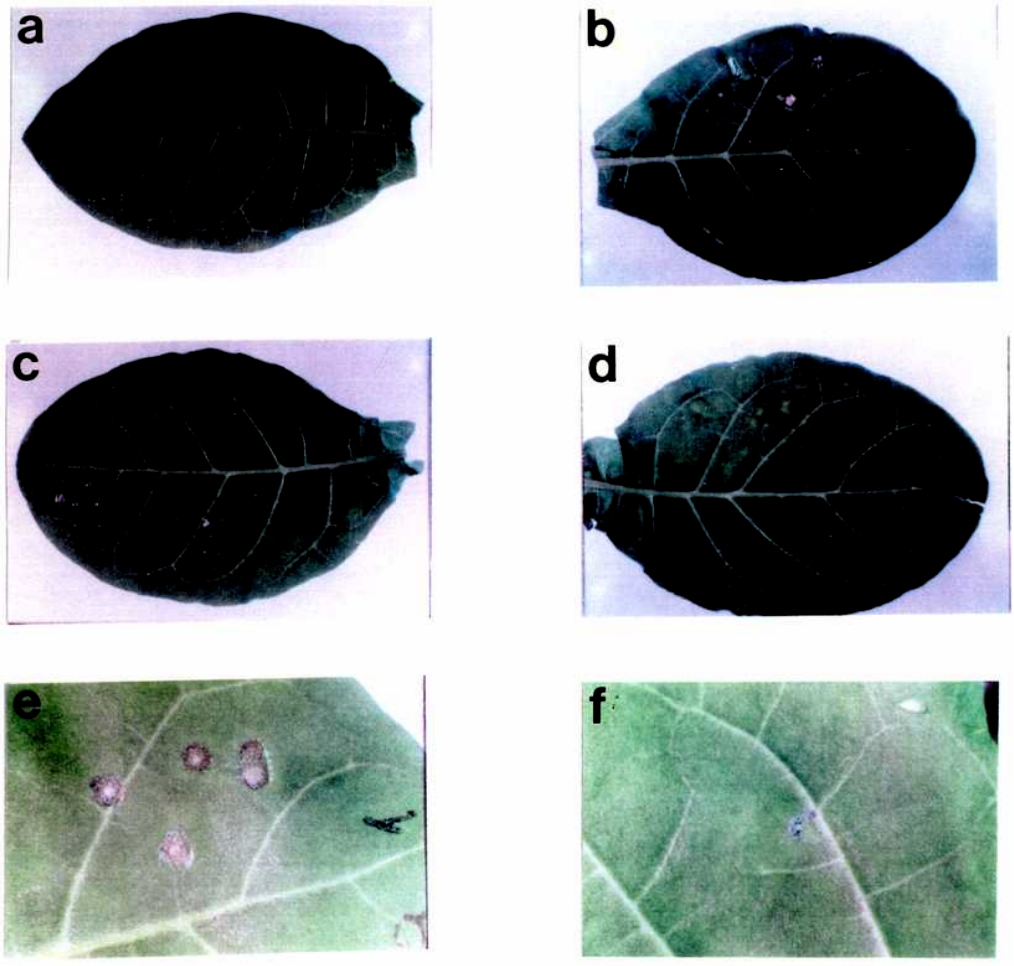


Figura4.5.
Lesiones locales obtenidas luego de inocular medias hojas de tabaco con los diferentes transcriptos.
a) Hoja joven no infectada; b) Hoja inoculada con XYN25 (mitad inferior, inf.) y YNX20 (mitad superior, sup); c) Hoja inoculada con GFP (inf) y ObΔC-3NG (sup, capítulo 2); d) Hoja inoculada con LRYN (inf) y LRYNX (sup); e) detalle de las lesiones obtenidas con GFP; f) detalle de lesiones locales anómalas observadas al inocular algunos transcriptos (en este caso, ObΔC-LRYN).

Los transcriptos derivados de ObΔC-XYN, ObΔC-YNX, ObΔC-LRYN y ObΔC-LRYNX produjeron el mismo tipo de

lesiones locales en tabaco que el control correspondiente (ObΔC-GFP, en el cual la proteína de fluorescencia verde de agua viva-"green fluorescent protein" o GFP- se expresa a partir del mismo promotor que las construcciones de interés). No obstante, la morfología (Figura 4.5 f) y la aparición de las lesiones fue posterior a la de los controles positivos, tal como fue comentado en capítulos anteriores.

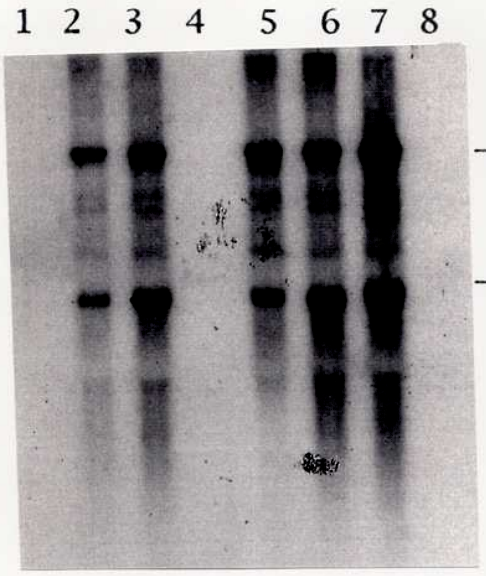
Ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

Una vez confirmada la infectividad de los clones recombinantes se utilizó la segunda alícuota de los transcriptos para transfectar protoplastos obtenidos a partir de una suspensión celular de tabaco (BY-2), del modo descripto en el Capítulo 2 y en Materiales y Métodos.

Luego de un día de cultivo se tomaron dos alícuotas de cada tratamiento: una para extraer ARN para analizar por Northern blot (Figura 4.6) y la restante para hacer una marcación *in vivo* de proteínas (Figura 4.7).

La Figura 4.6 detalla los resultados obtenidos en el experimento de Northern blot.

Figura 4.6.



Autoradiografía de una membrana de nitrocelulosa a la cual se transfirió un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5%; En todos los casos se sembraron 20 µg de ARN.
En la calle 1, ObΔC-GFP. En las calles 2 y 3, protoplastos transformados con ObΔC-XYN, clones 25 y 49, respectivamente. Calles 4 y 5, ObΔC-YNX clones 1 y 20, respectivamente. Calle 6, ObΔC-LRYN. Calle 7, ObΔC-LRYNX. Calle 8, ARN de células electroporadas en ausencia de transcripto (control negativo). La sonda utilizada fue ΔHNIa, amplificada por PCR y marcada por la técnica de iniciación al azar.

Tal como se visualiza en la Figura anterior, todos los transcriptos fueron capaces de replicar en protoplastos de tabaco con excepción de ObΔC-YNX (clon 1, calle 3).

En todas las calles se observa una serie de bandas que hibridan específicamente (ya que la membrana fue lavada en condiciones de máxima exigencia) con NIa. Tal como se indica en la figura, dichas bandas corresponden al ARN genómico y a diversos subgenómicos de Ob. La banda mayoritaria responde al subgenómico expresado a partir del promotor de la proteína de cápside.

A su vez, se realizó una marcación *in vivo* de proteínas, incubando a las células por espacio de una hora en presencia de una mezcla de aminoácidos radiactivos. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Figura.

Figura4.7.

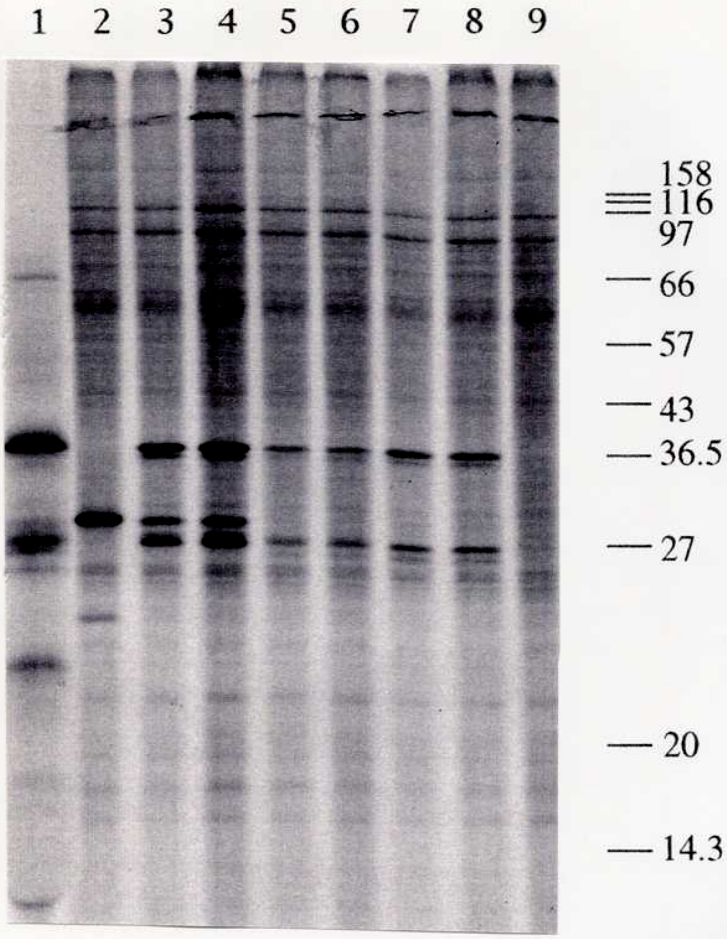


Figura4.7.
Perfil de marcación de proteínas de los protoplastos incubados en presencia de aminoácidos radiactivos (Para más detalles ver pie de la Figura 2.7 y Materiales y Métodos).

Se corrió una alícuota de cada tratamiento en un gel de poliacrilamida al 15% en buffer SDS-PAGE. Calle 1, proteínas obtenidas luego de la traducción *in vitro* de PRO10.LRYNX, como control. Calles 2, protoplastos electroporados con ObΔC-GFP. Calles 3 y 4, ObΔC-XYN 25 y 49. Calles 5 y 6, con ObΔC-YNX 1 y 20. Calle 7, ObΔC-LRYN. Calle 8, ObΔC-LRYNX. Calle 9, protoplastos electroporados en ausencia de ARN. En el margen derecho se indica la posición de los marcadores de tamaño molecular conocido.

En la calle correspondiente a ObΔC-GFP (Calle 2) se evidencia principalmente una banda que no está presente en el control de células electroporadas sin ARN (Calle 9), y que coincide con el peso molecular esperado para GFP (alrededor de 30 kDa). La existencia de dicha proteína fue

fácilmente puesta en evidencia al iluminar las células transfectadas bajo luz UV en un microscopio de fluorescencia, lo cual permitió estimar el porcentaje de células efectivamente transformadas (que en experimentos representativos osciló entre 40-60 %).

En las calles 3 y 4 se observan principalmente 3 bandas mayoritarias. La de mayor peso molecular coincide con la esperada para la cápside de PVY. La subsiguiente correspondería a la cápside de PVX (ligeramente superior a la que se obtiene a partir de PRO10.LRYNX, tal como se explicó anteriormente). Con respecto al doblete característico de NIa (ver Figura 3.2b, por ejemplo, y [Dawn-Parks, T et al., 1995]) sólo se observa la banda inferior. De todos modos la actividad proteásica es innegable por la aparición de las bandas correspondientes a PVY y PVX.

En las calles 5 y 6, los clones 1 y 20 de ObΔC-YNX permitieron la detección clara de sólo dos bandas, la correspondiente a la cápside de PVY y la proveniente de NIa. En ambos casos, la cápside de PVX (así como la banda más grande del doblete característico de NIa) no pudieron ser detectadas en los tiempos de exposición usados.

Este mismo resultado se obtuvo tanto en el caso de ObΔC-LRYN (Calle 7) como ObΔC-LRYNX (Calle 8). Además, ninguno de estos dos transcriptos permitió la formación de proteína de cápside de PLRV en forma suficiente para ser detectada en un ensayo de esta naturaleza.

De esta serie de experimentos puede concluirse que los diversos clones portando las construcciones de interés fueron capaces de replicar en protoplastos.

DISCUSION.

En los ensayos de expresión *in vivo* con las distintas construcciones (Figura 4.7) se observan principalmente 3 bandas mayoritarias: la correspondiente a la cápside de PVY,

la cápside de PVX (cuando se expresa a partir del sitio de clonado previo a NIa) y la banda inferior correspondiente al doblete característico de NIa (Figura 3.2b).

A partir de experimentos realizados *in vitro* Dawn-Parks et al. (1995) postularon que el dominio proteasa de NIa se caracterizaría por existir en dos formas, como un péptido de 27 kDa, y como un subsiguiente producto de procesamiento del cual se removieron 2 kDa del extremo carboxiterminal. Postularon, además, que la presencia de la forma procesada es indicativa de la funcionalidad de NIa (ya que estaría ausente en reacciones que involucran a la proteasa en una forma comprobadamente inactiva). Si bien no existen datos de cinética de procesamiento *in vivo*, los autores mencionados midieron la cinética de aparición de la banda de 25 kDa *in vitro*, encontrando que las incubaciones prolongadas resultaban en la desaparición de la banda de mayor peso molecular, lo cual, a su vez, sugiere que un proceso similar podría estar ocurriendo *in vivo*, tal como se observa en los experimentos descriptos en la Figura 4.7 (y en la Figura 2, [Dawn-Parks, T et al., 1995]). El procesamiento *in vivo* se aceleraría notablemente a juzgar por nuestros resultados, ya que se observa preponderancia de las formas procesadas en tiempos tan cortos como una hora de incubación.

Otro hecho a discutir fue la imposibilidad de detectar la proteína de cápside de PVX cuando estaba codificada hacia el 3´ del gen de la proteasa (calles 5, 6 y 8 de la Figura 4.7). Si bien se desconoce la naturaleza de esta diferencia en los niveles de abundancia relativa de las proteínas obtenidas a partir de los sitios ubicados en el extremo 5´ y 3´de NIa, su ocurrencia había sido ya detectada originalmente por Restrepo, Freed y Carrington (1990). Esta diferencia podría atribuirse a la estabilidad de la proteína (teniendo en cuenta la adición de 6 aminoácidos en el extremo carboxiterminal cuando está codificada en el sitio 5´ y uno en el aminoterminal cuando lo está en el 3´). Alternativamente, la falta de procesividad de los ribosomas a lo largo del

transcripto policistrónico podría dar cuenta de este resultado.

Finalmente, ni los transcriptos ObΔC-LRYN (Figura 4.7, calle 7) ni ObΔC-LRYNX (calle8) dieron lugar a la formación de proteína de cápside de PLRV en forma suficientemente estable para ser detectada en un ensayo de esta naturaleza, lo cual no es del todo sorprendente teniendo en cuenta datos de la literatura en los cuales se reporta la dificultad de detectarla por western blot en plantas transgénicas no infectadas [Kawchuk, LM et al., 1991]. En vista de estos resultados se podría pensar que la proteína tendría una elevada frecuencia de recambio.

Hasta el momento han aparecido dos trabajos en los cuales se propone el uso de esta estrategia para la expresión de múltiples genes a partir de un único promotor *in planta* ([Marcos, JF et al., 1996] y [Beck von Bodman, S et al., 1995]). Beck von Bodman et al. (1995) obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que expresaban dos genes provenientes de *Agrobacterium* involucrados en la síntesis coordinada de opinas. La proteasa utilizada como base de la construcción fue la versión completa de la proteasa NIa de TVMV ("tobacco vein mosaic virus"). En este trabajo, las plantas transgénicas fueron analizadas de modo de detectar la actividad de los genes codificados por el cassette utilizando cromatografía en papel de extractos de tejido proveniente de callos (resistentes al agente selectivo) o de plantas transgénicas. Los autores pudieron identificar un patrón diferencial proveniente de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de opinas; sin embargo no realizaron ningún ensayo que permitiera cuantificar los niveles de proteínas producidas a partir de su versión del cassette, lo cual dificulta la comparación con nuestros propios resultados. Por su parte, Marcos y Beachy (1996), utilizando la versión de longitud completa de la proteasa NIa de TEV, fueron capaces de detectar la acumulación de bajos niveles de CP para TMV por western blot; no obstante, dado que los niveles de expresión fueron relativamente bajos, el

grado de protección conferido a plantas de tabaco transgénicas también lo fue.

Esta estrategia no ha sido aún ensayada con genes de utilidad agronómica como son los genes de cápside viral. Por otro lado, y como indican los resultados aquí discutidos, este tipo de experimentos sirven para hacer un análisis de estabilidad relativa de las proteínas co-expresadas, permitiendo estudiar la velocidad de recambio ("turn over") relativo de las mismas.

5-SUBCLONADO EN UN VECTOR APTO PARA LA TRANSFORMACION ESTABLE DE PLANTAS.

Para una caracterización posterior del cassette de expresión, se decidió llevar a cabo la transformación de tabaco (*Nicotiana tabacum,* cv Xanthi NN) mediada por *Agrobacterium tumefaciens.* Este sistema, considerado como modelo en el cultivo de tejidos, permitirá analizar el comportamiento de las diferentes construcciones una vez expresadas *in planta.* como paso preliminar a la transformación de papa (*Solanum tuberosum tuberosum,* cv Huinkul-MAG y Kennebec).

Por tal motivo fue necesario subclonar las diferentes construcciones en un vector apto para la transformación vegetal, en este caso pMON316 (ver Materiales y Métodos).

Este plásmido contiene un sitio múltiple de clonado entre el promotor doble del transcripto de 35S del CaMV y la región terminadora del gen NOS. Además, confiere resistencia a kanamicina (agente selectivo, utilizable como marcador de transformación) y es capaz de integrarse en el plásmido Ti de *Agrobacterium* (en la región contenida dentro del T-DNA, que luego será movilizada hacia la planta).

Para obtener las construcciones en pMON316 fue necesario digerir los plásmidos fuente de inserto (PRO10.XYN, YNX, LRYN y LRYNX) asi como el vector, con BglII y EcoRI. Los plásmidos resultantes se denominaron pMON316.XYN, YNX, LRYN y LRYNX.

Transferencia de las construcciones a *Agrobacterium tumefaciens* mediante conjugación triparental.

Una vez elegidos los clones recombinantes para cada construcción se llevó a cabo una conjugación triparental con el fin de introducir dichos plásmidos en la cepa de *Agrobacterium* más conveniente (para el vector utilizado es la cepa GV3111 SE).

Para ello se requirió además de una cepa F+ de *E coli* capaz de aportar las funciones de movilización y transferencia (*E coli* pRK2013). El protocolo utilizado se detalla en Materiales y Métodos. Las colonias obtenidas en placas selectivas fueron crecidas por 36-48 hs; una parte del cultivo fue utilizado para extraer ADN plasmídico con el método de la lisis alcalina [Maniatis, T et al., 1989]. Dado que el pMON316 es un plásmido cointegrativo, e incapaz de replicar dentro de *Agrobacterium*, la información que éste porta sólo se expresa si este plásmido se integra al Ti (presente en la bacteria) por recombinación homóloga. Debido a que el plásmido Ti recombinante se encuentra en una sola copia, el rendimiento de la extracción es muy bajo y resulta conveniente analizar directamente los clones usando el ADN de las "mini"extracciones como templado en una reacción de PCR (en lugar de mapeo por restricción) con oligonucleótidos específicos (en este caso que permitan amplificar cada uno de los genes de interés).

De las 10 colonias analizadas para cada construcción 3 o 4 (según el caso) resultaron positivas para todos los genes.

Figura 5.1.

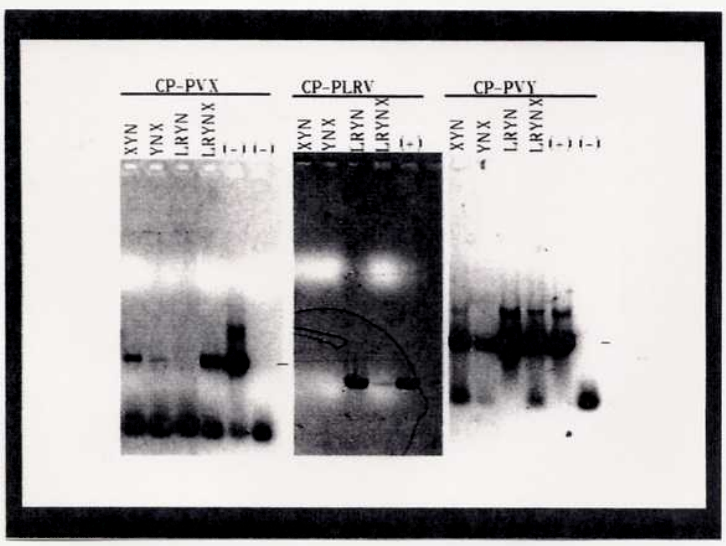


Figura 5.1. Reacciones de PCR para confirmar la presencia de los genes de interés en los clones de *Agrobacterium* que fueron seleccionados. En cada calle se sembró una alícuota de las reacciones en el siguiente orden: Calles 1, 7 y 13: XYN-3. Calles 2, 8 y 14: YNX-1. Calles 3, 9 y 15: LRYN-5. Calles 4, 10 y 16: LRYNX-5. Calles 5, 11 y 17: LRYNX, proveniente de *E. coli.*, como control positivo. Calles 6, 12 y 18, pMON316, como control negativo. El gen amplificado en cada bloque se indica en la Figura.

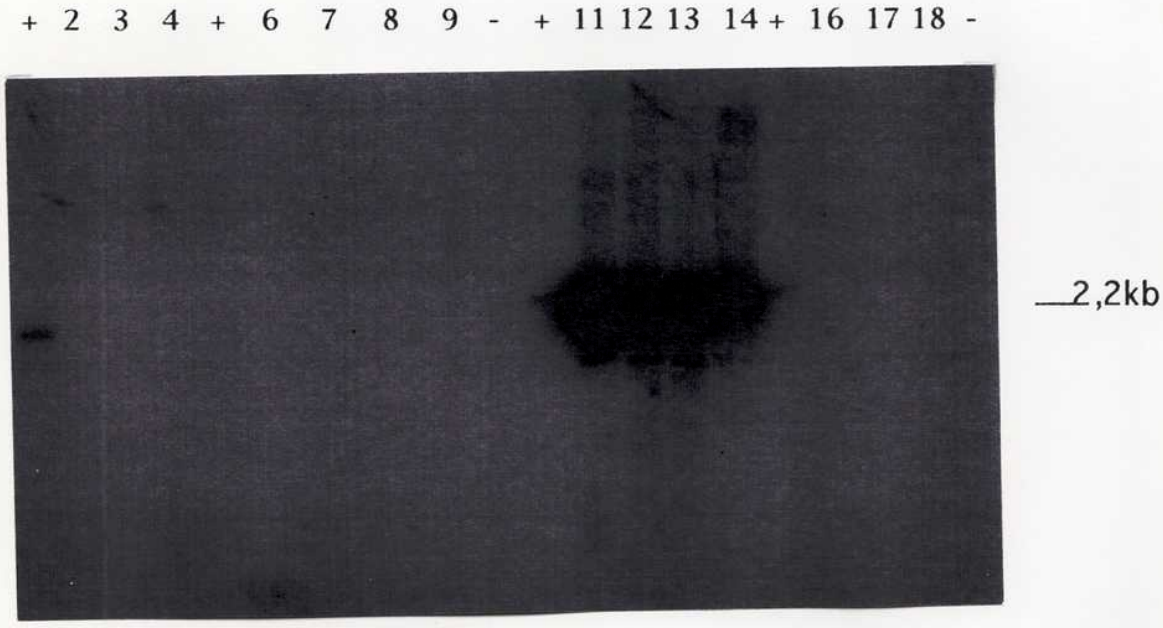
Para confirmar los resultados obtenidos en la reacción de PCR se llevó a cabo un ensayo de western blot, utilizando anticuerpos anti PVX y anti PVY. La intención fue confirmar el procesamiento *in vivo* de las variantes del cassette, ya que es bien conocido el hecho que el promotor del transcripto de 35S del CaMV funciona en las agrobacterias, aunque con baja eficiencia. No obstante, fue imposible distinguir una banda única para las proteínas de cápside -del tamaño apropiado- utilizando cada uno de los anticuerpos específicos con los que se cuenta. Esto podría atribuirse en parte a la utilización de anticuerpos que fueron dirigidos contra proteínas en su forma nativa (y no desnaturalizadas), por lo cual sólo una fracción de los mismos, aquellos dirigidos contra epitopes secuenciales, funcionarían en estos sistemas.

Posteriormente, los clones positivos fueron reconfirmados por Southern blot. Para ello se extrajo ADN total de 4 colonias independientes para cada construcción, el cual se digirió con enzimas de restricción (BglII y EcoRI) que liberan el cassette completo (sin el promotor, por falta de sitios únicos en el extremo 5´del mismo) y se corrió en un de agarosa al 0,8%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.2.

Figura 5.2.

Southern blot de las agrobacterias.

a) ADN de colonias independientes de *Agrobacterium* para cada construcción. M: escalera de 1 kb (GIBCO-BRL) como marcador de tamaño molecular. Calles 2-4, distintas colonias de XYN-3. Calles 6-9, de YNX-1. Calle 9, pMON316 como control negativo. Calles 11-14, distintas colonias de LRYN-5. Calles 16-18, de LRYNX. Calle 19, ADN total de la cepa receptora de *Agrobacterium*, como control negativo. (+) en cada caso indica el plásmido correspondiente, proveniente de *E. coli*.



b) Autoradiografía del gel descripto en a), el cual fue transferido en presencia de NaOH 0,4M a una membrana Hybond N+ (Amersham). Como sonda se utilizó el fragmento proteolítico de Nla, según se describió en la leyenda de la Figura 2.6.

De la Figura anterior se desprende que las agrobacterias que recibieron la construcción LRYN poseen los genes de interés. En este caso en particular, todas las colonias analizadas poseen la banda del tamaño esperado, que es el correspondiente al cassette completo (2.25 kb).

Por otra parte, las restantes colonias analizadas no resultaron positivas al ser evaluadas por Southern blot. Esto podría deberse a que luego del mantenimiento de los cultivos en glicerol se seleccionaron clones que habían sufrido la pérdida del plásmido Ti, o un fragmento del mismo, etc.

Se han repetido las conjugaciones triparentales con vistas a llevar a cabo nuevamente esta serie de experimentos.

Transformación estable de plantas de tabaco.

Uno de los clones portadores de la construcción LRYN fue utilizado para transformar discos de hoja de tabaco (*N. tabacum* , cv Xanthi NN).

Se usaron hojas de plantas crecidas en invernáculo, de modo tal que fue necesario la esterilización de las mismas como paso previo al cocultivo con las agrobacterias. El cocultivo en medio sólido se prolongó por 24-48 hs dependiendo del crecimiento de las bacterias, luego de las cuales los discos se transfirieron a un medio conteniendo el agente selectivo (en este caso, kanamicina 100 µg/ml) y un bacteriostático, para controlar el crecimiento de las bacterias (ver Materiales y Métodos).

Estos experimentos se encuentran actualmente en etapa de regeneración y enraizamiento.

6-COTRANSFORMACION DE PLANTAS DE PAPA CON AGROBACTERIAS CONTENIENDO GENES DE CAPSIDE VIRAL.

Una de las alternativas exploradas en la búsqueda de plantas con resistencia combinada a virosis es la cotransformación. Tal como se comentó en la introducción del presente trabajo, el objetivo del mismo es la obtención de plantas de papa transgénicas con resistencia simultánea a virosis de interés comercial. La ténica de rutina utilizada en el laboratorio para la modificación estable de este cultivo es la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens.* La cotransformación involucra el uso de varias cepas de *Agrobacterium* (cada cual portando alguno de los genes de interés) en forma conjunta, tal como se describe en Materiales y Métodos. En este contexto resulta de interés estudiar la eficiencia relativa de cotransformación con mezclas de agrobacterias. Se hicieron dos tipos de experimentos con mezclas de 2 y 3 variantes de agrobacterias, respectivamente.

A tal objeto, se utilizaron conjuntamente las cepas LB4404 (pAL4404/pBIcpPLRV), LB4404 (pAL4404/pBI-PVY) y LB4404 (pAL4404/pBOPVX) para transformar discos de hoja de papa del cultivar Huinkul-MAG. Las cepas elegidas fueron utilizadas previamente en ensayos de transformación única ([del Vas, M, 1993] y [Bravo-Almonacid, F, 1992]) por lo que se conoce bien su comportamiento individual.

Todas las agrobacterias portaban el mismo marcador de selección (NPT-II).

Se realizaron 3 ensayos de cotransformación independientes. El primero (Ensayo 7, la numeración es correlativa con los ensayos de transformación individuales, (del Vas 1993)) incluyó las cepas LB4404 (pAL4404/pBIcpPLRV) y LB4404 (pAL4404/pBI-PVY) y los dos restantes (Ensayos 8 y 9) las dos primeras y la cepa LB4404 (pAL4404/pBOcpPVX).

En todos los casos se incluyeron 10 explantos para realizar cada uno de los siguientes controles:

Control de regeneración, para el cual los explantos no co-cultivados con *Agrobacterium* se regeneran en medio no selectivo. La eficiencia de regeneración es comúnmente del 100%.

Control de toxicidad, en el cual los explantos tratados con las agrobacterias son regenerados en ausencia de medio selectivo; la eficiencia debe coincidir con la anterior (lo cual es indicativo de que el tratamiento *per se* no afecta la capacidad regenerativa de los explantos).

Control de la capacidad selectiva del marcador utilizado, para el cual los explantos no tratados con las agrobacterias se plaquean en medio selectivo; la eficiencia de regeneración debe ser 0; los explantos se tornan necróticos al cabo de unas semanas.

Los explantos fueron mantenidos en medio de regeneración, en presencia de kanamicina y cefotaxime, por aproximadamente 8-10 semanas, subcultivándose a medio fresco semanalmente; los brotes regenerados fueron escindidos del explanto original y transferidos a medio de enraizamiento; sólo aquellos capaces de enraizar en presencia de kanamicina se mantuvieron por micropropagación vegetativa para una caracterización posterior a nivel molecular.

La Tabla II resume los resultados obtenidos.

TablaII. Descripción cuantitativa de los ensayos de cotransformación.

	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9
Explantos iniciales	87	45	76
Expl. regener. Km50	17	22	15
Plantas obtenidas	31	37	29

TablaII. Algunos parámetros a considerar en la caracterización de los ensayos de cotransformación.

Se obtuvo un total de 94 plantas del cultivar Huinkul-MAG (31 en el ensayo de cotransformación doble y 66 en los triples) capaces de enraizar en medio selectivo.

La eficiencia de transformación puede definirse de varias maneras [del Vas, M, 1993]:

a) considerando el número de plantas capaces de enraizar en Km 50 obtenidas a partir de los explantos que inicialmente fueron cocultivados con *Agrobacterium*, o

b) considerando el número de explantos que fueron capaces de regenerar en medio selectivo respecto de los que inicialmente fueron cocultivados con *Agrobacterium.*

Ambas definiciones adolecen de precisión, por cuanto la primera considera como independientes brotes que pueden ser clones entre sí (con lo cual el cálculo final estaría sobreestimado), mientras que la segunda obvia el hecho que distintas células de un mismo explanto pueden haber sido sustrato de un evento de transformación independiente [del Vas, M, 1993], con lo cual el valor calculado sería una subestimación de la eficiencia real. del Vas (1993) denominó a la primera como "eficiencia en sentido amplio" (EfA) y a la segunda como "eficiencia en sentido estricto" (EfE). La Tabla III resume dichos valores para los experimentos de cotransformación analizados en el presente capítulo.

Tabla III.

	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9
EfA	35,6	82,2	38,1
EfE	19,5	48,9	19,7

Los

TablaIII . Eficiencias de transformación de E7, E8 y E9, en sentido amplio (EfA) y estricto (EfE). Los datos se presentan como porcentajes respecto de los explantos iniciales, según se describe en el texto.

resultados obtenidos, en cuanto a la eficiencia de los ensayos de transformación, están en concordancia con los comunicados previamente para este cultivar [del Vas, M, 1993]. En este trabajo se reportó que la eficiencia en sentido amplio suele oscilar entre un 35 y un 55 %, mientras que la eficiencia en sentido estricto varía entre un 10 y un 30%. Asimismo, del Vas (1993) demostró que el 100% de las plantas seleccionadas en presencia de kanamicina poseían el gen *neo*, a juzgar por experimentos *in vitro* de determinación de la actividad NPTII.

Relevamiento de las plantas transgénicas para la presencia de cada uno de los genes de cápside.

La evaluación de las plantas obtenidas en los distintos ensayos se llevó a cabo por la técnica de PCR.

Para ello se extrajo ADN de las 94 plantas transgénicas, así como también de un ejemplar de Huinkul-MAG no transformado para utilizar como control negativo, siguiendo un método modificado a partir del reportado por Dellaporta (1983) confirmando su integridad sembrando en un gel de agarosa al 0,8%.

Se amplificaron los genes correspondientes a las cápsides de PVY, PLRV y PVX por PCR con oligonucleótidos apropiados (Tabla I, Materiales y Métodos).

En la Figura 6.1 se muestra los resultados obtenidos con las plantas verdaderamente cotransformadas.

Figura 6.1.

Figura 6.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación sobre ADN extraído de las plantas transgénicas dobles.

Para amplificar el gen de cápside de PVY se utilizaron los oligonucleótidos 35S y 3´PVY-3. Para PVX, el 35S y 3´PVX-2, y para PLRV, el 5´PLRV-PC y 3´PLRV-PC. La reacción de PCR tuvo las siguientes características: un cilco de desnaturalización a 94°C durante 1 min y luego 40 ciclos de amplificación; cada uno involucró: desnaturalización a 94 °C por 1 min; anillado a 50°C (en el caso de PVY y PLRV, y 51°C en el de PVX) por 1 min; extensión a 72°C, por 1 min y finalmente un período de extensión por 7 min.

Calles 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20 y 24 amplificación de la cápside de PLRV. Calles 2, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 21 y 25, la de PVY. Calles 3, 13, 16, 19, 22 y 26, la de PVX. Calles 1, 2, 3 amplificación sobre ADN de una planta no transformada. Calles 24, 25 y 26 fueron amplificadas usando como templado plantas transgénicas previamente caracterizadas ((del Vas 1993) y (Bravo-Almonacid 1992)).

Los resultados totales se volcaron en la Tabla IV.

Tabla IV.

ENSAYO 7		Transformada c/	PLRV	PVY	PVX	
E7A1	1	PLRV + PVY	-	-		ESCAPE
E7C1	2	PLRV + PVY	+			
E7D1	3	PLRV + PVY	+			
E7D2	4	PLRV + PVY	+			
E7D3	5	PLRV + PVY	+			
E7E1	6	PLRV + PVY	+			
E7E2	7	PLRV + PVY	+			
E7F1	8	PLRV + PVY	+			
E7G3	9	PLRV + PVY	+			
E7H1	10	PLRV + PVY	+			
E7H4	11	PLRV + PVY	+	-		
E7I1	12	PLRV + PVY	+	+		DOBLE
E7J1	13	PLRV + PVY	+	-		
E7J2	14	PLRV + PVY	+	+		DOBLE
E7J3	15	PLRV + PVY	+	-		
E7J4	16	PLRV + PVY	+	-		
E7K1	17	PLRV + PVY	+	+		DOBLE
E7L1	18	PLRV + PVY	+	-		
E7L4	19	PLRV + PVY	+	-		
E7L5	20	PLRV + PVY	+	+		DOBLE
E7M2	21	PLRV + PVY	+	-		
E7O2	22	PLRV + PVY	+			
E7O3	23	PLRV + PVY	+			
E7P5	24	PLRV + PVY	+			
E7P6	25	PLRV + PVY	+	-		
E7Q2	26	PLRV + PVY	-	+		
E7Q5	27	PLRV + PVY	+	-		
E7Q6	28	PLRV + PVY	+			
E7Q8	29	PLRV + PVY	+			
E7Q9	30	PLRV + PVY	+			
E7R1	31	PLRV + PVY	+	-		

ENSAYO 8		Transformada c/	PLRV	PVY	PVX	
E8A1	32	PLRV+PVY+PVX	+	-	-	
E8B1	33	PLRV+PVY+PVX	-			ESCAPE
E8B2	34	PLRV+PVY+PVX	+			
E8C1	35	PLRV+PVY+PVX	+			
E8D1	36	PLRV+PVY+PVX	+			
E8E1	37	PLRV+PVY+PVX	+			
E8E2	38	PLRV+PVY+PVX	+			
E8E3	39	PLRV+PVY+PVX	+			
E8F2	40	PLRV+PVY+PVX	+			
E8G2	41	PLRV+PVY+PVX	+			
E8H1	42	PLRV+PVY+PVX	+	-		
E8H2	43	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E8H3	44	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E8H5	45	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E8H8	46	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E8I1	47	PLRV+PVY+PVX	+	-		
E8J2	48	PLRV+PVY+PVX	-			ESCAPE
E8L2	49	PLRV+PVY+PVX	+			
E8M1	50	PLRV+PVY+PVX	+			
E8M2	51	PLRV+PVY+PVX	+			
E8P3	52	PLRV+PVY+PVX	+	-		
E8P5	53	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E8Q1	54	PLRV+PVY+PVX	+	-		
E8Q2	55	PLRV+PVY+PVX	+		-	
E8S1	56	PLRV+PVY+PVX	+		+	DOBLE
E8S2	57	PLRV+PVY+PVX	+		-	
E8S3*	58	PLRV+PVY+PVX	-			ESCAPE
E8S4	59	PLRV+PVY+PVX	+			
E8S5	60	PLRV+PVY+PVX	+			
E8T1*	61	PLRV+PVY+PVX	-			ESCAPE
E8U1	62	PLRV+PVY+PVX	+			
E8V2	63	PLRV+PVY+PVX	+			
E8W1	64	PLRV+PVY+PVX	+			
E8X1	65	PLRV+PVY+PVX	+			
E8Y1*	66	PLRV+PVY+PVX	-			ESCAPE*
E8Z1	67	PLRV+PVY+PVX	+	-	-	

ENSAYO 9		Transformada c/	PLRV	PVY	PVX	
E9A1	68	PLRV+PVY+PVX	-	-	-	ESCAPE
E9A2	69	PLRV+PVY+PVX	+		-	
E9B1	70	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9B2	71	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9B3	72	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9C1	73	PLRV+PVY+PVX	-	-	+	
E9D1	74	PLRV+PVY+PVX	-	+	-	
E9E1	75	PLRV+PVY+PVX	-	+	+	DOBLE
E9G2	77	PLRV+PVY+PVX	-	+	-	
E9G3	78	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E9G4	79	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E9H1	80	PLRV+PVY+PVX	-	+		
E9H2	81	PLRV+PVY+PVX	-	+	-	
E9I1	82	PLRV+PVY+PVX	-	+	+	DOBLE
E9J1	83	PLRV+PVY+PVX	-	-	+	
E9J2	84	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9J3	85	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L2	86	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L4	87	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L5	88	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L6	89	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L7	90	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9L8	91	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9M1	92	PLRV+PVY+PVX	-		+	
E9N1	93	PLRV+PVY+PVX	+		+	DOBLE
E9O1	94	PLRV+PVY+PVX	-	-	+	

Tabla IV. Descripción de los resultados observados en la evaluación de las plantas obtenidas por cotransformación. (*) Plantas consideradas inicialmente escapes que fueron re-evaluadas en experimentos posteriores.

De la Tabla IV se desprende que la mayoría de las plantas transgénicas recibieron principalmente uno de los genes. Este hecho es coherente con una selección ejercida para un único agente selectivo común a todos los vectores. No obstante, se detectó un número bajo pero significativo de plantas que recibieron distintas combinaciones de dos de los

genes de interés. No se obtuvieron plantas transgénicas triples.

TablaV.

	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9
%LR+	93,5	72,2	7,8
%Y+	16,1	13,9	29,6
%X+	NE	2,8	73,1
%LR+Y	12,9	0	0
%LR+X	NE	2,78	3,8
%Y+X	NE	0	7,7
%escapes	3,2	13,9	3,8

Tabla V. Algunos parámetros evaluados para los distintos ensayos de cotransformación. LR: PLRV; Y: PVY; X: PVX; NE: no evaluado. Los datos se expresan como porcentaje de las plantas positivas por PCR respecto de las transformadas totales dentro de cada ensayo

De la Tabla V se desprende que las distintas cepas se comportaron de un modo variable en cada uno de los ensayos en cuanto a su efectividad para la transformación. Esto es particularmente cierto para aquella que posee el gen de cápside de PLRV, a juzgar por el bajo porcentaje de plantas transformadas con esta construcción en el ensayo 9.

En un intento por discernir si la imposibilidad de detectar la presencia de alguno de los genes de cápside en las plantas negativas ("escapes", en la Tabla IV) se debía a la calidad de la extracción del ADN o a una limitación de las reacciones de PCR en sí, se decidió llevar a cabo la amplificación de la región espaciadora intergénica transcripta ("ITS", que es una región moderadamente repetitiva presente en el "cluster" de los genes ribosomales) para cada una de las plantas definidas *a priori* como "escapes". Como todas ellas resultaron positivas en esta evaluación, lo cual permitió descartar posibles impedimentos para llevar a cabo la reacción, se decidió amplificar otro de los genes presentes en el vector de transformación, el gen *neo* (Figura 3, en Materiales y Métodos).

Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 5´ y 3´ NPT-II (ver Tabla I, en Materiales y Métodos). La reacción de amplificación tuvo las mismas características ya descriptas para los genes de cápside, con la excepción de la temperatura de anillamiento, que fue de 55ºC.

Las plantas evaluadas en estas condiciones fueron E8B1, E8J2, E8S3, E8T1, E8Y1 y E9A1, de las cuales E8S3, E8T1 y E8Y1 dieron como resultado la amplificación de la banda de 670 nt, presente en el control positivo (E8A1). Los resultados se muestran en la Figura 6.2.

Figura 6.2.

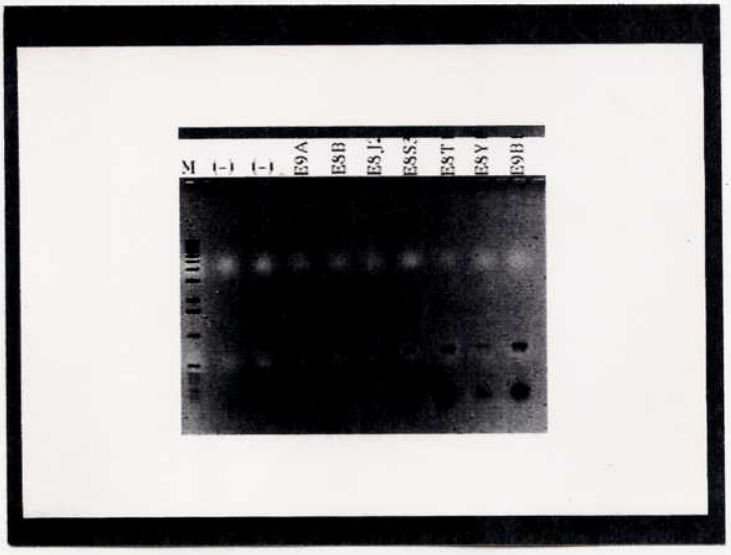


Figura 6.2. Amplificación por PCR del gen *neo* . Calle 1: sin ADN. Calle 2: ADN de planta no transformada (control negativo). Calles 3-8: ADN de plantas transgénicas a evaluar: E8B1, E8J2, E8S3, E8T1, E8Y1 y E9A1, respectivamente. Calle 9: E8A1, como control positivo.

De la Figura 6.2 se desprende que las plantas E8B1, E8J2 y E9A1 pueden ser consideradas como escapes reales al agente selectivo. Por el contrario, las restantes podrían ser atribuídas a falta de sensibilidad (o error experimental durante la evaluación) de la técnica elegida para evaluar las plantas transgénicas. A la luz de este resultado los datos resumidos en la Tabla VI se ven ligeramente modificados (en lo que al número de escapes de refiere), acercándose a valores más acordes con los manejados de rutina (es decir 5,5% en lugar de 13,9%).

Diseño de los ensayos a campo en vistas a evaluar la capacidad de resistencia de las distintas líneas transgénicas.

En función de los requerimientos aplicados del presente proyecto, es importante constatar que el carácter a introducir (en este caso, el gen de la CP de los distintos virus) se exprese establemente en la progenie y que las propiedades agronómicas del cultivar se mantengan, lo cual sólo puede ser evaluado a campo. A su vez, esto permitiría la selección más directa de aquellos individuos capaces de resistir a la infección viral en condiciones naturales.

Los ensayos a campo están siendo llevados a cabo en la Estación Experimental INTA- Balcarce, bajo la dirección del Ing. Marcelo Huarte.

Las líneas transgénicas (incluídas las analizadas en la sección anterior) fueron micropropagadas hasta obtener aproximadamente 10 clones de cada genotipo. Las plántulas fueron rusticadas en condiciones de invernadero a fin de generar tubérculos en números variables en cada caso.

En este primer ensayo a campo de papas transgénicas se decidió sembrar el mayor número posible de tubérculos provenientes de todas las líneas transgénicas obtenidas hasta el presente.

El área fue limitada lateralmente con plantas no transformadas de la misma variedad. Se sembraron en total 9 surcos, alternando el que contenía las plantas a evaluar (2, 4, 6 y 8) con otros en los que se sembraron plantas de los cultivares Spunta y Ballenera comprobadamente infectadas con los distintos virus (surcos 1, 3, 5, 7, y 9).

En el ensayo se respetaron las normas de bioseguridad de la CONABIA (Comisión asesora de biotecnología agropecuaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca). Esto implicó un control estricto de malezas, castración de las flores y recolección manual y minuciosa de los tubérculos.

La Figura 6.3 representa un esquema de la diagramación del ensayo a campo.

Figura 6.3.

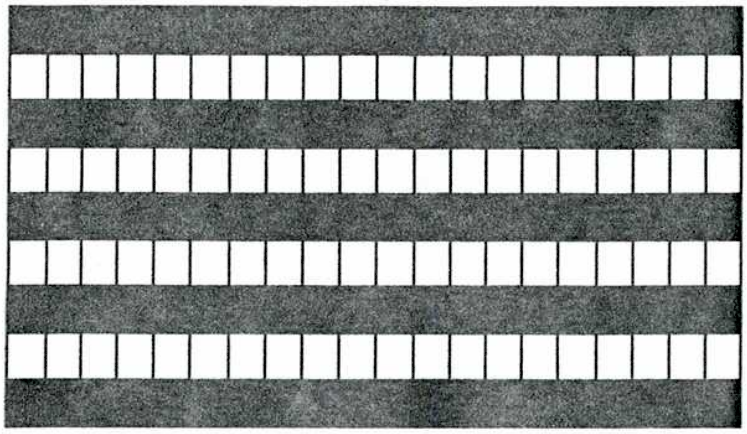


Figura 6.3. Diagramación del ensayo a campo. Los cuadros negros representan las plantas no transgénicas previamente infectadas, para usar como fuente de inóculo. Los cuadros grises representan las plantas sanas no transgénicas , como control interno de que ocurrió dispersión de los virus. En blanco, las distintas líneas transgénicas a evaluar.

Los tubérculos se sembraron el pasado mes de Noviembre (1995). La evaluación del mismo no será posible hasta la próxima temporada, cuando se siembren los tubérculos cosechados a partir de las plantas testadas durante este período. En ese momento se determinarán por ELISA los valores de virus alcanzados en las diferentes líneas (es decir, se evaluará el nivel de infección secundaria).

En la actualidad el ensayo se encuentra en etapa de tuberización.

DISCUSION

Dado que el objetivo del presente trabajo de tesis es la evaluación de estrategias conducentes a la obtención de plantas transgénicas con resistencia combinada a virosis, se puede concluir que la contransformación es un alternativa para ello dado que se pueden obtener -en porcentajes bajos- plantas cotransformadas. Las eficiencias relativas muestran la variabilidad de experimento a experimento. La utilización de marcadores selectivos diferentes permitirá hacer más eficiente la selección de dobles y triples transgénicas.

Hasta el momento se han obtenido plantas transgénicas por expresión de la CP para los tres virus involucrados en este trabajo. En el caso de los virus PVX y PVY se han llevado a cabo evaluaciones inclusive a campo, tanto por separado ([Hoeckema, A et al., 1989] y [Jongedijk, E et al., 1992], para PVX y [Malnoe, P et al., 1994], para PVY) como en conjunto [Kaniewski, W et al., 1990].

Kaniewski et al. (1990) analizaron el comportamiento de cuatro líneas independientes de Russet Burbank simultáneamente transgénicas para las CPs de PVX e Y (obtenidas por agroinfección con un vector que portaba ambos genes regulados en forma independiente), las cuales fueron inoculadas mecánicamente como paso previo al transplante en el campo. La selección de los clones se basó en los niveles de resistencia desarrollados por los mismos bajo condiciones artificiales (en cámara de cría). Del análisis de los títulos alcanzados para cada uno de los virus, los autores encontraron que sólo uno de los clones era altamente resistente a ambos (Tabla 2), de modo tal de no poder detectar por ELISA ningún individuo que hubiera sido infectado con ambos virus a la vez. Si bien trabajos previos habían reportado que existía correlación entre los niveles de CP endógena y el grado de protección conferida en el caso específico de PVX (y a diferencia de PVY), estos autores comentan que en su ensayo a campo no pudieron corroborarlo.

En vistas de los experimentos llevados a cabo por el grupo de Dougherty para desentrañar el mecanismo de resistencia que operaría en el caso particular de los potyvirus ([Lindbo, JA et al., 1992b], [Lindbo, JA et al., 1993] y [Goodwin, J et al., 1996], entre otros), no es sorprendente que no exista correlación entre los niveles de proteína endógena y el grado de protección conferido por la misma.

A su vez, la concreción de estos experimentos permitió determinar que el proceso de transformación y la expresión de un gen foráneo no modificó en modo alguno las características del genotipo elegido para la transformación, al menos, a juzgar por una serie de parámetros analizados (entre ellos, la morfología y el hábito de crecimiento de la

planta, la morfología del tubérculo, etc., [Jongedijk, E et al., 1992]).

En el caso de PLRV, recientemente Barker et al. (1994) reportaron un aumento en el grado de resistencia alcanzada para este virus, por combinación del efecto de la presencia de genes de resistencia en distintos cultivares con la expresión del transgén para la CP. En trabajos previos, estos autores publicaron que las líneas transgénicas de papa o tabaco que expresaban mayores niveles de CP eran las más resistentes a la infección por este virus ([Barker, H et al., 1992] y [Barker, H et al., 1993]). Como resultado, los autores determinaron que el efecto entre ambos parece ser aditivo, de modo tal que el grado de infección desarrollado en plantas transgénicas de algunos cultivares resistentes fue menor al 1% respecto de las susceptibles.

Es de esperar que los experimentos de infección múltiple arrojarán alguna luz acerca de posible interacciones en la naturaleza entre luteovirus y potyvirus, las cuales, hasta el momento no han sido analizadas en la literatura.

Conclusiones

Durante el presente trabajo de tesis se propuso como objetivo la evaluación de alternativas conducentes a la expresión coordinada de múltiples genes en plantas transgénicas. Para ello se ingenierizó un vector cuya funcionalidad está basada en una variante de la estrategia de expresión genética de los potyvirus, que implica la biosíntesis de una poliproteína que codifica (entre otras) para una proteasa (en este caso en particular, la NIa de TEV), la cual es responsable de su autoprocesamiento -en *cis*-, para luego -en *trans*- dar origen a los otros péptidos involucrados. Como resultado de esta estrategia se obtienen las proteínas individuales las cuales poseen unos aminoácidos extra en alguno de sus extremos (seis en el carboxiterminal, en el caso de aquellas codificadas hacia el 5´ de la proteasa, y uno en el aminoterminal, en el caso de estar hacia el 3´).

Debido a que en la versión original los niveles de expresión del cassette en plantas transgénicas eran bajos (probablemente debido a la localización nuclear del sistema), se hizo evidente la necesidad de modificarlo con el fin de aumentar los niveles totales (citoplasmáticos) de las proteínas de interés. Para ello se llevaron a cabo una serie de deleciones internas en NIa todas tendientes a alterar la localización final de la poliproteína. Todas las modificaciones introducidas en NIa resultaron en versiones que mantuvieron su actividad proteolítica *in vitro*, inclusive la deleción que comprende los 190 aminoácidos amino-terminales, lo cual implica la remoción de todo el dominio VPg. A su vez, los resultados obtenidos en los experimentos de expresión transitoria muestran claramente que todas las modificaciones llevadas a cabo en el gen NIa se tradujeron en un aumento en los niveles citoplasmáticos de proteína GUS con respecto a los expresados a partir de la poliproteína conteniendo el gen de longitud completa. Este hecho posibilitó la elección de la mínima versión de la proteasa (en la cual se delecionó todo el dominio VPg de la proteína) como base del nuevo cassette de expresión.

Para comprobar fehacientemente que las modificaciones realizadas resultaron en un cambio en la localización subcelular de la proteasa, se llevaron a cabo fusiones carboxi-terminales al gen *uidA*. Las distintas construcciones dieron lugar a productos de fusión del tamaño esperado, las cuales conservaron el marco de lectura correcto a juzgar por la actividad enzimática detectable en protoplastos infectados con derivados de las mismas. Al evaluar dichas fusiones en ensayos de expresión transitoria, se encontró que la fusión de la proteasa de longitud completa dio lugar a la acumulación de pigmento azul en el núcleo (especialmente en la membrana nuclear y en los nucleolos). Por su parte, la fusión conteniendo la mínima versión de NIa dio origen a células completamente teñidas de azul, sin ninguna localización en particular, patrón indistinguible del obtenido con el control conteniendo el gen *uidA* no fusionado, tras lo cual se concluyó que la localización subcelular fue efectivamente modificada (de nuclear a citoplasmática) con las modificaciones introducidas.

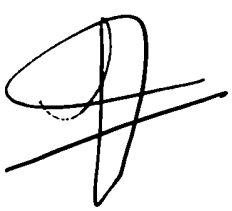
El paso subsiguiente implicó la realización de distintas construcciones conteniendo las proteínas de cápside de interés, en vistas a confirmar la funcionalidad de la nueva proteasa en contexto de proteínas heterólogas, como es el caso de las CPs de PLRV y PVX. Como se desprende de los experimentos detallados, la proteasa fue capaz de reconocer y procesar a nivel de su sitio específico de clivaje, dando lugar a proteínas que son reconocidas por anticuerpos específicos, lo cual confirma no sólo la funcionalidad de la proteasa sino también la aplicabilidad del sistema de expresión en sí. Aún más, cuando tales construcciones portadoras de los genes de cápside viral fueron evaluadas en experimentos *in vivo*, dieron lugar a proteínas de cápside procesadas. Puede concluírse, por lo tanto, que los diversos clones portando las construcciones de interés fueron capaces de replicar en protoplastos; más aún, que las diversas construcciones expresadas a partir del promotor de la proteína de cápside de Ob fueron transcriptas, traducidas y

sujetas a procesamiento post-traduccional acorde con lo esperado (a juzgar por la ausencia de bandas de mayor peso molecular que indicarían un procesamiento incompleto del precursor polipeptídico) por lo cual resultaron altamente alentadores en cuanto a la factibilidad del uso de esta estrategia para la obtención de plantas establemente transformadas que expresen coordinadamente varios genes. En este sentido, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vivo* en un sistema de expresión transitoria, las plantas transgénicas obtenidas con esta serie de construcciones podrían poseer la actividad biológica buscada, al menos en el grado en que ésta dependa de la expresión de la proteína.

Dado que el objetivo del presente trabajo de tesis es la evaluación de estrategias conducentes a la obtención de plantas transgénicas con resistencia combinada a virosis, se planteó el uso de la contransformación como una alternativa válida, dado que posibilita la obtención -si bien en porcentajes bajos- de plantas múltiples transgénicas. Las eficiencias relativas de transformación para cada construcción mostraron variabilidad de experimento a experimento oscilando entre 10 y 90 % en el caso más extremo. A su vez, la cotransformación para dos genes determinados varió entre 0 y 13 %, según el experimento. La utilización de marcadores selectivos diferentes eficientizará la selección de las plantas dobles y triples transgénicas.

En la literatura se ha reportado hasta el momento la obtención de plantas transgénicas resistentes por expresión de la CP para los tres virus involucrados en este trabajo. En el caso de los virus PVX y PVY la caracterización ha llegado incluso a nivel de evaluaciones a campo de las líneas transgénicas, tanto por separado como en forma conjunta. El análisis del ensayo a campo llevado a cabo con las líneas transgénicas dobles obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo de tesis arrojarán algunos datos acerca del fenómeno de resistencia mediada por la expresión de

proteína de cápside viral, así como la posibilidad de ocurrencia de co-infecciones múltiples por estos virus en la naturaleza.



Referencias

(1995) "Improved direct PCR screen for bacterial colonies:wooden toothpicks inhibit PCR amplification" BioTechniques 18: 225-226.

AbouHaidar, MGy Erickson, JW (1985). Structure and in vitro assembly of papaya mosaic virus. Molecular Plant Virology. Boca Raton, Florida, CRC Press. 85-121.

Allison, RF, et al. (1985a). "Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression." PNAS 82: 3969-3982.

Allison, RF, Johnston, RE, y Dougherty, WG (1986). "The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein." Virology 154: 9-20.

Ammar, ED, Jarlfors, U, y Pirone, TP (1994). "Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector." Phytopathology 84(10): 1054-1060.

Atreya, CD, Raccah, B, y Pirone, TP (1990). "A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus." Virology 178(1): 161-165.

Atreya, PL, Atreya, CD, y Pirone, TP (1991). "Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus." Proc Natl Acad Sci U S A 88(17): 7887-7891.

Bahner, I, et al. (1990). "Expression of the genome of potato leafroll virus: Readthrough of the coat protein termination codon in.sbd.vivo." J Gen Virol 71(10): 2251-2256.

Barker, H, et al. (1992). "Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of potato leafroll luteovirus: Similarities with a type of host gene-mediated resistance." Ann Appl Biol 120(1): 55-64.

Barker, H, et al. (1993). "Relationship between transcript production and virus resistance in transgenic tobacco expressing the potato leafroll virus coat protein gene." Plant Cell Reports 13(1): 54-58.

Barker, H., Webster, K. D., Jolly, C. A., Reavy, B., Kumar, A., y Mayo, M. A. (1994) "Enhancement of resistance to potato leafroll virus multiplication in potato by combining the effects of host genes and transgenes" Molecular Plant-Microbe Interactions 7: 528-530.

Beck von Bodman, S, Domier, L, y Farrand, SK (1995). "Expression of multiple eukaryotic genes from a single promoter in Nicotiana." Bio/Technology 13: 587-591.

Beck von Bodman, S., Hayman, G.T., y Farrand. S.K. (1992) "Opine

catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor". PNAS 89 643-47.

Beck, DL, et al. (1991). "Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport." Virology 183(2): 695-702.

Bercks, R (1970). Potato Virus X. CMI/AAB description of plant viruses. Kew, England, Commonwealth.

Berger, BR y Christie, PJ (1993). "The Agorbacterium tumefaciens virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate binding domain." J. Bacteriol. 175: 1723-1734.

Bravo-Almonacid, F (1992)."Desarrollo de métodos de diagnóstico y de plantas transgénicas de papa para el control de infecciones producidas por el virus PVY.". Universidad Nacional de La Plata.

Carrington, JC y Dougherty, WG (1987a). "Processing of the Tobacco Etch Virus 49K protease requires autoproteolysis." Virology 160: 355-362.

Carrington, JC y Dougherty, WG (1988b). "A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing." Proc Natl Acad Sci U S A 85(10): 3391-3395.

Carrington, JC y Freed, DD (1990). "Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region." J Virol 64(4): 1590-1597.

Carrington, JC, Cary, SM, y Dougherty, WG (1988a). "Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase." J Virol 62(7): 2313-2320.

Carrington, JC, et al. (1989a). "A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome." Embo (Eur Mol Biol Organ) J 8(2): 365-370.

Carrington, JC, Freed, DD, y Leinicke, AJ (1991). "Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral Nla protein." Plant Cell 3(9): 953-962.

Clark, WG, Fitchen, JH, y Beachy, RN (1995). "Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. I The PM2 assembly defective mutants confer resistance to TMV." Virology 208: 485-491.

Cronin, S, et al. (1995). "Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase." Plant Cell 7(5): 549-559.

Cuozzo et al. (1988). Bio/Technology6: 549.

Dawn-Parks, T, et al. (1995). "Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase

form." Virology 210: 194-201.

Dawson, WO y Lehto, KM (1990). "Regulation of tobamovirus gene expression." Advances in virus research 38: 307.

de Mejia, MVG, et al. (1985). "Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a non-structural virus-specific protein related to helper component." Virology 142: 34-43.

del Vas, M (1993)."Obtención y caracterización de plantas de interés agropecuario.". Universidad de Buenos Aires-Argentina.

Dellaporta et al. (1983). Plant Molecular Biology Reporter1: 19-21.

Deom, CM et al. (1991). "Altered function of the tobacco mosaic virus movement protein in a hypersensitive host ." Virology 180: 251-256.

Dhaese, P, et al. (1979). "Rapid mapping of tn insertion and deletion mutations in the large Ti plasmids of Agrobacterium." Nucleic Acid Research7: 1837-1849.

Dingwall, C y Laskey, RA (1986). "Protein import into the cell nucleous." Ann. Rev. Cell Biol.2: 367-390.

Dolja, VV, et al. (1994). "Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants." Embo (European Molecular Biology Organization) Journal 3(6): 1482-1491.

Dolja, VV, et al. (1995). "Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus." Virology 206(2): 1007-1016.

Domier, LL, et al. (1986). "The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus." Nucleic Acid Res. 14: 5417-5431.

Domier, LL, Shaw, JG, y Rhoads, RE (1987). "Potyviral proteins share amino acid sequence homology to picorna-, como-, and caulimoviral proteins." Virology 158: 20-27.

Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1989) "Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays" Virology 172: 145-155.

Dougherty, WG y Parks, TD (1991). "Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains." Virology 183(2): 449-456.

Dougherty, WG, Cary, SM, y Parks, TD (1989). "Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: A model." Virology 171(2): 356-364.

Dougherty, WG, et al. (1988). "Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site." Embo (Eur Mol Biol Organ) J 7(5): 1281-1288.

Dougherty, WG, et al. (1989b). "Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase." Virology 172(1): 302-310.

Duffus, J (1977). Aphids, viruses, and the yellow plague. Aphids as virus vectors. New York, Academic Press. 361-383.

Ellis, JG, et al. (1982). "Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids." Mo. Gen. Genet.186: 269-274.

Eskandari, F, Sylvester, ES, y Richardson, J (1979). "Evidence for lack of propagation of potato leafroll virus in its aphid vector, Myzus persicae." Phytopathology 69: 45-47.

FAO (1991). Potato production and consumption in developing countries. Plant production and protection paper.110.

Fitchen, J y Beachy, RN (1993). "Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants." Annu. Rev. Microbiol.47: 739-763.

Forster, RLS, et al. (1988). "The complete nucleotide sequence of the potexvirus white clover mosaic virus." Nucleic Acids Res 16(1): 291-304.

Fraley et al. (1985). Bio/Technology3: 629-635.

Fujiwara T, Lessard, .PA., y Beachy, R.N. (1993). "Inactivation of the nopaline synthase gene by double transformation: Reactivation by segregation of the induced DNA." Plant Cell Rep. 12: 133-138.

Gadani, F, et al. (1990). "Genetic engineering of plants for virus resistance." Arch. Virol. 115: 1-21.

Goodman, RM y Ross, AF (1974a). "Enhancement of potato virus X synthesis in double infected tobacco occurs in doubly infected cells." Virology 58: 16-24.

Goodwin, J, et al. (1996). "Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance." The Plant Cell 8: 95-105.

Guilley, H, Richards, KE, y Jonard, G (1995). "Nucleotide sequence of beet mild yellowing virus rna." Archives Of Virology 140(6): 1109-1118.

Hammond (1990)."Report of the 3rd planning conference". International Potato Center (CIP).

Harrison, BD (1984). Potato Leafroll Virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. Commonwealth Agricultural Bureaux/Association of Applied Biologists. 291.

Hemenway, C, et al. (1988). "Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA." EMBO J 7: 1273-1280.

Hernalsteens, JP, et al. (1980). "The Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells." Nature 287: 654-656.

Hobbs, S.WT y DeLong, C. (1993). " Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression." Plant Mol. Biol. 21: 17-26.

Hoeckema, A, et al. (1983). "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid." Nature 303: 179-180.

Hoeckema, A, et al. (1989). "The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to PVX." Bio/technology 7: 273-278.

Hong, Y, Levay, K, Murphy, JF, Klein, PG, Shaw, JG, y Hunt, AG (1995) "A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells". Virology 214: 159-166.

Hooykaas, PJJy Beijersbergen, AGM (1994). "The virulence system of Agrobacterium tumefaciens." Ann. Rev. Phytopathol. 32: 157-179.

Huisman, MJ, et al. (1988). "The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses." J Gen Virol 69(8): 1789-1798.

Ikeda, T, Matsuomoto, T, y Noguchi, M (1976). "Effects of nutritional factors on the formation of Ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture." Agric. Biol. Chem. 40: 1765-1770.

Jin, S, et al. (1990). "The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of Agrobacterium tumefaciens virulence genes." J. Bacteriol. 172: 531-537.

Jolly, CA y Mayo, MA (1994). "Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission." Virology 201(1): 182-185.

Jongedijk, E, et al. (1992). "Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions." Bio/Technology 10: 422-429.

Kaniewski, W, et al. (1990). "Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by PVX and PVY." Bio/Technology 8: 750-754.

Kawchuk, LM, Martin, RR, y McPherson, J (1990). "Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene." Mol Plant-Microbe Interact 3(5): 301-307.

Kawchuk, LM, Martin, RR, y McPherson, J (1991). "Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants." Mol Plant-Microbe Interact 4(3): 247-253.

Lain, S, et al. (1989). "Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins." Gene (Amst) 82(2): 357-362.

Lawson, C, et al. (1990). " Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to PVY in transgenic Russet Burbank." Bio/Technology8:: 127-134.

Leiser, RM, et al. (1992). "Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus." Proc Natl Acad Sci U S A 89(19): 9136-9140.

Leseman, DE (1988). Cytopathology. The Plant Viruses. New York, Plenum Publishing Corporation. 3-50.

Lindbo, JA y Dougherty, WG (1992a)"Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence" Mol Plant-Microbe Interact 5: 144-153.

Lindbo, JA y Dougherty, WG (1992b). "Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts." Virology 189(2): 725-733.

Lindbo, JA, et al. (1993). "Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance." Plant Cell 5(12): 1749-1759.

Logemann, J, Schell, J, y Willmitzer, L (1987). "Improved method for the isolation of RNA from plant tissues." Analytical Biochemistry 163: 16-20.

Lok, S y Abouhaidar, MG (1986). "The nucleotide sequence of the 5´end oof papaya mosaic virus RNA: site of in vitro assembly initiation." Virology 153: 289-296.

Lomonossoff, GP (1995). "Pathogen derived resistance to plant viruses." Annu. Rev. Phytopathol.33: 323-343.

Maiss, E, et al. (1989). "The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA." J Gen Virol70(3): 513-524.

Malnoe, P, et al. (1994). "Small-scale field tests with transgenic potato, cv. bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus y." Plant Molecular Biology25(6): 963-975.

Maniatis, T, Fritsch, E, y Sambrook, J (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marcos, JF y Beachy, RN (1994). "In vitro characterization of a cassette to accumulate multiple proteins through synthesis of a self-processing polypeptide." Plant Molecular Biology24(3): 495-503.

Marcos, JF y Beachy, RN (1996). "Transgenic expression of two plant virus genes through a single self processing polypeptide." Enviado para su publicación a J Gen Virol.

Matzke M. y Matzke, A (1993). "Genomic imprinting in plants: parental effects and trans-activation phenomenona." Ann. Rev. Plant

Physiol. Plant Mol. Biol. 44(53): 53-76.

Mayo, MA, et al. (1982). "Evidence that potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate." J. Gen. Virol.59: 163-167.

Mayo, MA, et al. (1989). "Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA." J Gen Virol70(5): 1037-1052.

McKinney, H (1929). "Mosaic diseases in Canary Islands, West Africa, and Gibraltar." J. Agric. Research39: 557.

Mendoza (1986). The production of new potato varieties: technological advances. Cambridge, Cambridge University Press.

Mentaberry, A y Orman, B (1995). Potexviruses. Pathogenesis and host specificity in plant viruses. Great Britain, Elsevier Science Ltd.

Miller, WA, Waterhouse, PM, y Gerlach, WL (1988). "Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA." Nucleic Acids Res 16(13): 6097-6112.

Miranda, A., Janssen, G., Hodges, L., Peralta, E.G., y Ream, W. (1992) "Agrobacterium tumefaciens transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism." J Bacteriol 174: 2288-97.

Mueller, E, et al. (1995). "Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing." Plant J. 7: 1001-1013.

Murphy, J. F., Rychlik, W., Rhoads, R. E., Hunt, A. G., y Shaw, J. G. (1991) "A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA". J Virol 65: 511-513.

Murphy, JF, et al. (1990). "The VPg of tobacco etch virus is the 49 kDa-proteinase or the N-terminal 24 kDa part of the proteinase." Virology 178: 285-288.

Nejidat, A y Beachy, RN (1989). "Decreased levels of TMV coat portein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduce resistance to TMV infection." Virology 173: 531-538.

Nejidat, A y Beachy, RN (1990a). "Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses." Mol Plant-Microbe Interact 3(4): 247-251.

Nejidat, A, Clark, WG, y Beachy, RN (1990b). "Engineered resistance against plant virus diseases." Physiol. Plantar. 80: 662-668.

Nelson, RS, Powell-Abel, PA, y Beachy, RN (1987). "Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus." Virology 158: 126-132.

Orman, BE, et al. (1990). "Complete complementary DNA sequence of a South American isolate of potato virus X." Virus Res 16(3): 293-

306.

Ow, DW, et al. (1986). "Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants." Science 234: 856-859.

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

Padgett, HS, Watanabe, Y, y Beachy, RN (1996). "Identification of a TMV replicase fragment capable of eliciting the N gene mediated hypersensitive response." Plant Cell (enviado para su publicación).

Parks, TD, Smith, HA, y Dougherty, WG (1992). "Cleavage profiles of tobacco etch virus (TEV)-derived substrates mediated by precursor and processed forms of the TEV NIa proteinase." J Gen Virol. Reading Society for General Microbiology. Jan 73: 1.

Pirone, TP (1991). Seminars in Virology 2: 81-87.

Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., y Beachy, R.N. (1987) "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene." Science 232: 738.

Powell-Abel, PA, et al. (1990). "Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic tobacco plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences." Virology 175: 124-130.

Pruefer, D, et al. (1992). "Ribosomal frameshifting in plants: A novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus." Embo (Eur Mol Biol Organ) J 11(3): 1111-1117.

Reimann-Philipp, Uy Beachy, RN (1993a). "The mechanism(s) of coat protein-mediated resistance against tobacco mosaic virus." Seminars in Virology 4: 349-356.

Reimann-Philipp, Uy Beachy, RN (1993b). "Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters." Mol Plant-Microbe Interact 6(3): 323-330.

Restrepo, MA, Freed, DD, y Carrington, JC (1990). "Nuclear transport of plant potyviral proteins." Plant Cell 2(10): 987-998.

Restrepo-Hartwig, MA y Carrington, JC (1992). "Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis." J Virol 66(9): 5662-5666.

Restrepo-Hartwig, MA y Carrington, JC (1994). "The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication." Journal Of Virology 68(4): 2388-2397.

Rich (1983). Potato Diseases. New York, USA, Academic Press.

Riechmann, JL, Lain, S, y Garcia, JA (1991). "Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA." Virology 185(2): 544-552.

Riechmann, JL, Lain, S, y Garcia, JA (1992). "Highlights and prospects of potyvirus molecular biology." J Gen Virol 73(1): 1-16.

Robaglia, C, et al. (1989). "Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA." J Gen Virol 70(4): 935-948.

Rocha-Sosa, M, et al. (1989). "Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene." EMBO J. 8: 23-29.

Rorrer, K, et al. (1992). "Autocatalytic activity of the tobacco etch virus NIa proteinase in viral and foreign protein sequences." J Gen Virol. Reading : Society for General Microbiology. Apr 4.

Ross, H (1986). Potato breeding: problems and perspectives. Berlin- Hamburg, 1-129.

Rossi, L, Hohn, B, y Tinland, B (1993). "The VirD2 protein of Agrobacterium tumefaciens carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants." Mol. Gen. Genet. 239: 345-353.

Sanger, F, Nicklen, S, y coulson, AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." PNAS 74: 5463-5467.

Scholthof, KBG, Scholthof, HB, y Jackson, AO (1993). "Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants." Plant Physiol (Rockv) 102(1): 7-12.

Shukla, DD, Frenkel, MJ, y Ward, CW (1991). "Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region." Can J Plant Pathol 13(2): 178-191.

Sit, TL, Abouhaidar, MG, y Holy, S (1989). "Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA." J Gen Virol 70(9): 2325-2332.

Skryabin, KG, et al. (1988). "Conserved and variable elements in rna genomes of potexviruses." Febs (Fed Eur Biochem Soc) Lett 240(1-2): 33-40.

Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., y Dougherty, W. G. (1994) "Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense rnas: expression, regulation, and fate of nonessential rnas". Plant Cell 6: 1441-1453.

Swaney, S, et al. (1995). "RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome." Mol. Plant-Microbe Interactions 8: 1001-1011.

Tacke, E, et al. (1989). "Cloning of the gene for the capsid protein of potato leafroll virus." Arch Virol 105(3-4): 153-164.

Tacke, E, et al. (1991). "The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein." J Gen Virol 72(8):

2035-2038.

Tacke, E., Schitz, J., Pruefer, D., y Rohde, W. (1993) "Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kda phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein-protein interactions". Virology 197: 274-282.

Tendille, C y Lecerf, M (1974). "Multiplication végétative de l´asperge (Asparagus officinalis L.)." Ann. Amélior. Plantes 24: 268.

Thornbury, DW, et al. (1985). "Purification and characterisation of potyvirus helper component." Virology 144: 260-267.

Thornbury, DW, et al. (1990). "Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C." Virology 178(2): 573-578.

Tinland, B, et al. (1995) "The Agrobacterium tumefaciens virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome". EMBO J. 14: 3585-3595.

Van Den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., y Van Der Wilk, F. (1994) "Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by myzus persicae". Phytopathology 84 1066.

Van Der Vlugt, RAA, Ruiter, RK, y Goldbach, R (1992). "Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron." Plant Mol Biol 20(4): 631-639.

Van Der Wilk, F, et al. (1989). "Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic rna." Febs (Fed Eur Biochem Soc) Lett 245(1-2): 51-56.

Van Der Wilk, F, et al. (1991). "Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection." Plant Mol Biol 17(3): 431-440.

Vance, VB (1991). "Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y." Virology 182(2): 486-494.

Vance, VB, et al. (1995). "5' proximal potyviral sequences mediate potato virus x-potyviral synergistic disease in transgenic tobacco." Virology 206(1): 583-590.

Veidt, I, et al. (1988). "Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA." Nucleic Acids Res 16(21): 9917-9932.

Verchot, J, Koonin, EV, y Carrington, JC (1991). "The 35-kDa protein from the amino-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase." Virology 185(2): 527-535.

Verchot, J. y Carrington, J. C. (1995a) "Evidence that the potyvirus p1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification". J Virol 69: 3668-3674.

Verchot, J. y Carrington, J. C. (1995b)"Debilitation of plant potyvirus infectivity by p1 proteinase-inactivating mutations and

restoration by second-site modifications". J Virol 69: 1582-1590.

Vigliola (1986). Manual de Horticultura Buenos Aires- Argentina,

Vincent, JR, Lister, RM, y Larkins, BA (1991). "Nucleotide sequence analysis and genomic organization of the NY-RPV isolate of barley yellow dwarf virus." J Gen Virol 72(10): 2347-2356.

Vogel, AM y Das, A (1992). "Mutational analysis of Agrobacterium tumefaciens virD2: tyrosine 29 is essential for endonuclease activity,." J. Bacteriol. 174: 303-312.

Ward, CQ y Shukla, DD (1991). "Taxonomy of potyviruses current problems and some solutions." Intervirology 32(5): 269-296.

Whitham, S, et al. (1994). "The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarities to toll and interleukin-1 receptor." Cell 78: 1101-1115.

Wisniewski, LA, et al. (1990). "Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco." Plant Cell 2: 559-567.

Zambryski, P, et al. (1983). "Ti plasmid vector for the introduction of DNA in plant cells without alteration of their normal regeneration capacity." EMBO J. 2: 2143-2150.

Zambryski, PC (1992). "Chronicles from the Agrobacterium- plant cell DNA transfer story." Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 465-490.

Zuidema, D, et al. (1989). "Nucleotide sequence of narcissus mosaic virus RNA." J Gen Virol 70(2): 267-276.

DPTO. GRADUADOS
ENTRO 20 MAR 1996