

Tesis de Posgrado

Identificación y análisis molecular de una cepa hipervirulenta de PVX, PVX MS y estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína de Capside de PVX

Tozzini, Alejandro Carlos

1997

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:

Tozzini, Alejandro Carlos. (1997). Identificación y análisis molecular de una cepa hipervirulenta de PVX, PVX MS y estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína de Capside de PVX. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2992_Tozzini.pdf

Cita tipo Chicago:

Tozzini, Alejandro Carlos. "Identificación y análisis molecular de una cepa hipervirulenta de PVX, PVX MS y estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína de Capside de PVX". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2992_Tozzini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**IDENTIFICACION Y ANALISIS MOLECULAR
DE UNA CEPA HIPERVIRULENTE DE PVX, PVX MS
Y
ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES
POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEINA DE CAPSIDE DE PVX**

ALEJANDRO CARLOS TOZZINI

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

DIRECTOR: DR. H. ESTEBAN HOPP

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

INTA - CASTELAR

1997

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**IDENTIFICACION Y ANALISIS MOLECULAR
DE UNA CEPA HIPERVIRULENTE DE PVX, PVX MS
Y
ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES
POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEINA DE CAPSIDE DE PVX**

ALEJANDRO CARLOS TOZZINI

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

DIRECTOR: DR. H. ESTEBAN HOPP

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

INTA - CASTELAR

1997

A Analía

A Lucianita

A nuestros próximos hijos

A Greta y Carlos

A Ricardo y Mariana

Los científicos pueden, según su origen, tomar distintos caminos hacia la verdad;
pero, si no toman mate ! ¿Cómo pueden escribir una tesis?

uno de los argentino perdido por el mundo

Indice

Resumen
Abstract

Sección 1

Introducción general

Interacción virus-planta

Genética de la resistencia del hospedante

Genética de la virulencia

El virus x de la papa (PVX)

Química y estructura del PVX

Replicación y expresión del genoma de PVX

Hospedantes, síntomas y transmisión del PVX

El cultivo de papa

Origen e importancia del cultivo

Factores adversos al cultivo

Daños producidos por el PVX al cultivo de papa

Variabilidad genética del PVX

Variabilidad genética de los virus RNA(+)

Cepas de PVX

Selección de nuevas cepas de PVX

El rol de la proteína de cápside (CP) en el proceso de infección

El papel de la CP de los virus en el movimiento por la planta

El rol de la proteína de cápside en la acumulación de RNA viral

La CP del PVX como disparador de la resistencia *Rx* o *Nx*

Estudios previos de la CP de PVX

Sección 2

Materiales y métodos

Material vegetal

Razas de PVX

Cultivo de las plantas micropropagadas

Inoculación mecánica

Detección inmunológica - ELISA

SDS-PAGE y análisis inmunológico (*western blotting*)

Secuenciación del genoma de PVX MS

RNA viral

cDNAs

Primers de PCR

Reacciones de secuenciación

Algoritmos de análisis de proteínas

Densidad de carga

Estructura secundaria según Chou-Fasman

Estructura secundaria según Garnier y Robson

Hidrofilicidad según Hopp-Woods

Flexibilidad según Karplus

Hidropatía según Kyte-Doolittle

Cálculo de la similitud y divergencia de las secuencia	24
Análisis de las modificaciones post-traduccionales de la cápside	
Purificación de la proteína de cápside a partir de virus purificado	24
Detección de residuos de azúcar en proteínas	25
Deglicosilación química de la CP	25
Deglicosilación enzimática de la CP	25
Caracterización de la glicoproteína de cápside mediante lectinas	25
β - eliminación de azúcares	26
Separación de las distintas formas de proteína de cápside	26
Digestión con tripsina	26
Cromatografía en fase reversa	26
Secuenciación de proteínas y péptidos	27
Desbloqueo químico del amino terminal de la CP	27
Espectroscopía de masa	27

Sección 3

PVX MS, una nueva cepa hipervirulenta

Resultados

Aislamiento del PVX MS	28
Multiplicación de PVX MS en genotipos <i>Rx</i>	28
Caracterización inmunológica y por SDS-PAGE de la CP de PVX MS	31

Discusión

Características de virulencia de la cepa MS	33
Origen de la cepa MS	33

Sección 4

Análisis molecular del genoma de PVX MS

Resultados

Secuencia nucleotídica del genoma de PVX MS	35
Secuencia de aminoácidos de las proteínas de PVX MS	46

Discusión

Estructura y filogenia de PVX MS	56
Determinantes de virulencia y patogenicidad de la cepa MS	57
Determinantes en secuencias no codificantes del genoma	57
Determinantes de virulencia en las regiones codificantes	58

En la proteína de cápside	58
Determinantes devirulencia fuera del gen de la cápside	59
En el ORF 1	62
En el ORF 2	66
En el ORF 3	68
En el ORF 4	70

Conclusiones	70
--------------	----

Sección 5

Estudio de la presencia de modificaciones post-traduccionales en la CP

Resultados

Detección de azúcares y deglicosilación química de la CP	71
----------------------------------------------------------	----

Determinación de la presencia de ácido siálico en la CP	75
Deglicosilación enzimática de la CP	75
Caracterización de la glicoproteína de cápside mediante lectinas	76
b - eliminación de azúcares	77
Síntesis de la CP en plantas transgénicas y en distintos hospedantes	78
Separación por HPLC e identificación por secuenciación de péptidos	79
Espectroscopía de masa de los péptidos N y C terminales	80
Secuenciación de los aa del extremo amino	82
Traducción <i>in vitro</i> de la CP	82
Discusión	
Glicosilación de la proteína de cápside de PVX	85
Ubicación y tamaño de las glicosilaciones	85
Amino ácidos potencialmente glicosilados	86
Implicancias de la glicosilación	87
Otras modificaciones post-traduccionales	89
Conclusiones generales	91
Perspectivas	92
Referencias	93
Agradecimientos	103

RESUMEN

Hasta el momento sólo una cepa de PVX capaz de replicar en genotipos portadores de algunos de los genes de resistencia extrema *Rx* ha sido descrita, esta es la cepa HB. En el presente trabajo describimos la identificación de una nueva cepa con características de hipervirulencia aislada en Argentina; esta cepa, PVX MS, es capaz de replicar en genotipos *Rx_{acl}*. La detección inmunológica con anticuerpos monoclonales mostró que la cepa MS pertenece al serotipo PVX⁰ (común o europeo) mientras que la cepa HB corresponde al serotipo PVX^A (andino). El análisis comparativo por western blotting de las proteínas de cápside (CP) de diferentes cepas mostró que PVX MS se distingue por su movilidad electroforética, lo cual fue confirmado por secuenciación nucleotídica.

Debido a que la CP está involucrada en varios aspectos de la interacción virus-planta, incluida la virulencia, se estudió el gen de la CP de la cepa MS. Este gen no contiene los mismos determinantes de virulencia presentes en PVX HB. Estos resultados sugieren que otras regiones virales están también involucradas en la virulencia. El análisis del genoma completo de PVX MS, respecto de otras cepas, mostró que éste presenta tres regiones exclusivas localizadas en los ORFs 1, 2 y 3, candidatas a ser responsables de la hipervirulencia de PVX MS. Por otro lado, el estudio de la CP condujo a descubrir que esta proteína es una glicoproteína. El gen de la CP de todas las cepas de PVX codifica para una proteína de 25 kDa. El análisis de las CPs por SDS-PAGE muestra un peso molecular aparente de 27 a 30 kDa, dependiendo de la cepa, pero la identidad aminoacídica entre algunas cepas es muy alta como para explicar las diferencias de movilidad entre ellas. La CP de seis cepas fueron analizadas mediante oxidación con periodato, tratamiento con ácido trifluorometano-sulfónico, digestión con glicosidasas, reconocimiento por lectinas, tratamiento alcalino suave (β -eliminación) y por espectroscopía de masa de las regiones amino y carboxi terminales, indicando la presencia de O-glicosilaciones en ambos extremos. Sin embargo, estas modificaciones post-traduccionales no parecen determinar diferencias de virulencia entre cepas de PVX.

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en los siguientes trabajos:

- PVX MS - a new strain of Potato Virus X that overcomes the extreme resistance gene *Rx*. Tozzini, A.C., M.F. Ceriani, P. Cramer, E.T. Palva, H. E. Hopp. *J. of Phytopathology*, Vol 141, 241-248. 1994

- Potato virus X coat protein: a glycoprotein. Tozzini, A.C., B. Ek, E.T. Palva, H.E. Hopp. *Virology*, Vol 202, 651-658. 1994.

- The Coat Protein Sequence of a Resistance-Breaking Strain of Potato Virus X isolated in Argentina. Feigelstock, D.A., A.C. Tozzini, y H.E. Hopp. *Virus Genes*, 10:3, 1995.

ABSTRACT

Just one PVX strain, PVX HB, was described as being able to replicate bearing the extreme resistance genes *Rx* until now. Here we report a new resistance-breaking isolate in Argentina, PVX MS, that multiplies in genotypes carrying the *Rx_{acl}* gene. Immunoblot detection with specific monoclonal antibodies showed that PVX MS belongs to the serotype PVX⁰ (common or European strain), whereas PVX HB is included in the serotype PVX^A (Andean), which was confirmed by nucleotide sequencing. Western blotting of the coat proteins of different PVX strains showed that PVX MS differed in mobility in SDS-PAGE.

Since the PVX coat protein (CP) is involved in many aspects of plant-virus interaction including the virulence, we studied the coat protein gene of PVX MS. This gene does not show the virulence determinants reported for PVX HB. These results suggest that other regions of the viral genome are also involved in virulence determination. The analysis of the complete PVX MS genome shows three regions located at ORFs 1, 2 and 3 that are only found in this strain. These regions could be responsible of the PVX MS virulence.

On the other side, the study of the coat protein led us to discover that this protein is a glycoprotein. The coat protein gene of all the strains of potato virus X codes for a protein of 25 kDa. Analysis of the CP by SDS-PAGE shows a migration mobility of 27 to 30 kDa, depending on the strain, but the amino acid identity is too high to explain such difference in the migration. The CP of six PVX strains were analysed by periodate oxidation, trifluoromethanesulfonic acid, digestion with glycosydases, recognition by lectins, mild alkaline treatment (β -elimination) and mass spectroscopy of the N- and C- terminal regions, indicating the presence of O-linked sugars in both ends. These post-transcriptional modifications seem to have no effect on PVX virulence.

Some of the results of this PhD tesis has been published in the following papers:

- PVX MS - a new strain of Potato Virus X that overcomes the extreme resistance gene *Rx*. Tozzini, A.C., M.F. Ceriani, P. Cramer, E.T. Palva, H. E. Hopp. *J. of Phytopathology*, Vol 141, 241-248. 1994
- Potato virus X coat protein: a glycoprotein. Tozzini, A.C., B. Ek, E.T. Palva, H.E. Hopp. *Virology*, Vol 202, 651-658. 1994.
- The Coat Protein Sequence of a Resistance-Breaking Strain of Potato Virus X isolated in Argentina. Feigelstock, D.A., A.C. Tozzini, y H.E. Hopp. *Virus Genes*, 10:3, 1995.

Introducción

Sección 1

INTRODUCCION GENERAL

Si bien es casi un dogma de los fitopatólogos que la mayoría de las plantas son resistentes a la mayoría de los patógenos, también es cierto que muchos cultivos son susceptibles a suficientes patógenos como para sufrir enormes pérdidas. Además, los patógenos están continuamente evolucionando, particularmente frente a la presión de selección ejercida por el monocultivo; por lo cual siempre es posible que una interacción planta-patógeno incompatible se torne a una interacción compatible. Por ésto, para mantener y aumentar la resistencia de los cultivos a los patógenos es esencial conocer más sobre los mecanismos de resistencia y la evolución de los patógenos.

Interacción virus-planta

Los virus de plantas y las plantas interaccionan de distintas maneras produciendo diversos resultados. Estos pueden variar desde la incompatibilidad, donde parece no haber interacción, hasta la formación de síntomas y la multiplicación viral. La interacción compatible (susceptible o patogénica) es combatida (natural o artificialmente) seleccionando genes de resistencia, los cuales ejercen presión selectiva sobre los genes de virulencia. Todas estas posibles interacciones están, en última instancia, determinadas por la interacción entre hospedante y patógeno.

En algunas de estas interacciones el resultado es determinado por uno o unos pocos genes del virus y de la planta. En estas interacciones es probable que estén involucrados eventos de reconocimiento entre los productos de los genes virales y del hospedante generando una respuesta metabólica a alguna señal. En otras interacciones entre el virus y la planta, el resultado puede estar influenciado por un alto número de genes, los cuales pueden tener un efecto indirecto sobre la patogénesis y la multiplicación del virus. En estas interacciones es menos probable que exista algún paso de reconocimiento con alguna señal bioquímica como respuesta. (Fraser, 1990)

Genética de la resistencia del hospedante

En un relevamiento de casos al azar de la literatura (Fraser, 1986) de cultivares comerciales que mostraban resistencia a un virus particular, la resistencia fue monogénica en la mayoría de los casos. Sólo unos pocos involucraban a un pequeño número de loci o posibles interacciones epistáticas o hipostáticas con genes modificadores no involucrados directamente en la resistencia. Los genes de resistencia de esta muestra abarcaban efectos génicos desde la dominancia, pasando por la dominancia parcial hasta la recesividad.

Genética de la virulencia

Los esfuerzos de los mejoradores de plantas por seleccionar variedades resistentes han sido en muchos casos contrabalanceado por la presencia o evolución de cepas virulentas. Se han postulado una gran cantidad de

argumentos a favor de la alta frecuencia de aparición y selección de virulencia, en especial para los virus con genoma a RNA. Mientras que muchos autores consideran que los genomas virales mutan fácilmente de tal forma que los genes de resistencia podrían ser superados rápidamente, otros, por el contrario, consideran que la mayoría de los genes de resistencia han sido durables y útiles en la práctica (Russell, 1978; Ross, 1986). En una muestra examinada de genes descritos en la literatura (Fraser, 1986) se han detectado variantes virulentas para más del 50% de las resistencias monogénicas. Para la mayoría del resto de los genes la literatura no es precisa, no se aclara si han sido desafiados con distintos aislamientos de distintas regiones. Sólo el 10% de los genes aparecen como altamente durables, con pocos o ningún reporte de cepas virulentas después de varios años de uso en el campo.

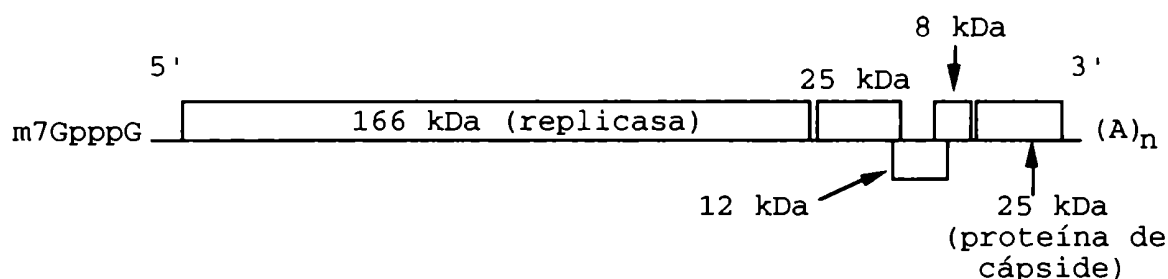
El virus X de la papa (PVX)

Química y estructura del PVX

El PVX es el miembro tipo del grupo potexvirus. La partícula viral es un filamento flexuoso de 515 nm de largo y 13 nm de ancho. La partícula está compuesta por una única cadena simple de RNA (+) rodeada por unas 1270 copias de la proteína de cápside (Koenig y Lesemann, 1989). La proteína de la cápside tiene un peso molecular (estimado a partir de la secuencia nucleotídica de su gen) de 25 kDa; sin embargo el peso molecular observado en SDS-PAGE varía de 27 a 29 kDa según la cepa (Paul, 1974; Tozzini et al., 1994a).

En la Fig. 1.1 se muestra la organización del RNA genómico del PVX, el cual presenta en sus extremos las características propias de un mRNA de eucariontes superiores: en el extremo 5' se halla la estructura m7GpppG (denominado *cap* en idioma inglés) (Sonenberg et al., 1978), mientras que su extremo 3' está poliadenilado (Morozov et al., 1981). El genoma parcial o total de varias cepas ha sido clonado y secuenciado: PVX cepa X3 (Huisman et al., 1988); la cepa rusa S-PVX (Skryabin et al., 1988); las cepas andinas PVX cp (Orman et al., 1990) y PVX HB (Kavanagh et al., 1992, Querci et al., 1993a); y la cepa británica PVX UK3 (Kavanagh et al., 1992).

Fig. 1.1: Organización genómica del PVX. Se indican los 5 marcos de lectura abiertos (ORFs) con el peso molecular en kilodaltons (kDa) de los respectivos productos (estimado a partir de las secuencias de nucleótidos). En el extremo 5' se muestra la estructura del cap, m7GpppG, y en el extremo 3' la cola de poliadenina, (A)_n.



Las cepas secuenciadas hasta el momento presentan 5 marcos abiertos de lectura (ORFs, *open reading frames*) ordenados de la misma forma (Fig. 1) y una longitud de 6436 nucleótidos, siendo las cepas andinas 3 nucleótidos más cortas.

La cepa X3, la primera completamente secuenciada, (Huisman et al., 1988) presenta una secuencia de 84 nucleótidos precediendo al ORF 1, comenzando éste en la posición 85. Este ORF se extiende hasta la posición 4453 y tiene la capacidad de codificar una proteína de peso molecular 165.588 Da (166 kDa). El segundo ORF (ORF 2) comienza en la posición 4.486 y se extiende hasta el codón de terminación UAG en la posición 5.164, codificando para una proteína de peso molecular 24.622 Da (25 kDa). El ORF 3 se inicia en la posición 5.147, superponiéndose con el ORF 2 por 17 nucleótidos en su extremo 5', y terminando en la posición 5.492. Este tercer ORF codifica para una proteína de peso molecular 12.323 Da (12 kDa). El cuarto ORF (ORF 4) comienza en la posición 5.427, superponiéndose con el ORF 3 en 68 nucleótidos por su extremo 5', y teniendo su codón de terminación en la posición 5.637. El ORF 4 codifica para una proteína de peso molecular 7.594 Da (8 kDa). El último ORF (ORF 5) se extiende desde el nucleótido 5.650 hasta el 6.361. El ORF 5 codifica para una proteína de peso molecular 25.080 Da, la cual es la proteína de cápside (CP) (Morozov et al., 1983). Al último ORF le continúa una región no codificante de 76 nucleótidos, y la cola de poliadeninas.

Ninguna función ha sido completamente demostrada para estas proteínas, con excepción de la proteína del ORF 5, la cual es la proteína de la cápside (Morozov et al., 1983). Distintas funciones pueden ser asignadas a los diferentes genes, por comparación de sus secuencias con secuencias conservadas de genes de otros virus de animales, bacterias o plantas, y cuyas funciones son conocidas.

En la porción carboxiterminal de la proteína del ORF 1 se halla un motivo conservado en distintos virus y que corresponde a una RNA polimerasa RNA-dependiente (Haseloff et al., 1984; Kamer y Argos, 1984). En la región central del ORF 1 se encuentra un motivo de unión a NTP (nucleótido trifosfato) (Huisman et al., 1988; Gorbalenya et al., 1989) y que muestra homología con helicasas bacterianas (Gorbalenya et al., 1988). La región amino terminal de la proteína muestra homología con la secuencia consenso de las metil transferasas (Rozanov, datos no publicados citado en Chapman, 1991).

Por estas homologías se propone que la proteína codificada por el ORF 1 estaría involucrada en la replicación del PVX (replicasa viral) y en la modificación post-transcripcional (*cap*) de los extremo 5' de los RNA virales. El producto del ORF1, de aproximadamente 170 kDa, se encuentra en la fracción de membranas de plantas infectadas con PVX. Esto concuerda con la observación general de que las replicasa RNA dependientes (RdRps) virales están asociadas a membranas (Hall et al., 1982). La proteína de 25 kDa del ORF2 también presenta el motivo de unión a NTP y muestra homología con las helicasas bacterianas (Garbalenya et al., 1988) sugiriendo, por tanto, que esta proteína estaría involucrada en la replicación.

La proteína de 12 kDa tiene dos segmentos hidrofóbicos, típicos de las proteínas integrales (*spanning*) de membrana. Esta proteína y las producidas por los ORFs 3 y 4 (12 y 8 kDa, respectivamente) muestran alta homología con similares proteínas de otros potexvirus (Morosov et al, 1987 y 1989; Rupasov et al, 1989; Huisman et al, 1988; Forster et al, 1988; Skryabin et al., 1988a; Zuidema et al., 1989). Se sugiere que los miembros de los tres ORFs superpuestos, conocidos como el bloque triple (ORF 2, 3 y 4) están involucrados en los procesos de movimiento del virus de célula a célula (Morozov et al., 1989).

Replicación y expresión del genoma de PVX

La multiplicación de los virus a RNA dentro de la célula del hospedante involucra 4 pasos básicos que se superponen cronológicamente. Estos son: 1) desencapsidación, el cual libera al ácido nucleico y lo hace disponible para otros procesos; 2) traducción, durante el cual el RNA viral sirve como RNA mensajero para producir proteínas estructurales y no estructurales codificadas por el RNA viral; 3) replicación del genoma viral, produciendo nuevas copias de gRNA viral; 4) encapsidación de las copias de gRNA, con lo cual se forman los nuevos viriones.

Los detalles del mecanismo molecular que conducen a la desencapsidación y encapsidación del virión dentro de la célula son conocidos incompletamente. Se sabe que el desarmado de ciertos virus es favorecido por los ribosomas durante la traducción *in vitro* (Wilson, 1984; Verduin, 1992). Además, se han observado estructuras *in vivo* que semejan a aquellas observadas en los sistemas de traducción *in vitro* que apoyan este concepto de desarmado co-traducciona (Shaw, 1986).

En la mayoría de los casos descritos, el genoma de los virus a RNA eucarióticos funciona como mensajero monocistrónico, aún cuando son estructuralmente policistrónicos. Sólo el cistron próximo al extremo 5' es traducido a partir del gRNA, mientras que la traducción de los cistrones internos se produce a partir de RNAs subgenómicos (sgRNAs) donde éstos ocupan la posición 5' terminal.

Como muestra la Fig. 1.1, el RNA genómico del PVX es un RNA policistrónico (5 genes) y reportes previos indican que en los sistemas de traducción *in vitro* se comporta como monocistrónico, siendo traducido sólo el primer gen (ORF 1) (Wodnar-Filipowicz et al., 1980; Ricciardi et al., 1978). Se postula que *in vivo* la traducción de los otros ORFs es lograda a partir de los RNAs subgenómicos. Cuatro sgRNAs (3.6, 2.1, 1.9 y 0.9 kb) han sido detectados *in vivo* (Dolja et al., 1987). Todos los sgRNAs comparten el extremo 3' y están poliadenilados, aunque no presentan *cap*. Los mejor caracterizados y siempre presentes de manera mayoritaria en los tejidos y células infectadas son los sgRNA de 2.1 y 0.9 kb. El 2.1 sgRNA comienza 18 bases hacia el extremo 5' (*upstream*) del ORF2 y de éste se traducirían las tres proteínas del bloque triple (Morozov et al., 1990, 1991). Como se indicó y muestra la Fig. 1.1, los tres genes se hallan parcialmente superpuestos y se hallan en el mismo marco de lectura, por lo tanto, de producirse la traducción de las tres proteínas a partir de este sgRNA, estaría actuando alguno de los mecanismos de "gimnasia ribosomal" (Atkins et al., 1990). A partir del sgRNA más corto del PVX (0.9 kb) se traduce la proteína de cápside (Grama y Mashkovsk, 1986). Este sgRNA comienza 26 nucleótidos *upstream* del inicio del gen de la cápside (Dolja et al., 1987). Se han detectado cadenas complementarias, es decir, negativas para los sgRNAs de 2.1 y 0.9kb. Estas formas replicativas poseen una cola de poli-U de 16 y 9 bases respectivamente. Estas copias negativas parecen no servir de templado para la síntesis de nuevas cadenas positivas según Dolja et al. (1987). La expresión de las 5 proteínas codificadas por los distintos ORFs del PVX ha sido corroborada *in vivo* (Price, 1992).

Los RNAs subgenómicos del PVX no parecen ser encapsidados, aunque recientemente se ha sugerido que sí lo son (Price, 1993). Mientras que el origen de ensamblaje (OAS) del PVX no ha sido localizado, para otros potexvirus el OAS ha sido determinado hacia el extremo 5'; sin embargo, de producirse la encapsidación de los sgRNA sugerida por Price (1993) esto indicaría que el OAS se hallaría dentro del ORF 5 o de la región no traducida que le continúa hacia el extremo 5'.

Por analogía con el mecanismo de replicación del genoma de los bacteriófagos, el ciclo de replicación completo del genoma de los virus eucariontes que poseen por genoma RNA(+) de cadena simple involucra la síntesis de un RNA(-) complementario a la cadena (+) e incluye una cola de poli-U de 150-250 bases (Dolja et al., 1987). La cadena negativa, a pesar de ser complementaria a la positiva, presenta el agregado de una G en su extremo 3' que no aparea con el gRNA (Dolja et al., 1987). Subsecuentemente, la síntesis de nuevas cadenas RNA(+) se produce a partir del templado RNA(-). La replicación del RNA comienza en el extremo 3' del templado y no requiere de iniciador (*primer*). Durante el transcurso de la multiplicación se producen intermediarios de replicación que están compuestos por una cadena de largo completo de (-)RNA a la cual están unidas varias de (+)RNA que están siendo copiadas y elongadas.

Hospedantes, síntomas y transmisión del PVX

El PVX infecta más de 240 especies de plantas pertenecientes a 16 familias, la mayor parte de las cuales pertenecen a la familia de las Solanáceas (Koenig y Lesemann, 1989, Purcifull y Edwardson, 1981). El virus infecta la mayoría de los tejidos de la planta con la posible excepción de las traqueidas y los tubos xilemáticos (Lesemann y Koenig, 1977).

La principal forma de transmisión del virus es mediante savia infectada junto con el contacto lesivo entre plantas debido al viento; por contacto de raíces; por el pasaje de maquinaria, personal o animales; por el cortado con cuchillo antes de plantar o por insectos cortadores. No es transmitido por áfidos o por semilla botánica (Hooker, 1981, Koenig y Lesemann, 1989, Harrison, 1971).

Los síntomas causados por el PVX en el tabaco y en la papa son variables, lo que depende de la cepa del virus, del genotipo del hospedante y de su estado fisiológico. Estos pueden ser: anillos cloróticos o necróticos o mosaicos leves en las hojas; en genotipos hipersensibles, clorosis en las hojas y, a veces, necrosis apical; puede también no producir síntoma alguno. En cultivares de papa sin genes de resistencia, los síntomas suelen ser más leves e imperceptibles que en el tabaco, por ello se denomina a la enfermedad como mosaico latente o leve de la papa. Esta característica dificulta la localización visual de las plantas de papa infectadas en los campos destinados a la producción de papa semilla.

El cultivo de papa

Origen e importancia del cultivo

La papa es el hospedante de importancia comercial del PVX. Esta especie es originaria de América del Sur. Se considera al altiplano peruano-boliviano como su centro de origen primario (centro de origen de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) y al archipiélago de Chiloé, en el sur de Chile, como centro secundario (origen de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*). La papa más cultivada en la actualidad (*S. tuberosum* L.) es el resultado del cruzamiento de las subespecies antes mencionadas.

Hay 2000 especies del género *Solanum*, de las cuales tuberizan aproximadamente 200. Estas especies pueden ser di, tri, tetra, penta o hexaploides. La especie cultivada es un tetraploide ($2n = 48$) con segregación tetrasómica, aunque para algunos segmentos puede ser un alotetraploide (Ross, 1986).

En América, el área de distribución geográfica del género *Solanum* se extiende desde los 40° de latitud N hasta los 40° de latitud S, desde el nivel del mar hasta los 4500 m s.n.m., especialmente en el sector andino del continente. Las especies adaptadas a las distintas condiciones ecológicas de esta gran región son una fuente de variabilidad genética importante para su uso en los planes de mejoramiento.

La papa es el cuarto cultivo alimenticio a nivel mundial, detrás del trigo, el arroz y el maíz. Sin embargo, su producción de materia seca y de proteína por unidad de superficie es mayor a la de las gramíneas antes mencionadas. Su proteína es particularmente valiosa ya que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales (EAA 76-79), muy raro en otras proteínas de reserva vegetales. Su valor biológico es similar al de la leche (Ross, 1986). La producción mundial es de aproximadamente 300 millones de toneladas (Vigliola et al., 1989). En la Argentina se produce papa en una amplia región que abarca desde Salta y Jujuy hasta Chubut, en la que se planta en diferentes épocas (de julio a febrero), según la zona productora. Sin embargo, el grueso de la producción nacional se concentra en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, en el área de Balcarce, que reúne condiciones favorables para el cultivo. La superficie nacional sembrada es de 100.000 ha/año, con una producción de 2.000.000 de toneladas. De esta producción, alrededor del 70% corresponde al área de Balcarce (Vigliola et al., 1989). Dentro de los cultivos hortícolas, la papa ocupa el primer lugar en producción y el segundo en superficie después del poroto seco. El consumo anual per cápita es de 50 a 75 kilogramos.

Factores adversos al cultivo

La planta de papa es susceptible a deficiencias de nutrientes, a estrés hídricos y de temperaturas y a más de 266 enfermedades (Mendoza, 1986), algunas de las cuales tienen importante incidencia en el resultado del

cultivo. Según su origen, las enfermedades pueden ser: fúngicas, bacterianas, virósicas o fisiogénicas. Las más importantes son las enfermedades de origen fúngico y virósico.

Las enfermedades producidas por virus son especialmente serias en un cultivo como el de la papa que se inicia a partir de trozos de tubérculos ("papa semilla") o de tubérculos pequeños ("semillón"). Esta propagación vegetativa favorece la transmisión y dispersión de distintos virus. Esta circunstancia obliga a tomar recaudos en la producción de los tubérculos que luego serán usados como "semilla", para evitar que éstos estén contaminados con virus. Para este fin se organizan servicios de fiscalización para controlar la producción de dicha papa semilla, certificando aquellos lotes que poseen bajo porcentaje de infección. La necesidad de utilizar "semilla" fiscalizada así como las labores tendientes a controlar la dispersión de los virus elevan significativamente los costos del cultivo (como referencia general del manejo del cultivo, ver Vigliola et al., 1986). De los virus que afectan al cultivo de la papa se destacan por sus fuertes síntomas y sus incidencia en el rendimiento del cultivo el virus del enrollamiento de la hoja (Potato leafroll virus, PLRV) y el del mosaico rugoso (Potato Virus Y, PVY); y por su amplia dispersión, el del mosaico latente (Potato Virus X) (Hooker, 1981, Salazar y Accatino, 1990, Mendoza et al., 1990).

Daños producidos por el PVX al cultivo de papa

Los daños producidos por el PVX pueden ser agrupados en dos tipos: los directos y los indirectos. Los daños directos se manifiestan como una reducción del rendimiento (ton/ha), una reducción en el peso específico del tubérculo (Dowley, 1973), alteración de la composición aminoácida de las proteínas del tubérculo, y en algunas situaciones (respuesta necrótica en tubérculos) afectando el precio de comercialización. La reducción del rendimiento oscila entre 1 y 45%, considerándose 10-15% como el valor más frecuente, lo cual depende del cultivar, de la cepa viral, del porcentaje de plantas infectadas y de las condiciones ambientales (Bawden et al., 1948; Harrison, 1971; Hooker, 1981; Hoyman, 1964; Kozar, 1969; Salazar y Accatino, 1990). Tal como ocurre en todo el mundo (Hooker, 1981), el PVX se halla ampliamente distribuido en nuestras zonas productora, por varias razones. Algunas de éstas son: a) los leves síntomas foliares producidos en la papa que hacen difícil la determinación visual a campo de las plantas infectadas, por esto es que la detección ha estado basada en procedimientos serológicos, principalmente ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (DeBokx et al., 1980, Wright et al., 1976; Hammond, 1990); b) la relativamente baja incidencia sobre el rendimiento, lo que determinó que ocupara un lugar secundario en la atención de los productores frente a otros virus con mayor incidencia en el cultivo y con síntomas más visibles (PLRV y PVY); c) la eficacia con que este virus se transmite mecánicamente potenciada por las labores propias del cultivo como: el corte del tubérculo para producir la papa semilla, la utilización de las sembradoras con púas, y el pasaje de máquinas durante el desarrollo del cultivo.

Los daños indirectos están principalmente referidos al incremento en los costos de producción derivados de las prácticas necesarias para su control. Una de estas prácticas es la compra de "semilla" certificada (Bos, 1992, Hammond, 1990, Harrison, 1971), la cual representa el componente de costo más alto del proceso productivo (Mendoza et al., 1990). Entre los daños indirectos puede incluirse el aumento en la sensibilidad del cultivo a la infección por otros virus, como el PVY o el PLRV (Jayasinghe et al., 1989). La infección simultánea del PVX y el PVY sinergiza los síntomas produciendo fuertes daños a la planta, y suelen ocasionar la muerte de ésta (Hooker, 1981).

Variabilidad genética del PVX

Variabilidad de los virus RNA(+)

Los virus a RNA presentan una gran variación en la organización genómica. Esto es particularmente cierto para los virus RNA de plantas en los cuales el genoma puede estar segmentado en 2 o más fragmentos y estar constituido por una cadena simple positiva, o negativa, o ser de doble cadena. En concordancia con esto, en estos virus se observa una amplia gama de estrategias para las expresiones de sus genes (Goldbach, 1986).

El análisis de las secuencias nucleotídicas disponibles de una gran variedad de virus RNA simple cadena positiva y doble cadena han llevado a postular distintas hipótesis referidas a su evolución. Una de ellas, basada en la alta conservación de la RNA pol (RNA polimerasa RNA dependiente) entre los distintos virus RNA(+), propone que estos virus derivan de un antecesor común el cual poseía sólo la proteína de replicación y evolucionó mediante la sucesiva adición de accesorios y módulos en uno o ambos extremos del gen original (Bruenn, 1991; Dolja y Carrington, 1992). Adicionalmente, los virus RNA(+) habrían derivado de virus RNAdc (Bruenn, 1991), el incremento en la labilidad del genoma debido al cambio de RNAdc por RNAsc, lejos de representar una desventaja constituyó una forma de acelerar la evolución (Drake, 1993). Otro factor importante en la evolución de muchos de los virus RNA(+) han sido los insectos. Se postula que estos virus derivan de un antecesor común que infectaba insectos y que subsecuentemente evolucionó para infectar a los hospedantes de estos insectos, ya sean plantas o animales (Bruenn, 1991; Goldbach, 1986).

Mientras que los cambios a gran escala en la estructura del genoma ocurrieron a través de la adquisición mediante recombinación de elementos modulares derivados de las células hospedantes o de virus homólogos o heterólogos (Morozov et al, 1979; Dolja y Carrington, 1992; Lai, 1992), la microevolución de estos virus ocurrió mediante la alta frecuencia de mutaciones de punto. Estas mutaciones son consecuencia de la falta de auto-verificación de la copia complementaria (*proof reading activity*) hecha por la misma RNA pol. La acumulación de estas mutaciones (así como la de pequeñas inserciones y deleciones) en las secuencias codificantes y no codificantes resultan en la proliferación de cepas, serotipos y subtipos virales. El hecho de que los RNA(+) virus individuales existan como una mezcla compleja de entidades altamente relacionadas pero genéticamente distintas ha llevado a la aplicación del concepto de "cuasiespecie" para describir las poblaciones virales (Domingo et al., 1985). Sin embargo, la acumulación en la población de formas mutantes está restringida por los requerimientos funcionales de las proteínas y los RNAs virales. Así, las mutaciones que inactiven o produzcan un daño crítico a las funciones virales serán perdidas de la población. De igual manera, aquellas variantes que perjudiquen la interacción con las estructuras codificadas por el hospedante tendrán un desventaja selectiva. Por esto último, se acepta que la tasa de evolución en el largo plazo del virus está ligada a la tasa de evolución de sus hospedantes (Koonin y Gorbalenya, 1989).

Cepas de PVX

El PVX, como todos los virus RNA, presenta una gran variabilidad genética; la cual se refleja en el alto número de cepas o aislamientos que han sido identificados en todo el mundo en base a los síntomas desarrollados en hospedantes indicadores (Salaman, 1938; Matthews, 1949). Estas cepas de PVX han sido clasificadas por Cockerham (1955) en cuatro grupos según su interacción con los genes de hipersensibilidad *Nx* y *Nb*, provenientes de *Solanum* (Tabla 1.1). Las cepas del grupo I sólo infectan plantas que no contengan ninguno de los genes de hipersensibilidad antes mencionados. Las del grupo II multiplican en genotipos portadores del gen *Nx* pero no lo hacen en genotipos portadores del gen *Nb*; contrariamente, las cepas del grupo III infectan genotipos *Nb* pero no infectan genotipos *Nx*. Las cepas del grupo IV infectan tanto

genotipos *Nb*, *Nx* o *Nb:Nx*. Ninguna de las cepas típicas de los grupos de virulencia de Cockerham superan a los genes de resistencia extrema *Rx* (*Rx_{acl}* y *Rx_{adg}*, Ross, 1986; Fernández-Northcote, 1990).

Hasta el presente, sólo se ha identificado una cepa de PVX capaz de superar a los genes de resistencia *Rx*; esta cepa es la PVX HB (Moreira et al., 1980).

Tabla 1.1: Clasificación de las cepa de PVX de acuerdo con su compatibilidad con los genes *Nx*, *Nb* y *Rx*. (+) interacción compatible; (-) interacción incompatible. (1) Cockerham (1955) (2) Fernandez-Northcote (1990).

Genes de reacción del hospedante						
Grupo	hipersensibilidad				resistenciaextrema <i>Rx</i>	Patotipo (2)
	<i>nx nb</i>	<i>Nx</i>	<i>Nb</i>	<i>NxNb</i>		
I	+	-	-	-	-	1
II	+	+	-	-	-	
III	+	-	+	-	-	
IV	+	+	+	+	-	
			+	+		HB

Recientemente se ha propuesta una nueva clasificación para las cepas de PVX utilizando, como criterio de clasificación, la capacidad del virus para infectar tejidos portadores de los genes de resistencia *Rx* (Fernández-Northcote, 1990). En esta clasificación las cepas se dividen en patotipos. Pertenecen al patotipo I las cepas que no superan la resistencia conferida por el gen *Rx* mientras que pertenecen al patotipo HB las cepas que sí la superan (Tabla 1.1).

Las diferencias entre los viriones de los distintos aislamientos de PVX no han podido ser detectadas usando anticuerpos policlonales, ya sea mediante ELISA o mediante test de aglutinación (Wright, 1963; Fribourg, 1975; Moreira et al., 1980). Sin embargo, anticuerpos monoclonales anti-cápside del PVX HB (Torrance et al., 1986) fueron capaces de distinguir grupos de aislamientos del PVX. El análisis de un gran número de aislamientos de PVX, incluidos los analizados por Torrance et al. (1986), le permitió a Fernández-Northcote y Lizárraga (1991) concluir que algunos de los anticuerpos monoclonales permiten la asociación entre el serotipo I de Torrance (1986) y el grupo de virulencia II de Cockerham, y entre el serotipo II y el grupo de virulencia III. Otros anticuerpos monoclonales de Torrance (1986) pueden ser asociados con la distribución geográfica u origen filogenético de las cepas de PVX más que con su patogenicidad (Fernández-Northcote y Lizárraga, 1991). En este contexto, dos serotipos diferentes pueden ser distinguidos: serotipo PVX^O ("común" o de distribución mundial) y serotipo PVX^A (andino, restringido al altiplano peruano-boliviano). Además de estas diferencias serológicas, se han observado diferencias en los pesos moleculares aparentes determinados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS para la proteína de cápside (Adams et al., 1987; Paul, 1974; Tozzini et al., 1994 y esta tesis).

Selección de nuevas cepas de PVX

La teoría de la relación gen a gen (Flor, 1971; Staskawicz et al., 1995) tiene su correlato en la interacción entre el PVX y la papa. para cada gen de reacción específico en el hospedante existen variantes del virus portadoras del determinante de virulencia capaz de superar la resistencia. Los alelos de virulencia específicos suelen perderse en ausencia de presión de selección lo que hace suponer que disminuyen la adaptabilidad o competitividad (*fitness*) del virus en condición de competencia con variantes avirulentas en hospedantes susceptibles.

La evolución de variantes virales capaces de superar a los distintos genes de reacción ha sido observada tanto en muestras provenientes del campo como en selección inducida bajo condiciones experimentales. Cockerham y Davidson (1963) identificaron una cepa con las características de virulencia del grupo IV, la cual probablemente mutó a partir de una cepa del grupo II presente en un clon de *Solanum tuberosum* proveniente de Ecuador. Sin embargo, esta cepa no fue capaz de superar o de generar variantes que infecten a tejidos portadores de los genes de resistencia extrema Rx_{acl} o Rx_{adg} . Rozendaal (1966), a partir de una cepa capaz de superar al gen Nx (grupo II) seleccionó una variante con capacidad para superar a los genes de hipersensibilidad Nx y Nb (grupo IV) mediante la inoculación de individuos portadores de estos genes (ver tabla 1.1). Sin embargo, cuando la misma cepa del grupo II se usó como inóculo en genotipos Nb sólo se obtuvieron variantes del grupo III y no del grupo IV, ya que la habilidad para superar la resistencia mediada por el gen Nx se había perdido. Jones (1985) trabajando con varias cepas del grupo II (cp, EX, B y WS2) obtuvo resultados similares; logrando aislar variantes estables con virulencia grupo IV a partir de todas las cepas menos para el PVX WS2. El mismo autor (Jones, 1982), también logró aislar variantes del grupo IV a partir de una cepa del grupo III, PVX DX4 a partir de PVX DX. Sin embargo en este caso, PVX DX4 resultó ser una cepa inestable ya que la virulencia adquirida se perdía en ausencia del gen Nx .

Los estudios epidemiológicos de las áreas de cultivo europeas indican también la alta frecuencia de aparición de cepas virulentas, especialmente del grupo III ya que los cultivares más difundidos en esa área son portadores del gen Nb (Wiersema, 1972; Ross, 1986).

Uno de los aislamientos más significativos fue el que llevó a la identificación de la cepa PVX HB (Moreira et al., 1980). Esta cepa, como ya se mencionó, está presente solamente en muestras provenientes del altiplano Peruano-Boliviano y tiene la capacidad de superar, no sólo la resistencia mediada por los genes Nx y Nb , sino también la mediada por los genes de resistencia extrema Rx .

Los intentos por inducir la selección de mutantes virales capaces de superar a los genes de resistencia extrema Rx han sido infructuosos (Jones, 1985; Cockerham y Davidson, 1963). En paralelo, los trabajos de detección de PVX en muestras de campo de cultivares portadores de genes Rx han sido negativos (Clinch, 1944; Cockerham, 1943, Raleigh, 1936; Jones, 1985) o controvertidos (Tavantzis y Southard, 1983; Goth y Webb, 1985); ya que en estos últimos trabajos no se realizó la identificación de las variantes de PVX presentes en las plantas infectadas, así como tampoco descartaron la mezcla de individuos susceptibles entre las plantas del cultivar resistente.

La facilidad con que se aislan variantes que superan a los genes de reacción hipersensible en contraste con la imposibilidad de detectar variantes que superen a los mecanismos de resistencia extrema Rx puede ser explicada considerando las diferencias en las características de acción que actualmente se conocen. Ambos sistemas inducen de manera cepa-específica una respuesta de resistencia que es inespecífica, es decir que afecta tanto a la cepa de virus que alertó al sistema como a aquellas cepas del virus, e incluso de otros virus, que coinfectaban la planta pero que no eran detectadas por ésta. Sin embargo, ambos sistemas difieren en la eficiencia con que restringen la multiplicación y dispersión del virus. La respuesta hipersensible (HR) produce resistencia a la infección viral, el virus induce la necrosis pero éste no siempre queda confinado al área inicialmente inoculada. En muchos sistemas virus-hospedante, el confinamiento del virus por la zona que se necrosa es una carrera entre la velocidad de replicación y movimiento del virus y la velocidad con que se

produce la HR (Culver et al., 1991; Milne 1966 citado en Lobstein y Gera, 1990). Además, las diferentes cepas avirulentas inducen la HR con distintas eficiencias y la velocidad de respuesta es proporcional a la acumulación del determinante de avirulencia, desencadenante o "elicitador" (corroborado para TMV versus el gen N' de *Nicotiana sylvestris*, Culver et al., 1991).

La resistencia extrema es considerada por varios autores como un mecanismo de hipersensibilidad extrema (Kavanagh et al., 1992; Goulden et al 1993 b; Bagnal, 1961; Benson y Hooker, 1960), es decir que actúa con mayor rapidez, de tal forma que impide completamente la multiplicación de virus en la célula y su movimiento hacia las vecinas. Esta diferencia permite razonar que las variantes virulentas (que no inducen la respuesta de resistencia) que hayan mutado recientemente (y por lo tanto se hallan en una mezcla con otras cepas) tienen alguna posibilidad de dispersarse por la planta cuando la resistencia del hospedante está mediada por una respuesta necrótica, no así frente a un mecanismo de resistencia extrema. Frente a un mecanismo de HR, además, la posibilidad de multiplicación para una variante virulenta dependerá de la velocidad con que el resto de la población avirulenta induzca la HR del hospedante.

Entonces, este planteo podría ser una de las razones que explique la dificultad observada para aislar cepas virulentas frente a los genes de resistencia extrema. Sin embargo, no se puede dejar de considerar que la facilidad de obtención de variantes virulentas puede estar también asociada con la probabilidad de que las mutaciones, en la porción del genoma viral implicada en el reconocimiento por parte del mecanismo de resistencia, conduzca conjuntamente a una forma virulenta y al mantenimiento de la función primaria del gen viral.

El rol de la proteína de cápside en el proceso de infección

La proteína de cápside (CP) de los virus vegetales cumple varias funciones durante el ciclo de infección. La más conocida y común a todos los virus es la función estructural, esto es, el empaquetado y protección del ácido nucleico genómico. Otros roles de la CP como por ej., en la regulación de la replicación, en el movimiento dentro de la planta, o en la inducción de una respuesta de resistencia en el hospedante, son específicos de cada virus y pueden depender de la interacción con el hospedante.

El papel de la proteína de cápside de los virus vegetales en el movimiento por la planta

Para infectar sistémicamente una planta, los virus vegetales deben ser capaces de moverse de célula a célula vía plasmodesmos (movimiento de corta distancia) y a través de los haces vasculares (movimiento de larga distancia) (Hull, 1989). Más detalladamente, luego de haber entrado e colonizado la primera célula, generalmente parenquimática, el virus debe moverse de una célula a otra hasta alcanzar el sistema vascular; luego del desplazamiento por el sistema vascular el virus debe dejar el sistema de conducción para reinfectar una célula parenquimática (Atabekov y Taliany, 1990). La importancia de la CP en estos procesos difiere entre los distintos virus vegetales.

Para el BSMV, miembro tipo de los hordeovirus (Atabekov y Dolja, 1986) el gen de la CP no es necesario para el movimiento sistémico en la cebada, hospedante monocotiledóneo; pero sí es requerido para la infección de las dicotiledóneas *Chenopodium amaranticolor* y *Nicotiana benthamiana* (Petty y Jackson, 1990a). Por lo tanto, es posible que existan requerimientos distintos de la CP para la infección en los dos tipos de huéspedes.

El TRV, el cual tiene un genoma bipartito, es capaz de infectar plantas en ausencia del RNA 2, el cual codifica la CP (Harrison y Robinson, 1986). En este tipo de infección el TRV puede infectar y moverse de célula a célula, pero no puede alcanzar la infección sistémica a través de los haces vasculares, como ocurre cuando ambas partes del genoma están presentes.

Los mutantes de TMV defectivos para la encapsidación son capaces de propagarse en las plantas (Siegel et al., 1962). Los mutantes defectivos para el ensamblaje del virión, aún cuando muestran la capacidad para dispersarse de célula a célula e infectar la hoja inoculada, muestran muy baja dispersión sistémica al resto de la planta (Atabekov y Dorokhov, 1984). Ha sido reportada una mutante de TMV que no produce CP (Sarkar y Smitana, 1981). Las propiedades de esta mutante no han clarificado el rol de la CP, ya que requerimientos mínimos de CP pueden ser necesarios para cumplir otros roles distintos de la encapsidación. Ha sido sugerido que la encapsidación es un requisito necesario para el movimiento de larga distancia a través del tejido conductivo y que la lenta dispersión sistémica observada corresponde a la infección del tejido parenquimático. A partir de los sistemas que permiten la expresión de RNA genómico de TMV a partir de clones de cDNA (Dawson et al, 1986; Meshi et al., 1986) ha sido posible realizar estudios mejor diseñados respecto de los requerimientos de la CP.

Una mutante artificial de la cepa de tomate del TMV, a la cual le falta casi completamente el gen de la CP, infectó al hospedante *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, el cual responde con lesiones locales, produciendo lesiones tan grandes como las producidas para la cepa salvaje (Takamatsu et al., 1987). La inoculación de esta mutante en un hospedante sistémico como *Nicotiana tabacum* cv. Samsun produjo la infección de la hoja inoculada pero no la dispersión sistémica. De estos resultados se sugiere que la CP no fue necesaria para la replicación dentro de la célula o para el movimiento hacia la célula vecina, pero sí lo fue para el movimiento sistémico. Un estudio más extenso de los requerimientos de la CP fue realizado por Dawson et al. (1988) involucrando un amplio rango de mutantes con deleciones en la CP. Todas estas mutantes fueron infectivas en hospedantes hipersensibles, resultando en lesiones similares a las producidas por la cepa salvaje, indicando que estas mutantes no son deficientes para el movimiento célula a célula. Todas las mutantes fueron también infectivas en hospedantes sistémicos, la cantidad de RNA infectivo extraíble de las hojas inoculadas fue similar para todas las mutantes aunque menor que para la cepa salvaje. Esto se puede haber debido a la protección que brinda la CP al RNA durante el proceso de extracción. Infección sistémica en hospedantes sistémicos se observó para todas las mutantes, sin embargo ésta fue errática y más lenta en relación a la cepa salvaje de TMV. Estos resultados confirmaron que el TMV no necesita de la CP para la replicación o para su movimiento hacia las células vecinas, pero sí para moverse eficientemente a través del sistema vascular. La necesidad de la formación del virión fue mostrada por Saito et al., (1990) mutando el origen de ensamblaje, el cual está afuera del gen de la CP (Zimmer y Wilson, 1976), o ciertos aminoácidos en el gen de la CP que llevan a reducir la formación de la partícula viral y alteran la infección sistémica.

Cuando mutantes del bromovirus *cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) que tenían grandes deleciones en el gen de la CP fueron inoculados en plantas de caupí se observó una reducción en la cantidad de RNA viral producido en las hojas inoculadas en relación a la cepa natural, y tampoco se obtuvo infección sistémica (Allison et al., 1990). La cantidad se incrementó desde el primero al cuarto día para luego declinar. Esto contrasta con la no acumulación de RNA en las hojas inoculadas observado en la mutantes con deleciones en el gen 3a que está involucrado en el transporte célula a célula. La inoculación de plantas de cebada con mutantes de BMV a las cuales les faltaba la CP o los 25 primeras aminoácidos y por lo tanto eran incapaces de encapsidarse, no mostraron acumulación de RNA viral en las hojas inoculadas o sistémicas (Sacher y Ahlquist, 1989).

Mutantes del potexvirus del mosaico del trébol blanco (WCIMV) que presentaban deleciones de la región C-terminal no fueron capaces de infectar plantas de caupí pero sí infectaron protoplastos, sugiriendo que la CP está involucrada, directa o indirectamente, en movimiento célula a célula (Forster et al., 1992).

El rol de la proteína de cápside en la acumulación de RNA viral

Contrariando los resultados obtenidos con BSMV en cebada (Petty y Jackson, 1990a) se publicó que mutantes con deleciones o carentes del gen de la CP, fueron incapaces de replicar en protoplastos de maíz

(Joshi et al., 1990). Esta diferencia es presumiblemente debida al hospedante usado, ya que las mismas deleciones no impidieron la infección de plantas de cebada. A pesar del hecho de que las mutantes con deleciones en el gen de la CP pudieron infectar plantas de cebada sistémicamente, las mutaciones tuvieron otros efectos sobre el proceso de infección. Las mutaciones en el gen de la CP redujeron los niveles de acumulación de RNA genómico y de la proteína *hb*, y se necesitó de la producción de la proteína *gb* para infectar toda la planta (Petty y Jackson, 1990a).

Aún cuando las mutantes para el gen de CP de TMV descriptos por Dawson et al. (1988) pudieron infectar las hojas inoculadas y las sistémicas, la CP puede aún ser un determinante importante de la regulación de los niveles de acumulación de gRNA. El virus mutado en el origen de ensamblaje creado por Saito et al. (1990), lo cual impide la encapsidación, mostró niveles reducidos de gRNA y aumentados de sgrRNA, relativos a la cepa salvaje del virus.

Como se mencionó anteriormente, las mutantes de cápside del CCMV podían infectar transitoriamente las plantas de caupí. La molécula de RNA 3, la cual codifica la CP, no es un requerimiento absoluto para la replicación ya que los RNA 1 y 2 son suficientes para la infección de protoplastos (Pacha et al., 1990). Sin embargo, en protoplastos y en ausencia de CP funcional hubo menor acumulación de gRNA que el virus salvaje (Pacha et al., 1990). Esto puede ser debido a la falta de encapsidación y al subsecuente incremento de la degradación del RNA desprotegido.

La importancia de la proteína de cápside del PVX en la regulación del ciclo de infección no ha sido claramente demostrada; sin embargo, existen resultados que indicarían que la presencia de la CP influenciaría la acumulación de los RNAs genómicos y subgenómicos. Los primeros resultados en este sentido provienen del estudio de la infección simultánea de plantas de tabaco con PVX y PVY (Vance, 1991). La acumulación diferencial observada de sgrRNA sugeriría que el sinergismo de la interacción entre estos virus involucra una alteración de la regulación normal de los niveles relativos de las cadenas de RNA de PVX (-) y (+) durante la infección y donde se sugiere que la síntesis de RNA(-) es regulada negativamente por la proteína de cápside.

Chapman et al. (1992b) analizó el efecto de varias mutaciones introducidas al gen de la CP en un clon con el cDNA del PVX completo a partir del cual se pueden obtener transcritos infecciosos. Los resultados mostraron que los cambios en el gen de la CP pueden afectar directa o indirectamente no sólo la morfología del virión, la sintomatología de la planta o la patogenicidad viral, sino también la acumulación en protoplastos de tabaco de los (+)RNA virales sin alterar la cantidad de RNAs(-). Algunas mutantes (d1S y d9S) mostraron también reducción en la acumulación de 0.9kb sgrRNA del cual se traduce la CP. Estos requerimientos de CP para la acumulación de RNA en protoplastos no parecen ser los mismos para papa o tabaco. La infección en tabaco requiere de la presencia de, al menos, algún dominio de la CP intacta (Fig. 4, Chapman et al., 1992b) mientras que en protoplastos de papa la CP puede estar ausente (Fig. 3, Khöm et al., 1993). En otro trabajo (Chapman et al., 1992a) se sustituyó el gen de la cápside por el gen marcador GUS (*Escherichia coli* β -glucuronidase). Esta construcción replicó pobremente en protoplastos y no se dispersó del sitio de inoculación en plantas, lo cual sugiere que la CP cumple un rol fundamental en el ciclo de infección viral.

Para otro miembro de los potexvirus, el WCIMV, se observó que aún deleciones parciales de la región C-terminal de la CP producen, en protoplastos de caupí, reducciones en la acumulación del gRNA pero no de los sgrRNAs (Forster et al., 1992)

La proteína de cápside del PVX como disparador de los mecanismos de resistencia mediado por los genes *Rx* o *Nx*

Las plantas son resistentes a un patógeno específico o a una cepa de un patógeno cuando el patógeno tiene un componente el cual es directamente inhibido por la planta, o el cual induce un proceso de defensa en la

planta. Genéticamente, esta interacción es definida como la interacción de un gen de avirulencia (avr) del patógeno y un gen de resistencia (R) en el hospedante.

En los sistemas virales, el análisis de los determinantes de avr ha sido mediante la identificación de factores virales asociados a la ruptura de la resistencia. Para el virus del mosaico del tabaco (TMV), cada uno de los genes virales han sido asociados con la ruptura de resistencia conferida por genes del hospedante. Mutaciones diferentes en el gen de la replicasa viral afectan la resistencia conferida por el gen Tm1 de tomate (Meshi et al., 1988) y el gen N de tabaco (Padgett y Beachy, 1993). Cambios en el gen de la proteína del movimiento pueden afectar la resistencia mediada por el gen Tm2 (Meshi et al., 1989). La proteína de cápside de ciertas cepas de TMV interactúan con la resistencia del gen N' de tabaco (Saito et al., 1987; Knorr y Dawson, 1988).

En el PVX, el gen de la proteína de cápside afecta la habilidad de una cepa para superar a los genes de resistencia *Nx* y *Rx* en papa (Kavanagh et al., 1992). En un clon de cDNA conteniendo el genoma completo de la cepa UK3 (grupo de virulencia III) se intercambiaron el gen de la CP de esta cepa por la de la cepa HB (cepa que supera la resistencia mediada por los genes *Nx*, *Nb* y *Rx*). Los transcriptos *in vitro* del clon con la CP del PVX HB infectaron genotipos portadores de los genes *Nx* y *Rx*, mientras que los provenientes del cDNA de UK3 sólo infectaron hospedantes sin estos genes. Esto muestra que, para estas cepas de PVX, el gen de la proteína de cápside es el determinante de virulencia en relación con los genes *Nx* y *Rx*. La habilidad de PVX mutantes con el marco de lectura corrido para el gen la CP para infectar genotipos portadores de los genes *Nx* o *Rx* indicaría que la determinación del fenotipo avirulento sería un efecto mediado por la proteína más que por el RNA viral (Köhm et al., 1993). Estos también muestran que la CP del PVX HB no actúa como un activo supresor de la resistencia, sino que es una característica pasiva de la CP.

En estudios posteriores, con clones de cDNA de los genomas completos de las cepas CP4 y HB y de los cuales se podían obtener transcriptos infectivos *in vitro* se intercambiaron porciones del gen de la CP entre las cepas y se introdujeron cambios individuales de aminoácidos en las CPs. Estos mostraron que la presencia de una treonina (Thr) en la posición 121 (codón 122 para las cepas no andinas, PVX⁰) es un determinante principal de avirulencia frente al gen *Rx* (Goulden et al., 1993a). PVX HB es la única cepa de las secuenciadas hasta el momento (Skryabin et al., 1988; Huisman et al., 1988; Orman et al., 1990; Kavanagh et al., 1992) que no presenta una Thr en el codón 121 sino que presenta una lisina (Lys). Conclusiones similares referidas al codón 121 de la CP del PVX HB fueron obtenidas por Querci et al., (1993a) mediante alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos (aa) de las CP de 4 cepas de PVX. De esta forma se identificaron 8 aa únicos de la cepa HB para los cuales, por computadora, se estudiaron distintas mutaciones y su influencia en la estructura secundaria de la proteína.

A pesar de que sólo las cepas con Thr en la posición 121 de la CP inducen la respuesta mediada por el gen *Rx*, distintas evidencias muestran que otras partes de la cápside estarían implicadas en la inducción de la resistencia. La diferente susceptibilidad a la resistencia del gen *Rx* en protoplastos pero no *in planta* mostrada por algunas mutantes indicaría que una Lys en el codón 127 (codón 128 en las cepas no andinas) actuaría como determinante de avirulencia secundario frente al gen *Rx* (Goulden et al., 1993a). La cepa HB presenta una arginina en esta posición. Parece también probable que las regiones 1-53 y 140-236 influyen la interacción (Goulden et al., 1993a). Similarmente, la delección de los codones 140 al 183 convierten a un aislamiento avirulento en virulento frente al gen *Rx* (Goulden et al., 1993a).

Estos experimentos no permiten concluir que la cápside sea el único componente viral que interactúa con el producto del gen *Rx*, aunque Köhm y Baulcombe han establecido que la resistencia mediada por este gen es también efectiva en protoplastos de papa con mutantes de PVX que no expresan ninguno de los productos del bloque triple (ORFs 2, 3 y 4) y que estaría involucrados en el movimiento de célula a célula (Beck et al., 1991). Algunos de los clones recombinantes producidos por Goulden et al. (1993) fueron utilizados por Querci (1993b) para probar la habilidad de éstos para superar los efectos de los genes de resistencia extrema originados en distintas especies silvestres de *Solanum*. Los resultados de ese trabajo muestran que la virulencia del virus contra los genes probados (*Rx*, *Rx_{acl}*, *Rx_{adg}*, *Rx_{cha}*, *Rx_{cur}*, *Rx_{juz}* y *Rx_{vn}*) está también determinada por

los aminoácidos situados en las posiciones 121 y 127 de la CP del HB. Por lo tanto el mecanismo de reconocimiento parece ser el mismo para todos estos genes considerados. (la base genética de la resistencia extrema mediada por Rx_{cha} , Rx_{cur} , Rx_{juz} y Rx_{vn} no ha sido completamente determinada). La misma autora (Querci, 1993b) analizó el comportamiento de las cepas recombinantes frente a la resistencia a PVX HB detectada en *S. sucrense* (genotipo OCH 11926) (Brown et al., 1984). Como había sido reportado, las cepas parentales CP4 y HB no infectaron a *S. sucrense*, pero interesantemente los recombinantes sí lo hicieron. Esto es, cuando la CP de CP4 reemplazó la CP en el genoma de HB y, recíprocamente, cuando la CP de HB sustituyó a la CP del genoma de CP4 la resistencia fue superada. El mecanismo de acción del gen de resistencia hallado en *S. sucrense* aún no ha sido definido, pero los resultados sugieren que en este caso la resistencia o susceptibilidad no está determinada por la interacción con un único determinante en la cápside, sino que habría por lo menos un segundo determinante hacia la región 5' del gen de la CP. La treonina 121 de la cápside está también involucrada en la inducción de la lesión necrótica (NL) que las cepas de PVX (pero no PVX HB) producen en *Gomphrena globosa* (Goulden y Baulcombe, 1993b). Un determinante adicional fue localizado en la cepa PVX CP4 en relación a la inducción de la necrosis en *G. globosa*; la misma estaría situada entre los nucleótidos 4243 y 4500, los cuales comprenden los últimos 70 aa de la proteína replicasa (ORF1) y la región no codificante entre los ORFs 1 y 2 (Goulden y Baulcombe, 1993b).

El análisis del gen de la CP de las cepas de PVX DX y DX4 (grupo de virulencia III y IV, respectivamente) mostró que la sustitución de un sólo nucleótido en este gen fue suficiente para convertir una cepa avirulenta al gen Nx (grupo III) en virulenta (grupo IV). La mutación identificada en el gen de la CP de DX4 resultó en la sustitución de una glutamina en la posición 78 por una prolina (Santa Cruz y Baulcombe, 1993).

Los mismos autores comprobaron que una segunda mutación en la CP de DX4, el cambio de la isoleucina 62 por una valina, revertía a cepa avirulenta (DX4-62) la propiedad virulenta de la cepa progenitora (DX4). Por otro lado, otro aislamiento (DX-76) pero hecho a partir de la cepa DX mostró que la sustitución de la metionina 76 por isoleucina induce en los genotipos Nx sólo la necrosis en hojas pero no la apical (Santa Cruz y Baulcombe, 1993). Estos resultados sugieren que en los genotipos Nx el reconocimiento de una cepa avirulenta está determinado por una característica estructural de la CP que es modificada o enmascarada en la CP de las cepas virulentas.

La inducción de la resistencia mediada por el gen de hipersensibilidad Nb está determinada por secuencia viral distinta de la proteína de cápside (A. Forsyth, comunicación personal citada por Santa Cruz y Baulcombe, 1993). Sin embargo, las cepas DX4, DX-76 y DX4-62 indujeron en plantas $NxNb$ síntomas distintos de aquellos inducidos en plantas Nx . Varias publicaciones han reportado previamente que existe un sinergismo mutuo y recíproco de la resistencia mediada por ambos genes Nx y Nb , lo cual, teniendo en cuenta los nuevos conocimientos referidos a los determinantes de avirulencia, sugeriría que el producto del gen Nb podría afectar la expresión de la resistencia mediada por el gen Nx en un paso metabólico posterior al evento de reconocimiento inicial.

En resumen, en la proteína de cápside del PVX se ubican varios y distintos determinantes de avirulencia los cuales son detectados por algunos de los genes de reacción del hospedante (genes Rx y Nx), y la inducción de lesiones necróticas en *G. globosa*. Sin embargo, estos determinantes no serían los únicos, sino que otras secuencias fuera del gen de la CP interaccionarían con estos sitios. También han sido localizados determinantes en otras regiones del genoma distinta del gen de la CP y que son reconocidos por otros mecanismos de resistencia o reacción (el mediado por el gen Nb , el presente en *S. sucrense*), y en las lesiones necróticas de *G. globosa*.

Estudios previos de la CP de PVX

El PVX fue identificado como agente etiológico del mosaico latente de la papa, y denominado como virus X de la papa en 1931 por Smith. Desde es momento un gran esfuerzo fue puesto en su caracterización fisico-química, convirtiéndose junto con el TMV en uno de los primeros virus modelo de estudio. Datos referidos a su composición química, constantes físicas y aspecto al microscopio electrónico fueron publicados en los años sucesivos (Bawden y Pirie, 1936; Takahashi y Rawlins, 1946; Reichmann, M.E. 1958, 1959 y 1960).

De acuerdo a las posibilidades técnicas de época, la proteína de cápside fue estudiada exhaustivamente en relación a la determinación de su tamaño, su composición aminoacídica, su susceptibilidad a distintas enzimas y sus productos de degradación (Bawden y Kleczkowski, 1947, 1959; Goodman, 1975a, 1975b, 1977; Homer y Dalton, 1976; Koenig et al., 1970; Miki y Knight, 1968; Shaw et al., 1962; Takashi y Knight, 1968; Tremaine y Agrawal, 1972; Tung y Knight, 1972; Wilson y Tollin, 1969). Las propiedades serológicas de la CP fueron también objeto de numerosos trabajos (Shalla y Shepard, 1970; Shepard y Secor, 1972; Shepard y Shalla, 1970; Shepard y Shalla, 1972.).

La conformación de las subunidades de la cápside y su empaquetamiento en la partícula viral fueron estudiadas usando anticuerpos policlonales (Rich, 1983) y monoclonales (Torrance et al, 1986; Koenig y Torrance, 1986; Sóber et al., 1988) y también recientemente por planigrafía con tritio (Baratova et al., 1992a,b). Los resultados de este último estudio muestran que la región amino terminal es la más accesible a los átomos de tritio de la proteína intacta. La región carboxi terminal es prácticamente inaccesible en la partícula de virus intacta, pero es alcanzada por los átomos de tritio cuando la región N-terminal es degradada. Estos resultados sustentan un modelo espacial de la CP en el virión, en el cual los aa N-terminales están expuestos en la superficie de la partícula, mientras que los aa C-terminales se hallan dentro de la partícula, cubiertos por los primeros.

Como se mencionó, la secuencia de RNA del gen de la CP ha sido publicada para 6 cepas distintas de PVX (cepas cp, CP4, HB, S, X3, UK3) (Skryabin et al., 1988; Huisman et al., 1988; Orman et al., 1990, Kavanagh et al., 1992; Goulden et al., 1993). Para todas las cepas los genes de la CP tienen una longitud muy similar (708 ó 711 nucleótidos) y codifican para polipéptidos de una masa muy cercana a los 25 kDa. Las secuencias del gen de la CP de las cepas CP4 y HB presentan una homología a nivel de aa comparadas con la cepa cp del 99.2 y 96.2%, respectivamente. Sin embargo, el peso molecular aparente de las CP de estas cepas determinado en SDS-PAGE muestra claras diferencias entre las cepas, por ej. las cepas cp, CP4 y HB presentan peso moleculares aparentes de 27.0, 28.0 y 28.7 kDa respectivamente. Koenig (1972) y Koenig et al. (1978) informaron que la CP intacta del PVX presenta una migración anómala en los geles de SDS, mientras que algunos de sus productos de degradación migran normalmente. La migración anómala fue explicada por una adsorción subnormal de SDS a la región hidrofílica N-terminal (aa 1 a 24) de la proteína. Sin embargo, dentro de los primeros 50 aa, no hay diferencias entre las cepas cp y CP4 y sólo uno entre las cepas cp y HB; por lo tanto las diferencias en su estructura primaria de sus regiones N-terminales no permiten suponer diferencias de adsorción de SDS por las CPs de estas cepas que justifiquen las diferencias en su migración. Es sabido que las modificaciones post-traduccionales a la cadena polipeptídica, como la glicosilación, tienen un impacto significativo sobre el peso molecular aparente observado en SDS-PAGE (Pitt-Rivers y Ambesi Impiobato, 1968; Sambrook et al., 1989).

Con estos antecedentes, una vez identificada la cepa MS como una cepa de virulencia extrema, el presente trabajo se orientó hacia el análisis del genoma en un intento por identificar los determinantes de virulencia y hacia el estudio de la proteína de cápside para tratar de establecer la presencia en ella de modificaciones post-traduccionales.

Materiales y métodos

Sección 2

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Distintos cultivares comerciales de papa fueron usados como genotipos indicadores en los distintos ensayos; estos fueron:

Serrana INTA: presenta extrema resistencia al PVX por ser portador del gen Rx_{acl} (Huarte et al., 1986).

Atlantic: es portador del gen de resistencia extrema Rx_{adg} (Webb et al. 1978).

King Edward: portador del gen Nx que determina una respuesta hipersensible frente a la infección por los virus del grupo III y IV de Cockerham (1955)

Maris Piper: presenta los genes Nx y Nb , por lo tanto reacciona de forma hipersensible con las razas de los grupos I, II y III. Es infectada por las razas del grupo IV y por las razas del patotipo HB.

El clon de *Solanum acaule* PI 175395 (PI: *plant introduction number* del banco de germoplasma de Winsconsin, USA), el cual presentan resistencia extrema al PVX; muy posiblemente por ser portador del gen Rx_{acl} (Huarte et al., 1986; Saladrigas et al., 1990).

Maris Bard, Huinkul MAG y Spunta: no son portadores de genes de resistencia conocidos y fueron usados como controles susceptible en los distintos ensayos.

Plantas de *Nicotiana tabacum* fueron usadas para multiplicar las distintas razas de PVX.

Razas de PVX

Hojas de tabaco infectadas con las distintas razas de PVX fueron usadas como inóculo original y fueron conservadas a -80 oC. La multiplicación del virus se realizó en plantas de *Nicotiana tabacum* crecidas en condiciones de aislamiento dentro de invernáculo y purificadas según Orman et al. (1990). Las razas de PVX utilizadas en el presente trabajo fueron PVX cp; HB y MS.

PVX cp, también denominado PVX c o PVX cp2, pertenece al grupo de virulencia II de Cockerham (1955) y al patotipo I de Fernández-Northcote (1990). Esto significa que supera al gen Nx , pero no a los genes Nb o Rx . Es un aislamiento peruano (Fribourg, 1975; Jones, 1985; Moreira, 1980), y no es usualmente hallado en Europa o USA (Ross, 1986). La CP del PVX cp es reconocida por el anticuerpo monoclonal Mab 67 (Torrance et al., 1986), por lo tanto, pertenece al Serotipo PVX^A (andino). Los serotipos PVX^A han sido sólo localizados en en el altiplano peruano-boliviano (Fernández-Northcote y Lizárraga, 1991). Su secuencia nucleotídica ha sido reciente determinada (Orman et al., 1990).

PVX HB, es un aislamiento boliviano que supera a los genes de respuesta hipersensible Nx , Nb y ya que también supera al gen de resistencia extrema Rx (Moreira et al., 1980) no es un aislamiento típico del grupo IV de virulencia de Cockerham. Por su capacidad para superar a los genes de resistencia extrema Rx , pertenece al patotipo HB definido por Fernández-Northcote (1990). Al igual que el PVX cp, el HB pertenece al serotipo andino PVX^A.

PVX MS, al igual que la raza HB, supera la resistencia conferida por los genes Nx , Nb y Rx (Tozzini et al., 1994 y esta tesis). La proteína de cápside del PVX MS no reacciona inmunológicamente con el Mab 67, por lo tanto, pertenece al serotipo PVX^o (común o de distribución mundial) definido por Fernández-Northcote y

Lizárraga (1991). La Tabla 2.1 resume las distintas clasificaciones de las razas del PVX. En el cuerpo de esta se muestra las razas usadas o mencionadas en el presente trabajo.

Tabla 2.1: Clasificación de las razas de PVX usadas según grupos de virulencia (Cockerham, 1955); Patotipos (Fernández-Northcote, 1990) y Serotipos (Fernández-Northcote y Lizárraga, 1991).

	Grupo de virulencia	Serotipo	
		PVX ^O	PVX ^A
Patotipo I	I	CS35	
	II		cp
	III	DX	
	IV		cp4
Patotipo HB		MS	HB

Cultivo de las plantas micropropagadas

Las condiciones de crecimiento fueron 16/8 hs (día/noche) de fotoperíodo, a 22 °C con una intensidad de luz de 6000 lux/cm² (tubos fluorescentes Phillips, TLD 36W 54DL8). Las plantas fueron micropropagadas en tubos de borosilicato de 2 cm de diámetro conteniendo 10 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog completo, Sigma, USA).

Inoculación mecánica

Para la inoculación mecánica de plantas micropropagadas se siguió el protocolo desarrollado por Tozzini et al. (1991). Las plantas seleccionadas para ser inoculadas mecánicamente fueron plantas de 10 días desde la micropropagación, con dos o tres nudos y que estuvieran recién comenzando a desarrollar raíces. Antes de la inoculación 0.09 ml de una suspensión de nistatina (2 ng/ml, 50% etanol) fue agregado sobre el medio de cultivo para controlar la contaminación fúngica derivada del inóculo viral, el cual no fue preparado en condiciones de esterilidad. El inóculo fue preparado macerando hojas de tabaco infectadas en un mortero en presencia de buffer de extracción viral (8g/l NaCl, 0.2 g/l KH₂PO₄, 2.9 g/l Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g/l KCl y 20g/l polivinilpirrolidona (PVP) 10000, pH 7.4), a razón de 10 ml/g de hoja. La suspensión fue centrifugada brevemente (5000 rpm, 5 minutos) y el inóculo preparado a partir del sobrenadante más el agregado de 150 mg/ml de carborundum. Este inóculo, el cual tuvo una concentración de PVX de 0.5 a 3 mg/ml (estimado por ELISA), fue aplicado a las hojas con un isopo de algodón.

Detección inmunológica - ELISA

El análisis mediante ELISA fue desarrollado como se explica en Hopp et al. (1991). Las muestras de hojas fueron homogeneizadas dentro de microtubos de polipropileno de 1.5 ml (Eppendorf) en presencia de 7 ml/g

de buffer de extracción viral y con ayuda de un microémbolo plástico giratorio. Las muestras así procesadas fueron almacenadas a -20 °C hasta que se necesitaran. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas, mezcladas y clarificadas mediante una breve centrifugación (5000 rpm, 5 min). Los ensayos inmunológicos fueron hechos en micropelículas (Nunc *Immunoplates* I, Dinamamrca) usando un espectrofotómetro de 8 canales automático Titertek Multiscan MC (Flow Laboratory). Se realizaron ELISA doble sandwich utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína de cápside siguiendo las indicaciones del proveedor (Boehringer Mannheim, Alemania). En cada placa se construyó una curva de calibración aplicando distintas diluciones de virus purificado en un rango de 0 a 4000 ng por cavidad. La raza de virus purificado correspondió a la raza del virus que se quería cuantificar en las diferentes muestras.

SDS-PAGE y análisis inmunológico (*western blotting*)

Los SDS-PAGE fueron realizados siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Los marcadores de peso molecular fueron de Sigma (MW-SDS-70L kit, St. Louis, MO), el peso molecular aparente fue calculado por interpolación lineal entre los marcadores: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa) e inhibidor de tripsina (20.1 kDa). En los análisis por western, se realizó la electrotransferencia de las proteínas y luego fueron visualizadas mediante la tinción de Rojo Ponceau; en esta instancia se marcaron los marcadores de peso molecular utilizando tinta común o radiactiva (S^{35}) según el caso. Se usó un anticuerpo policlonal de cabra contra la CP de PVX y conjugado con AP (Boehringer-Mannheim, FRG) en una dilución 1:150-300 según el protocolo del fabricante. La tinción de proteínas con plata o con coomasie fueron realizadas siguiendo los protocolos detallados en Sambrook et al. (1989).

Secuenciación del genoma de PVX MS

RNA viral

El genoma de PVX MS fue secuenciado directamente a partir del RNA viral, de esta forma toda la variación o polimorfismo en la secuencia y presente en la población fue incluida en el resultado. Se prepararon varios cDNA mediante el uso de la transcriptasa reversa aviar (Promega, USA) siguiendo el protocolo estándar (síntesis de 45 min a 37°C) recomendado por el fabricante. El RNA viral tuvo distintos orígenes (virus multiplicado en plantas de tabaco o en plantas de papa cv. Serrana INTA) y diferentes grados de purificación (RNA obtenido a partir de virus purificado o RNA total de planta infectada).

cDNAs

Los cDNAs fueron iniciados en su mayoría con oligo-dT, sin embargo también se iniciaron algunos a partir de *primers* negativos internos en el genoma. La longitud de los cDNAs obtenidos a partir de oligo-dT fueron estimados por su capacidad para permitir la amplificación de tres regiones, una próxima al extremo 5', otra en el centro y otra cercana al extremo 3'. La mayoría de los cDNA permitieron la amplificación de las tres regiones, mostrando que el cDNA correspondiente era una copia completa o casi completa del genoma de PVX.

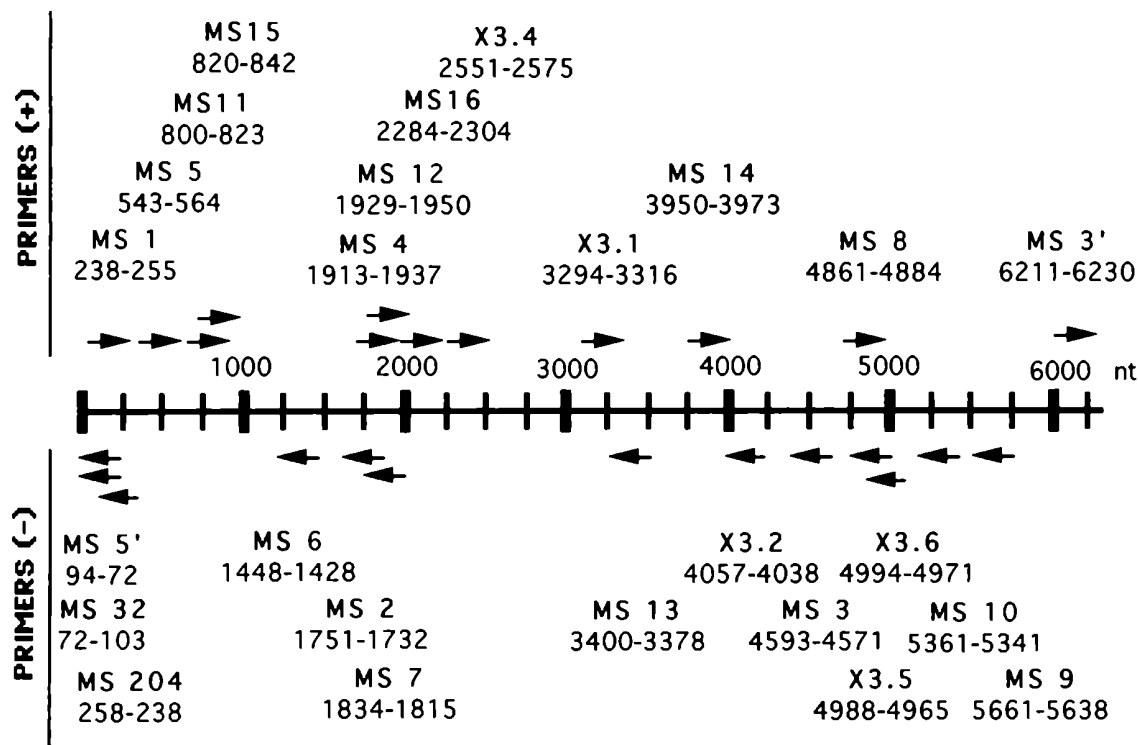
Los extremos del virus fueron convertidos a cDNA mediante la utilización de los sistemas 5' y 3' RACE de Gibco BRL. El oligo-dT no es un buen primer en una reacción de PCR, no permitiendo la amplificación eficiente del fragmento comprendido entre la cola de poli-A viral y algún otro primer próximo e interno en el

genoma. El sistema 3' RACE inicia el cDNA con un primer de 17 timidinas seguidas en el extremo 5' de una secuencia ricas en GCs, de forma tal que las siguientes amplificaciones de PCR se puede realizar utilizando un primer complementario a esta región ricas en GCs. Por otro lado, el extremo 5' presenta una secuencia incógnita a determinar por lo tanto no es posible diseñar un oligo. La estrategia del sistema 5' RACE es la de realizar un cDNA iniciado con un primer interno y dirigido hacia el extremo 5' del genoma, este cDNA que contiene el extremo 5' es luego extendido con una secuencia de poli-C utilizando la enzima transferasa terminal. Este agregado permite entonces realizar las reacciones de PCR utilizando el primer interno utilizado para iniciar el cDNA y un primer de poli-G.

Primers de PCR

Se diseñaron primers sobre el genoma de PVX X3 (cuando no se tenía información de la cepa MS en esa zona) o sobre las secuencias ya conocidas de PVX MS para amplificar distintos segmentos superpuestos a lo largo de todo el genoma. Los oligos fueron sintetizados por Universal DNA (USA). La Fig 2.1. muestra la disposición sobre el genoma de PVX del total de los primers utilizados. Los prefijos MS o X3 indican el origen de la secuencia genómica utilizada como base para el diseño del oligo, los números debajo del nombre indican la posición complementaria en el genoma.

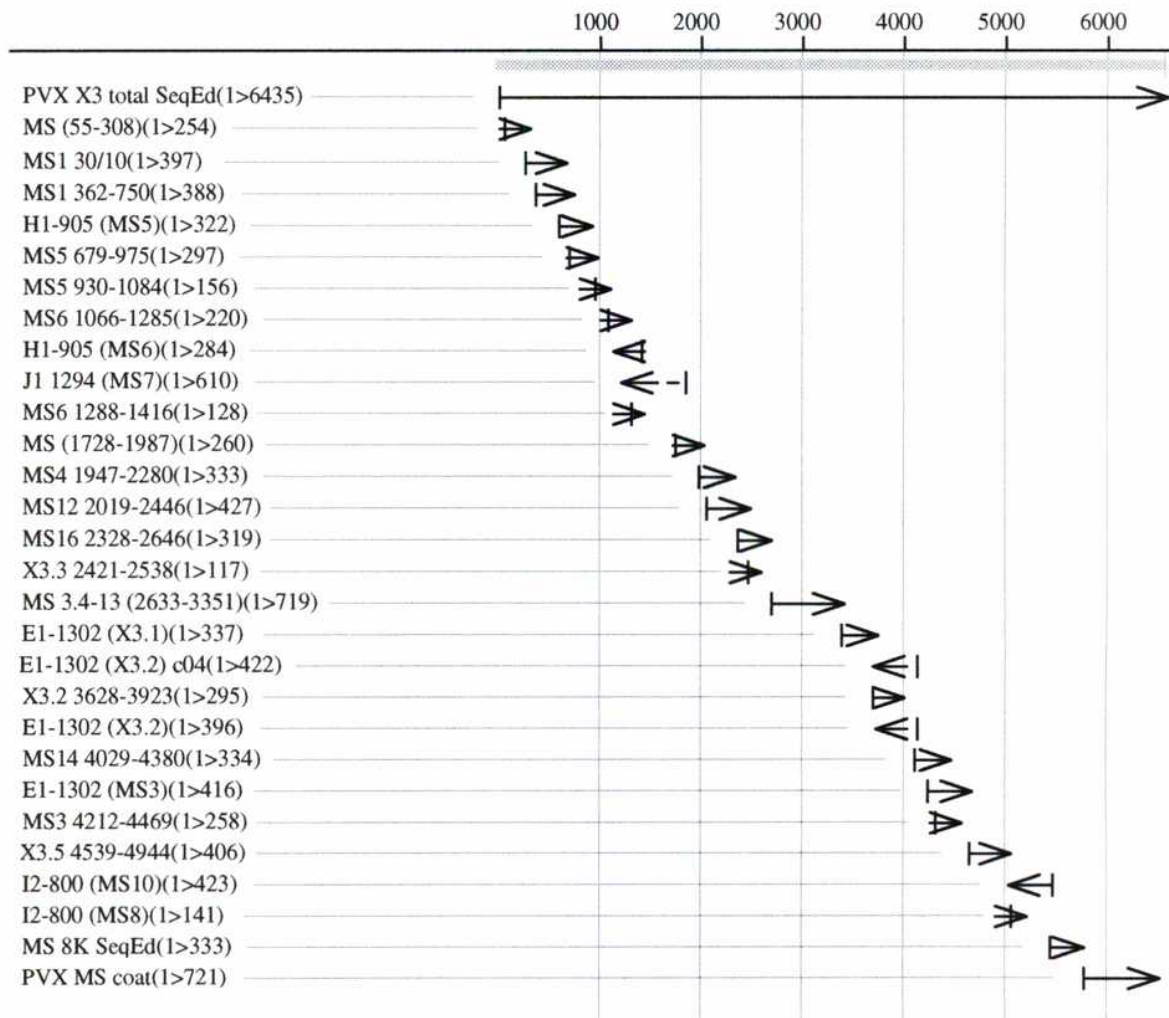
Fig 2.1: Ubicación en el genoma de PVX de los primers utilizados para amplificar y secuenciar distintos segmentos virales. El prefijo X3 o MS indican el genoma de la cepa sobre la cual fue diseñado, mientras que los números muestran la posición de los mismos.



Reacciones de secuenciación

La secuenciación fue hecha sobre los distintos productos de PCR purificados. Para ésto, se aisló el DNA luego de una electroforesis en gel de agarosa y se lo extrajo mediante el sistema de purificación GeneClean (Bio 101) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para secuenciar cada una de las cadenas se usaron los mismo primers que fueran utilizados para su amplificación. La reacciones fueron hechas usando el sistema femtomol de Promega y la marcación se hizo con S^{35} a-dATP, siempre siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron resueltos en geles desnaturalizantes con urea siguiendo el protocolo estandar. Se realizaron hasta tres descargas o siembras lográndose leer, entre las tres, desde 20-50 bases del primer hasta 400-500 bases de éste. La exposición del gel se realizó sobre film Bio-Max de Kodak por tiempos que variaron desde 20 a 72 hs. La fig 2.2 muestra el alineamiento de las distintas lecturas hechas sobre el genoma de PVX MS con respecto a la secuencia de la cepa X3. Cada una de estas secuencias ingresadas es el resultado de dos o tres descargas en uno o más geles. Por lo tanto, cada una de las bases ha sido leída al menos dos veces.

Figura 2.2: Alineamiento de los distintos fragmentos de secuencias de PVX MS obtenidos a partir de los primers diseñados.



Densidad de carga

Este método predice regiones de carga positiva o negativa a través del promedio de la carga de cada aminoácido en un segmento de longitud especificado. Este algoritmo produce un gráfico de carga promedio para cada aminoácido el cual es transformado en regiones positivas o negativas mediante la determinación de dos umbrales de corte (uno positivo y otro negativo). La carga de cada aminoácido se asigna usando la tablas de pK de White, Handler y Smith (1964). Los parámetros de este método fueron fijados en los siguientes valores: largo del segmento a promediar = 9 aa; pH = 7; Región positiva = carga mayor a 0.1; y región negativa = carga menor a -0.1.

Estructura secundaria según Chou-Fasman (1978)

Este algoritmo predice estructura secundaria a partir de una aproximación estadística del tema. Analizando la estructura cristalográfica de 64 proteínas se estableció la probabilidad frecuencial para cada aminoácido de participar en una estructura de tipo α -hélice, o β -hoja, o β -turn. El principio de este algoritmo utiliza estos datos estadísticos como parámetros conformacionales y determina regiones donde se nuclean aa con alta probabilidad de participar en una o otra estructura. Las regiones finalizan cuando se inicia una zona donde se observa una mayor disposición a alternar de estructura. La regiones de turn son aquellas que no muestran predisposición a ser ni α -hélice ni β -hoja. Los parámetros de este análisis fueron: umbral de región alfa = 103 y umbral de región beta = 105, ambos son los propuestos por los autores.

Estructura secundaria según Garnier y Robson (1978)

Este algoritmo predice estructura secundaria de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Mediante una aproximación estadística basada an las estructura cristalográfica de proteína conocidas, específicamente a los ángulos dihedrales ϕ y ψ (C'-N-C-C'-N) y a las uniones puente de hidrógeno para definir regiones como α -hélice, β -hoja extendida, β -turn y coil. Este método examina la probabilidad de un dado residuo a participar en una determinada estructura. Antes de asignar a este residuo la conformación más probable, los 16 aa (8 a la izq y 8 a la der) del entorno son analizados. Si éstos también favorecen una estructura específica entonces el residuo original será asignado a esta estructura. Si no fuera así, éste será reevaluado para otra clase conformacional. El único parámetro de este algoritmo es una constante de decisión para asignar las estructuras, de las alternativas posibles se utilizó la opción en la que el programa calcula la constante en función de la secuencia de la proteína.

Hidrofilicidad según Hopp-Woods (1981)

En este método cada residuo tiene asignando un valor de hidrofilicidad de acuerdo a la tabla de Levit (1976). El promedio de 7 aa contiguos es graficado en cada posición y los picos que superan un valor umbral son visualizados como regiones hidrofílicas

Flexibilidad según Karplus (1985)

Este algoritmo permite estimar la flexibilidad de la cadena de aa. Los autores en base a 31 estructuras de proteínas bien resueltas clasificaron a los aa como rígidos o flexibles. Entre los rígidos (valor-B menor a 1) se encuentran A, L, H, V, Y, I, F, C, W y M. El parámetro a fijar es el umbral de flexibilidad, el cual puede variar de 0 a 2, siendo este último valor el de máxima flexibilidad. En el presente análisis se utilizó el valor de 1 el cual es el valor estandar sugerido por los autores.

Hidropatía según Kyte-Doolittle (1982)

Este método predice la hidropatía regional de una proteína a partir de su secuencia de aa. La hidropatía es definida como la afinidad por el agua, cuando ésta es positiva significa que es hidrofílica e hidrofóbica cuando ésta es negativa. Los valores de hidropatía son definidos para cada aa y luego son promediados en un segmento de largo definido por el usuario. El promedio es graficado en el punto medio del segmento. En este análisis se utilizó un segmento de 9 aa (recomendado por los autores).

Cálculo de la similitud y divergencia de las secuencia

El porcentaje de divergencia es calculado por comparación del par de secuencias en relación con el árbol filogenético construido, mientras que el porcentaje de similitud compara las secuencias directamente, sin considerar la relación filogenética; según las siguientes fórmulas:

$$\text{Divergencia porcentual (i,j)} = \frac{100 \times \text{distancia filogenética (i,j)}}{\text{distancia filogenética total del árbol}}$$

$$\text{Similitud porcentual (i,j)} = \frac{100 \times \text{suma de coincidencias (i,j)}}{\text{largo} - \text{residuos gap (i)} - \text{residuos gap (j)}}$$

Análisis de las modificaciones post-traduccionales de la cápside

Purificación de la proteína de cápside a partir de virus purificado

La purificación de la proteína de cápside de las diferentes cepas de PVX fue realizada siguiendo los lineamientos del método de Fraenkel-Conrat (1957). Dos volúmenes de ácido acético glacial fueron agregados a virión purificado diluido en 100 µl de agua. El RNA insoluble fue removido después de 1 hr de incubación en hielo por centrifugación en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. El líquido sobrenadante fue dializado ON en agua y el producto dializado fue dividido en dos alícuotas y liofilizado por 24 hr a 50 mTorr.

DetECCIÓN DE RESIDUOS DE AZÚCAR EN PROTEÍNAS

Para detectar carbohidratos asociados a proteínas se usó el Glyco Trak Kit (Oxford GlycoSystems, UK). Las muestras de proteínas (1 µg) fueron oxidadas con periodato para generar grupos aldehídos a partir de los residuos de azúcar. Luego, los aldehídos fueron reaccionados con hidrazina biotilada. Los productos biotilados fueron adsorbidos (*spotted*) sobre una membrana de nitrocelulosa y detectados por reacción con un conjugado de streptoavidina-AP.

La presencia de ácido siálico fue detectada de manera similar pero las condiciones de oxidación fueron más suaves (ác. periódico 0.1%, 20 min a 0°C en oscuridad, GlycoTrak kit, Oxford GlycoSystem). Fetuina y ovoalbúmina fueron usados como controles positivos mientras que seroalbúmina bovina (BSA) fue usada como control negativo.

DEGLICOSILACIÓN QUÍMICA DE LA CP

La deglicosilación química fue hecha usando el Glycofree deglycosilation kit (Oxford GlycoSystems) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. El método está basado en el uso de ácido trifluorometanosulfónico anhidro (TFMS) sobre una muestra proteica completamente anhidra y a muy baja temperatura (en un baño de hielo seco/etanol). Fetuina, ovoalbúmina y BSA fueron los controles del tratamiento. La cantidad de proteína tratada varió de 1.6 a 2 µg por muestra.

DEGLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA CP

Tres glicosidasas de Boehringer-Mannheim fueron usadas (Endoglicosidasa H (Endo H, EC 3.2.1.96) que hidroliza preferencialmente N-glicanos de tipo de alta manosa (Trimble y Maley, 1984). N-glicosidasa F (PNGase F, EC 3.2.2.18; EC 3.5.1.52) que hidroliza glicanos de alta manosa y oligosacáridos bi-, tri-, y tetracatenarios liberando por un péptido intacto libre de azúcar (Tarentino et al., 1985). O-Glicosidasa (EC 3.2.1.97) tiene una especificidad estricta por la estructura $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNacl} \rightarrow \text{Ser} / \text{Thr}$. Si este disacárido se halla sustituido (por ej. con ácido siálico, fucosa, etc) la O-glicosidasa libera el residuo azucarado de la proteína (Endo y Kobata, 1976). Las muestras de CP purificado de las diferentes cepas fueron tratadas con cada una de las enzimas por separado y también en incubaciones con las tres enzimas al mismo tiempo. Las muestras de proteínas (25 µg, 1 mg/ml) fueron hervidas con 30 µg de SDS (1% de concentración final) durante 2 min. Luego, fueron diluidas al décimo con buffer fosfato de sodio (30 mM concentración final, pH=7). Finalmente, y antes de adicionar las enzimas, se agregó 5 µg de BSA y Tritón X-100 hasta concentración final 1%. Las enzimas se utilizaron en las siguientes concentraciones: Endo H, 150 mU/ml; PNGase F, 20 U/ml; y O-glicosidase, 40 mU/ml. Los controles positivos fueron: ovoalbúmina (Sigma) para la enzima Endo H, asialofetuin (Tipo II de suero fetal de vaca, Sigma) para las enzimas PNGase F y O-glicosidasa. La BSA, incluida en la reacción para protección de las enzimas de los detergentes, fue aprovechada como control negativo. Las incubaciones fueron hechas a 37°C por 20 hr.

El efecto o no de las enzimas sobre los sustratos fue evaluado mediante SDS-PAGE seguido de tinción con plata o detección inmunológica. Una más rápida migración de las proteínas tratadas se interpreta como una deglicosilación de las mismas por parte de las enzimas.

CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA DE CÁPSIDE MEDIANTE LECTINAS

Se incubaron con lectinas conjugadas con digoxigenina (Boehringer-Mannheim) membranas de nitrocelulosa con muestra de CP de las 6 cepas de PVX. Las lectinas unidas fueron detectadas usando anti-digoxigenina

conjugada con AP según el protocolo sugerido por el proveedor. Como controles positivos fueron también incluidas muestras de carboxypeptidasa Y, transferrina, fetuina y asialofetuina. Las lectinas usadas fueron GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*), SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*), MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*), PNA (aglutinina de *peanut*), ConA (aglutinina de *Canavalia ensiformis*), y DSA (aglutinina de *Datura stramonium*).

β - eliminación de azúcares

Para preservar la integridad de la cadena polipeptídica, para poder visualizar el efecto de la eliminación mediante SDS-PAGE (como se explicara anteriormente), se ensayaron distintas condiciones de reacción combinando las condiciones alcalinas suaves utilizadas por Lecommandeur et al. (1990) con el efecto protector del dimetil sulfóxido (Downs et al., 1973). La mezcla de reacción elegida tuvo dimetil sulfóxido NaOH 0.05 N : etanol en una relación 50 : 40 : 10 (v/v/v). Un μl de muestra de proteína (5 mg/ml) fue agregado a 20 μl de la mezcla de reacción e incubada a 45°C por 30 min. Luego, se le agregó buffer de muestra de Laemmli y la muestra fue directamente colocada en el gel para su separación por electroforesis. Como controles de la β -eliminación se utilizaron las proteínas BSA, ovoalbúmina y asialofetuina.

Separación de las distintas formas de proteína de cápside

Las distintas formas moleculares que presenta la proteína de cápside fueron separadas mediante SDS-PAGE. Estas variantes de la CP presentan diferencias en la movilidad electroforética y corresponden a productos de degradación de la proteína en sus regiones amino y/o carboxi - terminales y a formas deglicosiladas. Para secuenciar la porción amino-terminal de alguna de las variantes de la CP, el gel fue electrotransferido a una membrana de PVDF y posteriormente coloreada con coomasié. Una porción de la membrana conteniendo la banda correspondiente a la forma deseada fue cortada y la proteína adsorbida fue secuenciada directamente de la membrana en el secuenciador.

Digestión con tripsina

Para obtener los péptidos tripticos de alguna de estas formas de la CP la digestión se realizó dentro del gel siguiendo el protocolo con utilización de acetonitrilo descrito por Rosenfel (1983). Luego de 4 hs a 30°C la digestión fue detenida por el agregado de 1.5 μl de ácido trifluoro acético (TFA). Los péptidos resultantes fueron recuperados con 3 extracciones de 20 min cada una, con 100 μl de una solución de 60% acetonitrilo, 0.1% de TFA y 0.02% Tween 20, a 30°C en un agitador de microtubos. Los sobrenadantes extraídos fueron combinados y concentrados a 20 μl en una SpeedVac (Savant). La tripsina reconoce la presencia de Lys (K) o Arg (R) cortando después de estos aminoácidos, por lo tanto el péptido amino terminal presenta la siguiente secuencia: TTPANTTQAVGSTTSTTTTLAGATPANSGLFTIPDGDFFSTAK (MW: 4208.9 Da), mientras que el carboxi terminal la siguiente: ITGTTVAEAVVSLPPP (MW: 1550.8 Da).

Cromatografía en fase reversa

La separación de los péptidos tripticos se realizó mediante cromatografía en fase reversa utilizando un equipo de HPLC para micropurificación (Smart System, Pharmacia). Se utilizó un columna de Sephasil C18 (Pharmacia) siguiendo el siguiente protocolo: 0.1 ml/min de flujo, Solventes A y B, 0.1% de TFA en agua y

0.1% de TFA en acetonitrilo, respectivamente. El gradiente de solventes fue 0% de B por 4 min, de 0 a 60% de B en 60 min, de 60% a 100% en 4 min y 100% de B durante 5 min. La elución de los péptidos fue detectada por lectura simultánea a 280, 225 y 215 nm.

Secuenciación de proteínas y péptidos

Las secuencias fueron determinadas en un microsecuenciador en fase gaseosa (470A, Applied Biosystems) siguiendo el método de degradación secuencial de Edman. Las distintas variantes de la CP fueron secuenciadas a partir de la membrana de PDFV que la contenía, mientras que los péptidos fueron adsorbidos a un membrana de fibra de vidrio.

Desbloqueo químico del amino terminal de la CP

Varios métodos, químicos y enzimático, fueron probados para separar el grupo bloqueante del amino terminal. La enzima acetilasa (EC 92143, Boehringer) ensayada no clivó el grupo unido al N-terminal, tal vez por la presencia cercana de la glicosilación. Los protocolos de métodos químicos fueron extremadamente agresivos para esta proteína rica en Ser y Thr, lo cual generaba varios sitios de clivado interno por lo cual se obtenían secuencias simultáneas de distintas porciones de la CP. Finalmente se adaptó el protocolo descrito por Wellner et al. (18) reduciendo las condiciones de incubación de la muestra con TFA anhidro de 16 hr a 65°C a 30 min a 55°C. De esta manera se logró obtener casi un único amino terminal libre en la proteína.

Espectroscopía de masa

La determinación de la masa de los péptidos seleccionados se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mann y Wilm (1995) de espectroscopía de masa por desabsorción de plasma de ^{252}Cf (14) en un equipo BIO-ION 20 (Uppsala, Sweden) a cargo del Dr. Bo Sundqvist del Laboratorio de Acelerador en Tandem de la Universidad de Uppsala, Suecia.

PVX MS

una nueva cepa hipervirulenta

Sección 3

PVX MS, UNA NUEVA CEPA HIPERVIRULENTA

Resultados

Aislamiento del PVX MS

Como resultado de un proyecto previo (Tozzini, 1994b), el cual involucraba la confrontación de numerosos determinantes de resistencia presentes en el germoplasma de *Solanum* y de diversos aislamientos o cepas de PVX, se identificó a la cepa MS por sus particulares propiedades de virulencia.

La cepa PVX MS (originalmente llamada PVX FCA01, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) fue aislada en la provincia de Córdoba, por el Ing. Agr. Julio Muñoz. Este aislamiento fue distinguido porque produce un mosaico muy suave en las hojas de *Nicotiana glutinosa*, y purificado por varias multiplicaciones consecutivas a partir de lesiones foliares aisladas.

Multiplicación de PVX MS en genotipos *Rx*

Como se mencionara en la introducción, las cepas de PVX pueden ser clasificadas según su capacidad de superar la respuesta de resistencia en genotipos portadores de los genes *Nx*, *Nb* y *Rx* (Tabla 1.1).

Con el objeto de corroborar las características de virulencia detectadas en la cepa MS, se realizaron inoculaciones en genotipos portadores de distintos genes de resistencia. Como controles del desarrollo de infección se incluyó en los ensayos a las cepas cp y HB de virulencia conocida. El PVX cp pertenece al grupo de virulencia II y al patotipo I, esto indica que infecta genotipos *Nx* pero no a los genotipos *Nb* o *Rx*. La Fig. 3.1 muestra la concentraciones alcanzadas en hojas sistémicas e inoculadas en distintos genotipos de papa micropropagados e inoculados con esta cepa. Los títulos desarrollados en las hojas sistémicas son los mejores indicadores de la susceptibilidad del hospedante a la multiplicación y dispersión del virus. En este caso, la cepa cp infectó sistémicamente a los cultivares indicadores Maris Bard y King Edwards, este último portador del gen de hipersensibilidad *Nx*; mientras que no fue capaz de alcanzar niveles significativos en el cv. Maris Piper, el cual además de tener al gen *Nx* presenta el gen *Nb*, ni en el cv. Serrana INTA, portador del gen de resistencia extrema *Rx_{acl}*. Estos resultados concuerdan con las características de virulencia esperadas para esta cepa.

La cepa PVX HB fue el primer aislamiento reportado con capacidad de infectar sistémicamente a genotipos portadores de los genes *Rx* y definió al denominado patotipo HB (Tabla 1.1). En la Fig. 3.2 se muestra el resultado de la inoculación con PVX HB de plantas con distintos genes de resistencia. Como se esperaba, la cepa HB infectó local y sistémicamente a todos los genotipos, incluyendo a los de resistencia extrema (Serrana INTA y *S. acaule* PI 175395).

Fig. 3.1: Multiplicación del PVX cp en plantas portadoras de los genes de resistencia *Rx*, *Nx*, y *Nb*. Las columnas representan la concentración media de PVX y las barras representan un desvío estándar

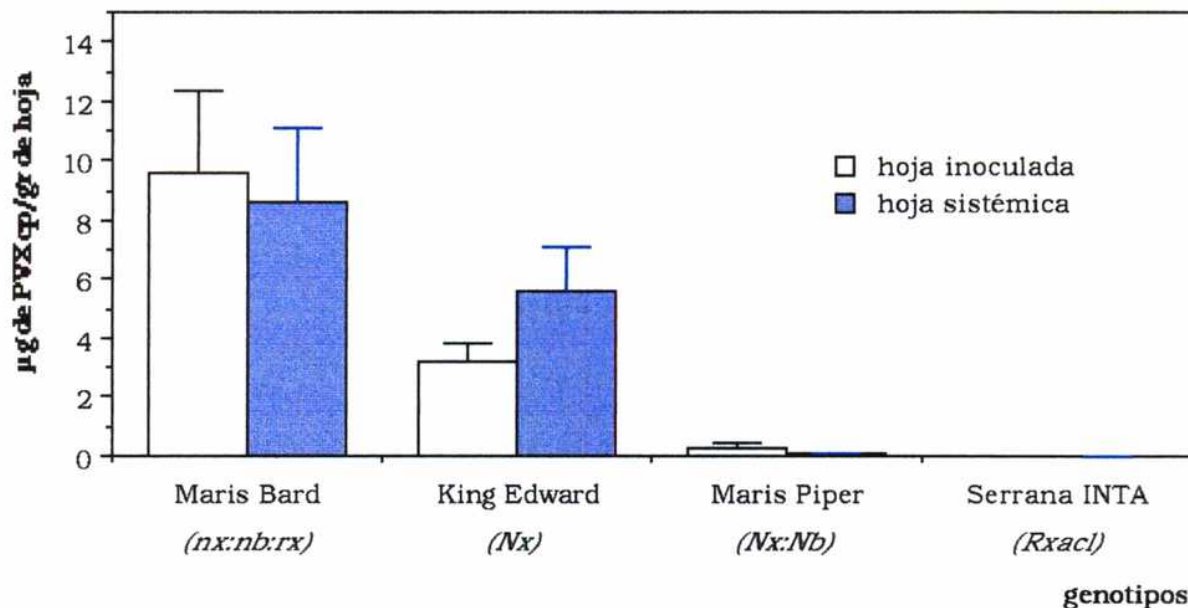
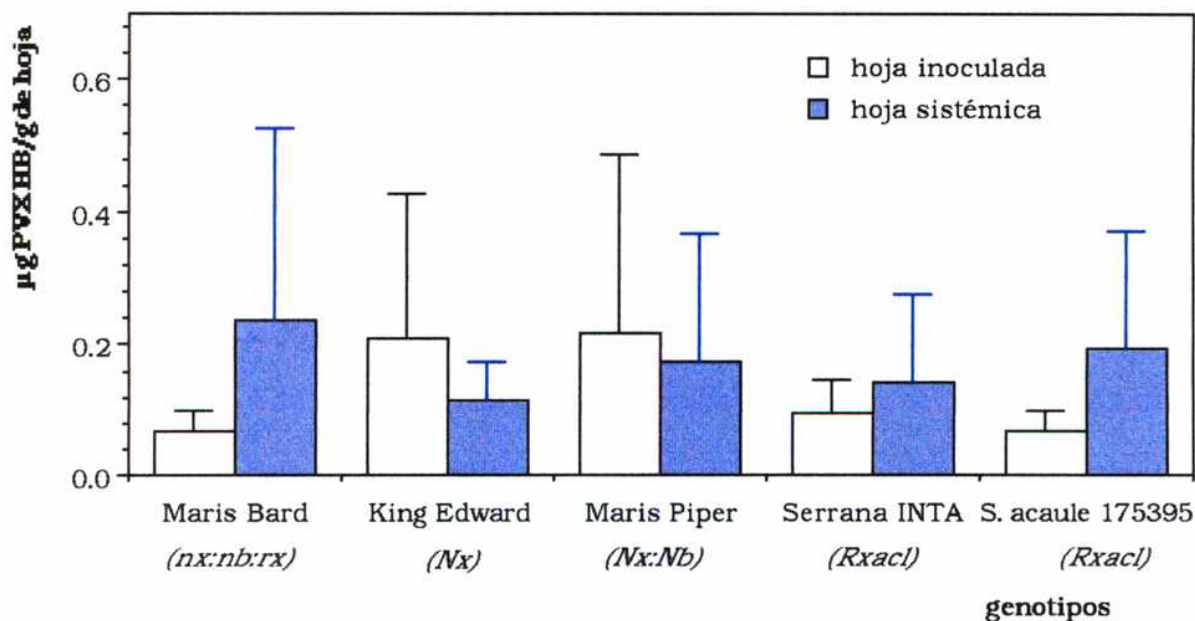
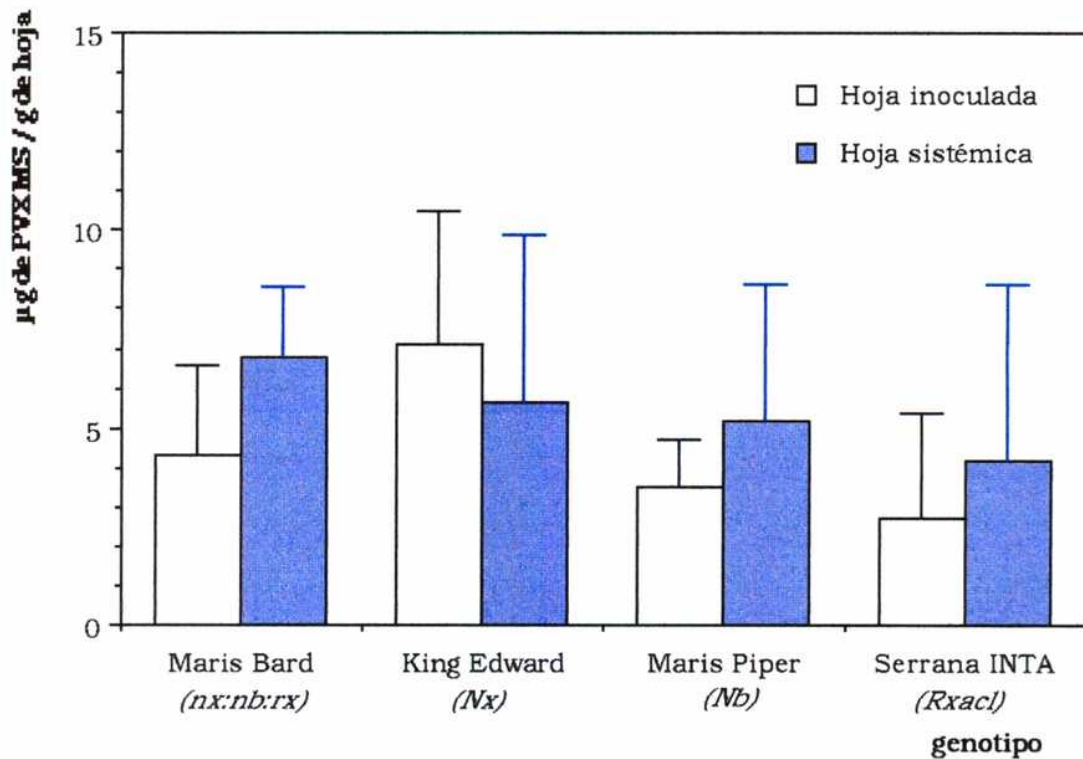


Fig 3.2: Concentración de PVX HB alcanzada en genotipos portadores de distintos genes de resistencia. Las columnas representan la concentración media (ng PVX/g hoja) medida por ELISA en los distintos genotipos en tres ensayos independientes; la barra representa un desvío estándar.



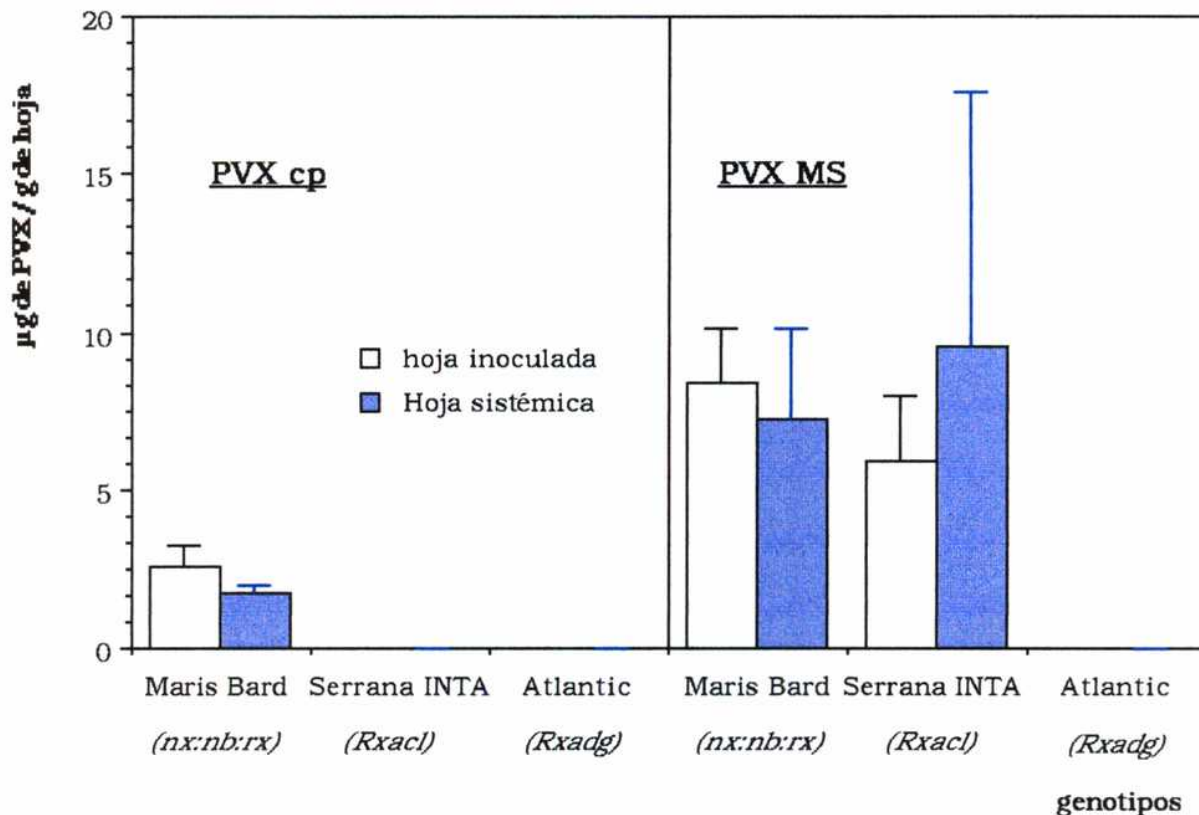
En la Fig. 3.3 se resumen los resultados de la inoculación con la cepa MS. Esta cepa infectó con igual eficiencia a todos los genotipos probados, incluyendo al cv. Serrana INTA. En otros ensayos (resultados no mostrados) se comprobó que PVX MS infecta local y sistémicamente al genotipo *S. acaule* 175395 y al genotipo Pentland Ivory el cual es portador del gen *Nb*. Estos datos indican que la virulencia de MS, desde el punto de vista cualitativo, es igual al del patotipo HB.

Fig. 3.3 Concentración de PVX MS alcanzada en genotipos portadores de distintos genes de resistencia. Las columnas representan la concentración media ($\mu\text{g PVX/g}$ hoja) medida por ELISA; la barra representa un desvío estándar.



Para determinar si la cepa MS es virulenta tanto frente al gen *Rxacl* como *Rxadg*, como lo es la cepa HB, plantas micropropagadas de los cultivares Maris Bard (*nx:nb:rx*), Serrana INTA (*Rxacl*) y Atlantic (*Rxadg*) fueron inoculadas con PVX cp y MS. La Fig. 3.4 muestra los niveles de CP alcanzados por ambas cepas en los tres genotipos. Mientras que en las condiciones en que se desarrolló el experimento la cepa cp sólo infectó al cv. Maris Bard; PVX MS infectó a los cvs. Maris Bard y Serrana, tanto local como sistémicamente, pero no infectó al cultivar Atlantic.

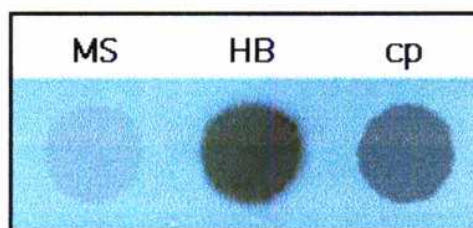
Fig. 3.4: Replicación de las cepas PVX cp y MS en los cultivares Maris Bard (*nx:nb:rx*), Serrana INTA (*nx:nb:Rxacl*) y Atlantic (*nx:nb:Rxadg*). Las columnas representan la concentración media (μg PVX/g hoja) medida por ELISA en los distintos genotipos; la barra representa un desvío estándar.



Caracterización inmunológica y por SDS-PAGE de la proteína de cápside del PVX MS

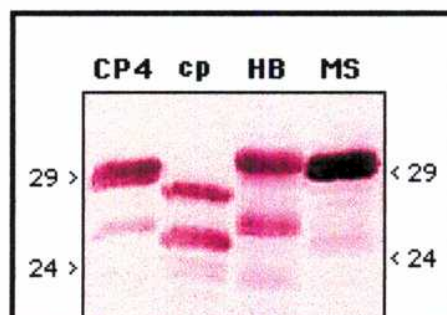
Con el objeto de estudiar el grado de parentesco evolutivo entre PVX MS y PVX HB se analizó la reactividad de la CP de la cepa MS con el anticuerpo monoclonal 67 (Mab 67) preparado por Torrance et al., (1986). Como se mencionó en la introducción, utilizando los Mabs de Torrance, Fernández Northcote y Lizárraga (1991) realizaron una clasificación serológica por la cual las cepas de PVX pueden ser asociadas con la distribución geográfica u origen filogenético. El Mab 67 reacciona con la CP de las cepas de PVX cp, CP4 y HB y define al serotipo PVX^A (andino). El análisis inmunológico (*immunodot*) con el Mab 67 de virión purificado de las cepas cp, HB y MS (Fig. 3.5) mostró que la CP de MS no fue reconocida por este Mab, mientras si lo fueron las CPs de cp y HB. Esto muestra que PVX MS no pertenece al serotipo andino y por lo tanto corresponde al serotipo PVX^O (serotipo de distribución mundial, Fernández Northcote y Lizárraga, 1991).

Fig 3.5 Reactividad de las cepas MS, HB y cp frente al anticuerpo monoclonal Mab 67 (Torrance et al, 1986)



Algunas cepas de PVX presentan diferencias en el peso molecular aparente de sus cápsides (Adams et al., 1987; Paul, 1974), por lo tanto pueden ser distinguidas unas de otras por su migración en SDS-PAGE. La Fig. 3.6 muestra el resultado del análisis electroforético y la posterior detección inmunológica (*western blot*; 12% SDS-PAGE) de la CP presente en el macerado de hojas de tabaco infectadas. El peso molecular aparente estimado para las CPs de las cepas cp, CP4, HB y MS fue de 27.0, 28.0, 29.0 y 28.7 kDa, respectivamente. Estos resultados también fueron reproducibles en geles de 11, 13 y 14% de poliacrilamida, confirmando que las diferencias observadas son consistentes y con pequeño error (± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.3 , ± 0.2 kDa para las cepas cp, cp4, HB and MS respectivamente).

Fig 3.6. Análisis por *Western blot* de las proteínas de cápside de las cepas de PVX MS, HB, cp y CP4. Con flechas se indica la posición de los marcadores de peso molecular de 29 y 24 kDa



(Nota: los pesos moleculares aparentes estimados para las CPs presentados aquí son levemente diferentes de los que fueron publicados en Tozzini et al. (1994). En la mencionada publicación los pesos moleculares aparentes fueron estimados por interpolación lineal entre los marcadores de 24 y 29 kDa, mientras que para el presente trabajo se incluyeron, además, los marcadores de 21 y 36 kDa)

Características de virulencia de la cepa MS

Los resultados de las distintas inoculaciones efectuadas con la cepa MS muestran que ésta es capaz de infectar genotipos Nx , Nb , $Nx:Nb$, y Rx_{acl} : pero no así a Rx_{adg} . La capacidad para superar un gen de resistencia extrema como lo es Rx_{acl} determina que la cepa MS pertenezca al denominado patotipo HB de la clasificación propuesta por Fernández-Northcote (1990). MS es así la primera cepa, después de la identificación de la cepa HB que es aislada, caracterizada y publicada (Tozzini et al, 1994, y esta tesis) como capaz de superar a alguno de los genes Rx . Esto indica que los genes Rx no son iguales en cuanto su reconocimiento a nivel de interacción con el patógeno. Las diferencias de interacción entre Rx_{acl} y Rx_{adg} nunca pudieron ser detectadas hasta ahora porque no se describió una cepa viral como PVX MS, a pesar de que si se sabía que Rx_{acl} y Rx_{adg} no son alelos entre sí, sino que están ubicados en cromosomas diferentes (Ritter et al., 1991). Por otro lado, MS no supera al gen Rx_{adg} como sí lo hace la cepa HB. La ausencia de virulencia capaz de superar a Rx_{adg} puede ser debida a la falta de presión selectiva ejercida por este gen en la región donde este virus fue aislado. Esto podría estar reflejando la falta de cultivares o especies silvestres con el gen Rx_{adg} en las zonas productoras de Bs. As., Córdoba y Mendoza de donde fue tomado el aislamiento (como se discutirá en la próxima sección)

Origen de la cepa MS

Los estudios inmunológicos y de migración en SDS-PAGE de la CP indican sin lugar a dudas que el aislamiento de PVX denominado MS no corresponde a la cepa HB. Más aún, la falta de reconocimiento por parte del MA67, indica que la cepa MS pertenece al serotipo PVX^o (común o europeo). Esto muestra que esta cepa evolucionó a partir de un antecesor no muy cercano a HB. PVX MS ha evolucionado para eludir, al menos, a tres diferentes mecanismos de resistencia (de los genes Rx_{acl} , Nx , y Nb); esto sugiere un caso de evolución paralela bajo la presión selectiva de los genes de resistencia presentes en los cultivares de papa o en las especies silvestres. Los cultivares de papa portadores de genes Rx_{acl} son utilizados en varias localidades de Argentina, no así cvs. con el gen Rx_{adg} . Esta podría ser una de las causas por la cual la cepa MS sólo supera al gen Rx_{acl} , mientras que la cepa HB es originaria de una zona donde se encuentran hospedantes con una gran diversidad de genes de resistencia, incluyendo Rx de distintos orígenes (Rx_{acl} , adg , etc.)

El gen Rx_{acl} se difundió en las zonas productoras a través del cv. Serrana INTA, el cual presenta muy escasa utilización actualmente, pero que tuvo una pequeña participación en el área sembrada durante la década pasada. Este cv., en los ensayos realizados en el país y en distintos centros internacionales, siempre presentó "inmunidad" a la inoculación con PVX (Mendiburu, 1990; Saladrigas et al., 1991; Fernández-Northcote, 1990). Con respecto al germoplasma silvestre que convive en nuestras zonas productoras típicas, entre otras especies se encuentra *Solanum acaule*, y *S. commersonii*. Sin embargo es imposible evaluar el rol en la selección de genes de virulencia que pudieron haber tenido las especies silvestres. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que esta cepa no haya evolucionado en Argentina, sino que haya sido introducida al país; lo cual implica que esta cepa esté también presente en Europa.

Las determinaciones de PVX por ELISA en tubérculos de los cultivares Rx_{acl} muestreados en los mercados nacionales es usualmente negativa (datos no mostrados). Al mismo tiempo, la ocasional susceptibilidad al PVX que por efecto de las bajas temperaturas pueden presentar los genotipos Rx (Delhey, 1974) impide estimar con certeza la dispersión de esta cepa (o cualquier otra capaz de superar al gen Rx_{acl}) a través de estas observaciones.

Esta dispersión limitada observada para la/s cepa/s que superen los genes *Rx* en Argentina, es de alguna manera similar al patrón de dispersión observado para PVX HB en Bolivia, el cual fue hallado en menos del 7% de la papas bolivianas (Ross, 1986). La capacidad competitiva del PVX HB no muestra disminución según Moreira et al. (1980) y Jones (1985) a pesar de que algunos autores sugieren que un incremento en la virulencia va acompañado de una disminución de ésta (Adams, 1984; Harrison, 1981; Jones, 1981 y 1982). Sin embargo, nuestros propios resultados y observaciones realizadas por Fernández-Northcote (comunicación personal) muestran que la cepa HB alcanza en planta de papa y tabaco títulos 10 veces menores que otras cepas sugiriendo una menor eficiencia de multiplicación. En cambio, la cepa MS alcanza tanto en plantas de tabaco como de papa títulos 50 veces mayores a los de la cepa HB y varias veces superiores a los observados para las cepas cp, CP4, DX, y X3 (Tozzini, resultados no publicados). Y si bien su habilidad para competir en mezclas con otras cepas de PVX no ha sido evaluada, los altos títulos desarrollados por MS estarían indicando que satisface uno de los requerimientos básicos para lograr una buena dispersión por infección mecánica.

Por lo tanto, la ocasional detección de PVX en genotipos *Rx* sugiere que: o bien su distribución está restringida debido tal vez a una baja capacidad competitiva o que la cepa MS (u otra capaz de superar *Rx*) es de aparición reciente. Cabe aclarar que la cepa MS ha sido recientemente aislada (fines de los años 80) por el Ing. Agr. Julio Muñoz (Fac. de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Córdoba), al parecer ha sido aislada de papas procedentes de las provincias de Mendoza, Tucumán y Córdoba.

Por lo dicho hasta ahora, y con los presentes y escasos datos epidemiológicos de las zonas productoras del país y hasta no tener nuevos estudios de la habilidad competitiva del PVX MS, no es posible estimar el peligro que representa para la producción de papa esta nueva cepa (o cualquier otra capaz de superar simultáneamente a los genes *Nx*, *Nb* y *Rx*).

Análisis molecular
del genoma de PVX MS

Sección 4

Análisis molecular del genoma de PVX MS

Resultados

Secuencia nucleotídica del genoma de PVX MS

Con el objeto de determinar la naturaleza molecular de las propiedades de virulencia del PVX MS se secuenció el genoma de esta cepa. Se comenzó por el gen de la cápside dada la importancia que tienen algunos aminoácidos de esta proteína como determinantes de virulencia (ver sección. xxx. de la introducción). Los resultados que a continuación se detallan mostraron que el/los determinantes de virulencia de PVX MS no se hallan en la cápside, por lo que se continuó con el resto del genoma hasta completarlo.

La secuencia completa del genoma de la cepa MS (Fig. 4.1) muestra que ésta tiene 6435 nucleótidos y presenta los 5 marcos abiertos de lectura (ORFs, *open reading frames*) propios de PVX. El ORF 1 se inicia en el nucleótido 85 y culmina en el 4456 (siempre incluyendo el codón de terminación). El ORF 2 comienza en el nucleótido 4486 y termina en el 5167, mientras que el ORF 3 se inicia en la base 5147 para terminar en la base 5495. Los ORFs 4 y 5 se extienden del nucleótido 5427 al 5640 y del 5650 al 6364, respectivamente. El extremo 3' no codificante presenta una longitud de 72 nucleótidos. La presencia de una cola de poli-adenina se confirmó al obtenerse cDNAs virales a partir de primers de oligo-dT. En la tabla 4.1 se resume la información de la Fig. 4.1 al mostrar la similitud o divergencia porcentual entre los genomas de las cepas MS, S, X3, cp y HB (únicas cepas de las cuales se tiene información publicada de las secuencias del genoma completo).

Figura 4.1: Secuencia de nucleótidos del genoma completo de PVX MS (versión DNA) y su comparación con la secuencia de otras cepas del mismo virus (S, X3, cp y HB, según Skryabin et al, 1988 Huisman et al., 1978 ; Orman et al, 1990; y Querci et al., 1993, respectivamente). En la misma se indican el inicio y fin de los 5 marcos de lectura establecidos en PVX. También están indicados los promotores genómicos (PG) y subgenómicos (PSG) de la secuencia consenso del promotor subgenómico de la proteína de cápside establecida para los potexvirus.

Promotor genómico

10 20 30 40 50 60 70 80

MS GAAAACTAAACCATACACCACCAACACAACCAAACCCACCACGCCAATTGTTACACACCCGCTTGGAAAAGCAAGTCTA
S A T
X3
cp A G AAC A A G
HB A AAC A A T G

Inicio del ORF 1, Replicasa viral

90 100 110 120 130 140 150 160

MS ACAAATGGCCAAAGTGC GCGAGGTTACCAATCCTTTACAGACTCCACCACAAAACTCTCATCCAAGATGAGGCTTATA
S
X3
cp TT G A . C . C . T T A . T . T . G G . CC
HB TT A . C . T G . CC

170 180 190 200 210 220 230 240

MS GAAATATTCGTC CATCGGAAAAACATAAACTAGCCAACCCGTACGCTCAAACGGTTGAAGCGGCTAATGATCTAGAG
S T
X3 C C T T
cp . T . C . A C . GT . T A TA . C A . C . C T . A
HB . T . C . A T G C . GT . T A G . C . C A . C . C T . A

250 260 270 280 290 300 310 320

MS GGGTTCGGCATAGCCACCAATCCCTATAGCATTGAATTGCATACACATGCAGCCGCTAAAACCATAGAGAACAACTTCT
S G
X3 G T
cp . A . T A . C . T . C C . G . A G G . A . T T T .
HB . A . T A . C . T . C C . G . A G . T . C . G . G . C C .

330 340 350 360 370 380 390 400

MS AGAGGTGCTTGTTCCATCCTACCACAAGAACCTGTTACATTTATGTTCTTAAACCCAGGAAGCTAAACTACATGAGAA
S
X3
cp G A . C . C . T . G G C C T . C T . A T . T G .
HB . . A . A . G . C . C G C C A T . T G .

410 420 430 440 450 460 470 480

MS GAAACCCGCGGATCAAGGACATTTCCACAATGTTGCCATTGAACCGAGAGACGTAGCAAGGTACCCCAAGGAAACAATA
S T
X3
cp C T C T . T . T . A A C . C
HB CA A C . T A T . T . T . A A C . C

490 500 510 520 530 540 550 560

MS ATTGACAAACTCACAGAGATCACAACGGACACAGCGTACATTAGTGACACTCTGCACTTCTTGATCCGAGCTACATAGT
S A CG
X3 A A T
cp . AC AG AGAG G . A C . C A C . C . C T . T .
HB . AC AG . G T . AG A . T . C T A TC . C . C T . T . T .

570 580 590 600 610 620 630 640

MS GGAGACATTCCAAAAC TGCCAAAATTGCAAACATTGTATGCGACCTTAGTTCTCCCCGTTGAGGCAGCCTTCAAAATGG
S A C
X3 C
cp A G G T . G C . A C . C . C . C . AC . C . C AG . A . T . T
HB G T . G C . C C . C C . GC . C . C . A . A . A C . T .

```

      650      660      670      680      690      700      710      720
MS AAAGCACTCACCCGAACATATACAGCCTCAAATACTTCGGAGATGGTTTCCAGTACATACCAGGCAACCATGGTGGTGA
S .....T.....T.....T.....T.....
X3 .....T.....T.....T.....T.....G
cp .....C.....A.....G..G...T..T..C..C.....
HB ..G..T...T..A...C.....G...T..C...C.....G.....G..A...

      730      740      750      760      770      780      790      800
MS GCATACCATCATGAATTTTCTCATTTACAATGGCTCAAAGTGGGAAAGATCAAGTGGAGGGACCCCAAGGACAGCTTTCT
S .....T.....T.....T.....T.....
X3 .....CG.....T.....T.....T.....
cp ..T..T..C.....CA..CG..CC..G..G...A.....T..T.....C..C.....A.....G..TC..A..
HB ..T.....C.....CAGC..C..G..G..C..G..A...T..T.....C..C..T..T.....TG...G..

      810      820      830      840      850      860      870      880
MS CGGACATCTCAATTACACGACTGAGCAGGTTGAGATGCACACAGTGACAGTACAGTTGCAGGAATCATTGCGGGCAAACC
S ...G.....G.....G.....G.....
X3 .....G..T.....T.....T.....
cp .....T..C.....ACA.....C..C..CA.....C.....C..C..A..G..C.....T.....
HB .....C.....C..T..ACA.....A.....T..CA.....G.....T.....C..C..A..G..T..T..A.....T..

      890      900      910      920      930      940      950      960
MS ACTTGACTGCATCAGGAGGGGAGACTTACTCACACCTGAGGTGCGCACTTTTGGCCAACCTGACAGGTATGTGATTCCA
S .....A.....G.....A.....C.....
X3 .....T.....A.....G.....G.....T.....C.....
cp .....T.....A..A..A..TA..GA..G.....A.....A.....G.....G.....A.....C..G...
HB ..C.....A..A..TA..GA..G..G..A.....T..G.....A..G..A.....A.....AC..G...

      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
MS CCACAGATCTTTCTCCCGAAAGTTCAAACTGCAAGAAGCCGATTCTTAAGAAAATATGATGCAGCTCTTCTTGATGT
S .....T.....T.....T.....T.....
X3 .....A.....T.....T.....T.....
cp ...A...C...A..G..A.....C..C..G.....C.....TC..A..C..
HB ...A..A..C...A...A...T.....A..T..C...A..G.....A..T.....C..

      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
MS TAGGACAGTCAAGGTCGCAAAAAATTGTGACATCTTTGCCAAAGTCAGACAATTAATTAATCATCTGACTTGGACAAAT
S .....T.....T.....T.....T.....
X3 .....A.....T.....T.....T.....
cp C.....A..G.....G..C.....T..A.....G..A.....C.....G..C..C..CG.....
HB C.....G.....A..T.....G..C..C.....A.....GA..A..G..G.....C..G..C.....C..T.....

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
MS ATTCTGCTGTGGAAGTGGTCTACTTAGTAAGCTATATGGAGTTCCTTGCCGATTACAAGCCACCACCTGCTTCTCAGAC
S .....T.....T.....T.....T.....
X3 .....T.....T.....T.....T.....
cp TC..G..G..T..G..A...C...C..T..C.....T..A...CCC...G..T.....
HB TC..G..G..T..G..A..T..C...T.....T..A...C.....T..C...

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
MS ACACTTTCTGGTGGCTTACTAACAAGACCCTTGACCCGGTGAGGGCTTGGATACAGGAGAAAAAGATGCAACTATTTGG
S .....G.....A.....A.....
X3 .....C.....G.....A..A..G.....G..G.....
cp ..TT..A..G..C.....T..A..C..T..A.....T..A..A..G.....T..G...
HB ..C..A..A..C.....G.....A..C..T..A..A.....T..A..A..G.....G..T..G...

```



```

1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
MS TCTTGAGGACTACGCGAAGTTAGTCAAAGCAGTTGATTTCCACCCAGTGGATTTTTCTTTCAAGGTGAAACTTGGGACT
S .....
X3 .....G.....A.....
cp CT.G..A.....TA..AC.G.....G..G..C.GG.G.....C..C.....T..A..T.....C.....
HB C..G..A.....A.....A.....G.....GG.G.....C..C.....T.....C.....

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
MS TCAGATTCCACCCCTTGCAAGCGTGGAAAGCCTTCCGACCAAGGGAAGTGTCCGGATGTAGAGGAAATGGAGAGTTTGTTC
S .....A.....C.....A.A.....
X3 .....A.....
cp .....ACT.AAC.AGGCAT.....G..T...AG..C..T..GC...A..C..G..A..G...A.C.AC..C..T
HB .....A.T..AC.AGGCAT.....G.....T.AG..C..C..T.....G..A.....A.T.A..C...

1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
MS TCAGATGGGGACCTGCTCGATTGCTTCACAAGAATGCCAGCTTATGCAGTAAACGCAGAGGAAGATCTGGCTGCAATCAG
S ..T.....G.....T.....
X3 .....T.....T.A..A.....
cp GAC....C..T...G..C..T..T...G.....C.....T..A.....C.....C.GG..G..
HB GAC....C..T...A..C.....G..C..C..C..C..T..C.....C..A...GG..G..

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
MS GAAAACGCCGGAGACGGATGTCGGTCAAGAAGTTAAAGAACCCGCAGGAGACAGAAATCAATACTCAAACCTGCAGAAA
S .....T...C.....G...T.....
X3 .....C...T.....G..T.....
cp .GG..ACAATC..GAA..GACATCAAC..CCCC..G.....AG.....G.A..GG.....ATC.....G.....
HB .GG.GACAACC..GGA..AACGTCAAC..CCCC..GG....A.A..G...AG..GG.G...GTC.....G.....

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
MS CTTTCCTCAACAAGCTCCACAGGAAACACAGTAGGGAGGTGAAACATCAGGCCGCAAAGAAAGCTAAACGCCTAGCCGAA
S .....G.....
X3 .....C.....T.....
cp .C.....AG...A..GACT.....A.C...AACC.GGAG..GC..T.....C.....G.....
HB .C.....GG.....T.GACG.....ACC...AACT..GAG..GT..T.....G.....T..G.....G

1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
MS ATCCAGGAGTCCATGAAAGCTGAAGGTGAGGCTGAACCAAATGAGATGAGCGGGGGCATGGGGGCAATACCTAGCAACGC
S .....G.....C...T.....
X3 .....G.....C.....C.....C.....
cp ....A..C.....CAGG..CA.GACT.AG...GG..G.C.T.A..CACCCAA.....C.A.GCG..A.....T..
HB ..T..A..C..G..A..CCGG..CCAGACT.AG...GA..GCC..GGAGCACCCAA.....C.A.GC..A.....

1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
MS CGAACTTCCAGCACAAGTGGTGCCAGACAAGAACTCACACTCCCAACATCTAAACCTGTTCTGCAAGGTGGGAAGATG
S .....CA...G.....
X3 .....G...G...A.....CA.....
cp T..T.....G..GTC.A..AA.TGGAGGCT.GCAC...T...G..C.TG...G.CC.A..ACA..AA.....
HB T.....G.A..C.A..A..GG..GCT.GTAC...T.....T.TG...G.CC.A..ACA..A.....

1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
MS CTTCAATTCACAGATTCTAGTGTGGAAGAGGAGCAGGTGAAACTCCCTGGCAAAGAAGCCGTTGAGACAGCAACGCAACAA
S .C.....C.....A.....
X3 .....A.G...T...AG.....A..GA.A...G...G...
cp .A...C...T..C..CTCAACAATT..CCC.AC..AA.TCA...A..AG...G.A..ACA..G.C.....A..
HB .G..T.....C..ATCAA..ACT..CC.AAT..AA.TCA.G..G..A.....G.....G..AGTT..C.....A..

```

	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
MS	GTCATCGAAGGACTCCCTTGAAACTGGATTCCCTCAACTAAATGCTGTTGGATTCAAGGCGCTGGAGATTGAGAGGGA							
S							
X3TTA..C.....							
cp	..GG.G.T.....C.C.C.G.G.....A.C.C.....C.A.A.C.A.A..				
HB	..GG.T.T.A.....C.C.C.....G.....A.C.C.T.....C.A.....C.A.A..		

	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	
MS	CAGGAGTGGAAACAATGATCATGCCCATCACAGAAATGGTCTCCGGTTGGAAAAAGAGGACTTCCCAGAAAGGAACTCCAA								
S	TC.A.....							T.....	G.....
X3	T.....	G.....						G.....	
cp	..A.A..G.C.....C.....T.TT.AC.T.C.....A.G.....T.....C.TG			
HB	..A.A..G.T.....			T.T.A.C.C.C.....A.A.T.C.....C.TG		

	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
MS	AAGAGTTGGCAGAGAATTGCTCGCTATGAACAGAAGCCCTGCCACCATCCCTTTGGACCTGCTTAGAGCCAGAGACTAC							
S							
X3A...T.....							
cp	..CAC.A..T..T..GC.CAAA..C.....TC.....AA.....A..T..C.....T.A..C..G.....G.....T	
HB	..CA.....C..G...C.CAAG..C.....C.....T.AA.....G.....C.....TT.A.....G.....	

	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
MS	GGCAGTGATGTGAAGAACAAGAGAATTGGTGCCATCACAAAGACACAGGCAACAAGTTGGGGCGAGTACCTAACAGGAAA							
SA.....							
X3A...G.....							
cp	..G.C.....A..T.....G.....G.A.....T.....T.G.C.C.....T.....T.....
HB	..G.....C..C.A.....G.....A.A.....C.....C.....TG.C.....T.....G.T.G..

	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	
MS	GATAGAAAGTCTGACTGAGAGGAAAGTTGGGACCTGCGTCATTCATGGAGCTGGAGGCTCTGGGAAAAGCCATGCCATCC								
SC.....								
X3G.....								
cpC.....T..T.....						T.....
HB	A..T.....CT..C...A.....G..TG.T..T.....C.....G.....G..A.....C..G.....C..G.....	

	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	
MS	AGAAGGCATGAGAGAAATTGGCAAGGGCTCAGACATCACTGTAGTCCTGCCGACCAATGAACTGCGGCTAGATTGGAGT								
SC.....								
X3A.....								
cp	..A.A..GC.....G.....G.....T.....G.C.A.A.....G.....G.C.....C	
HBGC...G.....G.C.....					G.T.A.....GT...C.G.C.....

	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	
MS	AAGAAAGTGCCCAACTGAACCATACATGTTCAAGACCTATGAAAAGGCATTAATTGGGGAACTGGCAGTATAGTCAT								
ST.....								
X3A.....								
cpG..C..A.....A.G.C.....T.....G.A..CC.....T.....A.A.C.....G..		
HBC.A.....A.G.C.....					CC...C.A.....A.G.C.....

	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560
MS	CTTTGACGATTACTCAAAACTTCCCTCCCGTTACATAGAAGCCTTAATCTGTTTCTACTCCAAAATCAAGCTGGTCATTC							
SC.....							
X3T.....							
cpC..T.....T..G..A..A..A.....T..T..G..AC.CG..A.C.....C.A.A.....A..AT..A.....			
HBC.....G.....G..A..A.....T.....GC..G.TA.C.....C.A.....G..T.....A.....

```

2570      2580      2590      2600      2610      2620      2630      2640
MS TAACAGGAGATAGCAGACAGAGCGTCTAC ATGAAACTGCTGAGGACGCCTCCATCAGGCATTTGGGACCGGCGACAGAG
S .....T..C.....A.....
X3 .....G..A.....
cp .T..T.....A..T.....G..GT.A..T....T..T.....C..A..C.....T..T..A
HB .C..T.....A.....G..GT.A..C.....T....C.....T..A..C..T...

2650      2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720
MS TACTTTTCAAATACTGCCGATACTATCTCAATGCTACACACCGCAACAAGAAAGACCTTGCAAACATGCTTGGTGTCTA
S .....C.....A.....T.....G.....
X3 .....C.....G.....
cp GTG...G.T..G....A.G....CT.G..C..C.....T.G.....A....G..
HB GTA...G.G..G....TA.G....CT.G....C.....TT.G.....T.G....A..

2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
MS CAGTGAGAGAACGGGGTCACCGAAATCAGCATGAGCGCCGAGTTCCTTAGAAGGAATCCCAACCTTAGTACCCTCGGATG
S .....A.....T.....
X3 .....A.....T.....T.....T.....
cp ...C.....C..CAC...T....A..T.....T.T..A..TC.G....TG.T..G...C....G....A..C.
HB ...C....G..T..TAC...T.....T.T.....C.C....GG.....A..G..G....A...

2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
MS AGAAGAGAAGGCTGTACATGGGCACTGGGAGGAATGACACGTTACATACGCTGGATGTCAGGGGCTAACTAAGCCGAAA
S .....A.....
X3 .....A.....C.....A.....C.....
cp .A....G..T.....A..C.....A.....A.....C..A..T..C..G....A...
HB .....G.A.T.A.....C..C..A.....G....C....C..A..T..T..A....C..G

2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960
MS GTGCAAATAGTGTGGACCACAACACTCAAGTGTGTAGCGCGAATGTGATGTACACGGCACTTTCTAGAGCCACCGACAG
S ..A.....C.....
X3 ..A.....C.....T.....T.....
cp ..C..G..C...C.A.....C.....T.....T.A.....A..C..G....T..T..
HB ..T....T....A.....T.....C.....C..C..C.....T.G.....T..T..

2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040
MS AATTCACCTCGTGAACACAAGTGCAAACCTTTCAGCCTTCTGGGAAAAGTTGGACAGCACCCCTTATCTCAAGACTTTCC
S G.....G.....A.....
X3 G.....C..G.....C.....
cp G.....A.C....T....C....A..C..T.....C.T.....C..G....C..T.
HB G..C....A.C....C....C....A..C....T....G..C.T.....C..T.....T

3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
MS TATCAGTGGTGAGAGAACAAGCGCTCAGGGAGTACGAGCCGGCAGAGGCCAGAGCCAATTCAAGAGCCTGAGCCCCAGACA
S .....A.....G.....
X3 .....A.....T.....
cp ...T..C..A..G..G..T..A..T.A.....T....T..C..A..T....G...A.G....C..A.....T
HB .G..T..T..A..G.....A..T.....T....T.TT....T..A....AAG.....A..A..A..T

3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200
MS CACATGTGTGTCGAGAATGAGGAGTCCGTGCTAGAAGAGTACAAAGAGGAACTCTTGAAAAGTTTGACAGAGAAATTC
S .....G.....C.....G..C..
X3 .....G.....G..A..
cp .....C..G.....T..A....G.....G..A..GT.GC.....A.....G..G..C..
HB .....C..G.....T....G..G..A.....A..GT.GC....G.....G..G..C..

```

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280
 MS CTCTGAATCTCATGGTCATTCAAACCTGCGTCCAAACTGAAGACACAACCATTTCAGTTGTTTTACATCAACAAGCAAAG
 SC.....G.....T.....G.....
 X3C.....T.....G.....
 cp ...A..TG.A..C..A..C..C.....G..G.....C..A..A..C..A..C..C.....G..G..C....
 HB ...G..GG.C.....A.....C.....A..G..G..G..T..C..AG.A..AC.A..C..C..C.....G..C....

3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 MS ATGAGACTCTCCTCTGGGCGACTATAGATGCGCGGCTCAAGACCAGCAATCAAGAGACAAACTCCGAGAATTCTTGAGC
 SC.....A.....A.....
 X3C.....C.....T.....G.....C.....
 cpT..A.....A..C..T.....T..C..G.....C.....A..GC.....T..G..C...T
 HBT..G.....A..C..T.....A..CT.G.....C.....A..GC.....T..G..G..C...T

3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440
 MS AAGAAGGACATTGGGGACGTTCTGTTTTGAACTACCAAAAAGCTATGGGCTTGCCCAAAGAGCGTATTCCTTTTTACA
 ST.....C..C.....
 X3A.....T.....C...
 cp ...GA.....A..T..C..C..C..A..T.....G..G..A.....GC...A..G..A..CA..C.....C....
 HB ...GA.....A.....C..C..A.....T.....G..A.....GC.A.....CA.....C.....

3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520
 MS AGAGGTCTGGGAAGCTTGTGCCACGAAGTACAAAGCAAGTACCTCAGTAAGTCAAAGTGCAACTTGATCAATGGGACTG
 SG.....A.....
 X3
 cp G.....G.....G..G..C..G..T..G..G..G..T.....T..G..C.....T.....C..C.....C..A..
 HB G.....G.....G.....G.....G..G.....T..G..C.....T.....C..C.....T..A..

3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 MS TGAGACAGAGCCAGACTTTGATGAAAACAAAATTATGGTATTCCTCAAGTCGCAGTGGGTCACAAAGGTGAGAAGCTA
 ST.....C.....A.....
 X3C.....G.....A..A...
 cp .T..G.....T..T.....C.....T.....C..A.....A..T..A..C..A.....G
 HB .C.....A..T..C.....C.....G..T..G..C.....G.....T..A.....A.....A..T..A..A..G

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680
 MS GGTCTACCCAAGATTAAGCCAGGTCAGACCATAGCAGCTTTTATCAGCAGACTGTGATGCTTTTTGGAAGTATGGCCAG
 SA.....A.....
 X3A.....C..C.....T..
 cp ..AT.G..A..A..C..A..G.....T..T..C..C.....C..A.....A..T.....C.....C..A.....TC..
 HB ..AT.G..A..A..C..A.....C..A..A..T..C.....C.....A.....A..C.....C.....C..A.....C..

3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760
 MS GTACATGCGATGGTTCAGACAGGCTTTCCAGCCAAAAGAAGTCTTCATAAACTGTGAGACTACGCCAGAAGACATGTCTG
 SG.....
 X3
 cp A.....T.....T..G.....G..T..A..C..G.....C..T.....G..A..T..G.....G..
 HB A.....T.....T..G.....A.....A..C.....T.....C.....G.....T..G.....A..

3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 MS CATGGGCCCTGAACAAGTGAATTTCCAGCAGACCTAGCTTGGCTAATGACTATACAGCTTTCGACCAGTCTCAGGATGGA
 ST.....C.....
 X3 T.....T.....A.....C.....
 cpTT..G.....C.....CG..G..C..TC.T..A.....C..G..C..T..T.....A.....C...
 HBT...GT..T.....C.....CA..G..C..C.T..A..C.....C..G..C.....G.....C...

```

3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920
MS GCTATGCTGCAATTTGAGGTGCTCAAAGCCAAGCACCCTGCATACCAGAGGAAATCATCCAAGCATAACATAGACATTAA
S .....G.....
X3 .....
cp ..C..T...G.....A..T.....T.....C....A..G.....G.....T....C..
HB ..C....A.....T.....C.....G..T..A..G..G....T....C..

3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
MS GACCAATGCACAGATTTTCTAGGCACATTGTCAATAATGCGCCTGACTGGTGAGGGTCCCACCTTTGATGCAAACACTG
S .....C.....T.....A.....T.....
X3 .....A..G..T.....T.....
cp ..A..C....A.....T.....TC....C....A..C....A..A..C..A..A.....C..T...
HB A..A....G....C..T..C..T..CC....G..C....A..A..C....A....C..A..A.....C.....

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
MS AGTGCAACATAGCATAACCCATACTAAGTTTGACATCCCAGCCGGAAGTCTCAAGTGTATGCAGGAGACGACTCAGCA
S ....T.....G.....A.....C.....C.....T.....
X3 .....T.....C..A.....T.....C...
cp .....C..C..TT..A..C..C.....A..C..A..T..A.....C..T..C..T....G..G
HB .....T..C..T..A..C..C.....A..C..A..C.....G..T..T....G..G

4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160
MS CTGGACTGTGTTCCAGAAGTGAAGCATAGTTTCCACAGGCTTGAAGACAAATTACTCCTTAAGTCAAAGCCCGTAATCAC
S ....T..C.....G.....C.....C.....T.....
X3 ....T..C.....C.....T.....
cp ..A.....T.....A..C.....G.....T..G..GT..A..C....C....G..C....
HB T..A.....A..C....G..C..T.....T..G..G..T.....C....G..C....

4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240
MS ACAGCAAAGAAAGGCAGTTGGCCTGAATTTTGTGGTTGGCTGATTACACCAAAGGGGTAATGAAAGACCCGATTAAGC
S ...A.....A.....
X3 G.....G.....C.....A.....
cp C.....A.....C....C....A..T..A..C....G....A..C.....C..C..AT
HB C....G.....A.....C..A..T..A..C.....A..T.....T..C..A..

4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320
MS TCCATGTTAGCTTAAAAATTGGCCGAAGCTAAGGGTGAAGTCAAGAAATGTCAAGATTCCTATGAAATTGATCTGAGTTAC
S .....T.....
X3 .....T.....
cp .G..C..G....G..GC..C..T.....A..G..G..G..G..G....G..C..G....G..A..C.....
HB .A..C..G..TC..G..GC..C..G....A..A..G..G..G....G..C..G..C....C..G.....C...

4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
MS GCTTATGACCACAAGGACTCTCTGCATGACTTGTTCGATGAGAAACAGTGTCCAGGCACATACACTCACTTGCAGGACT
S .....
X3 ..C.....
cp ..C..C.....A.....T.....T.....G.....C..A.....G..A.....CT..
HB ..C.....A.....TC..T.....A..C..A..G..C....A..A.....T..

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480
MS AATCAAGTCAGGAAGAGGCACTGTCTCACTTCCCCGCCTCAGGAACCTTCTTTAACCGTTAAGTTACCTTAGAGATTTGA
S .....G.....
X3 .....G.....A.....T.....T.....
cp ..A....C...C..G.....TAGC.....A..T..C..A.....A..TT..C...
HB G..A....T...C..T....A..AGT..C.....A..T.....A..TT..C...

```

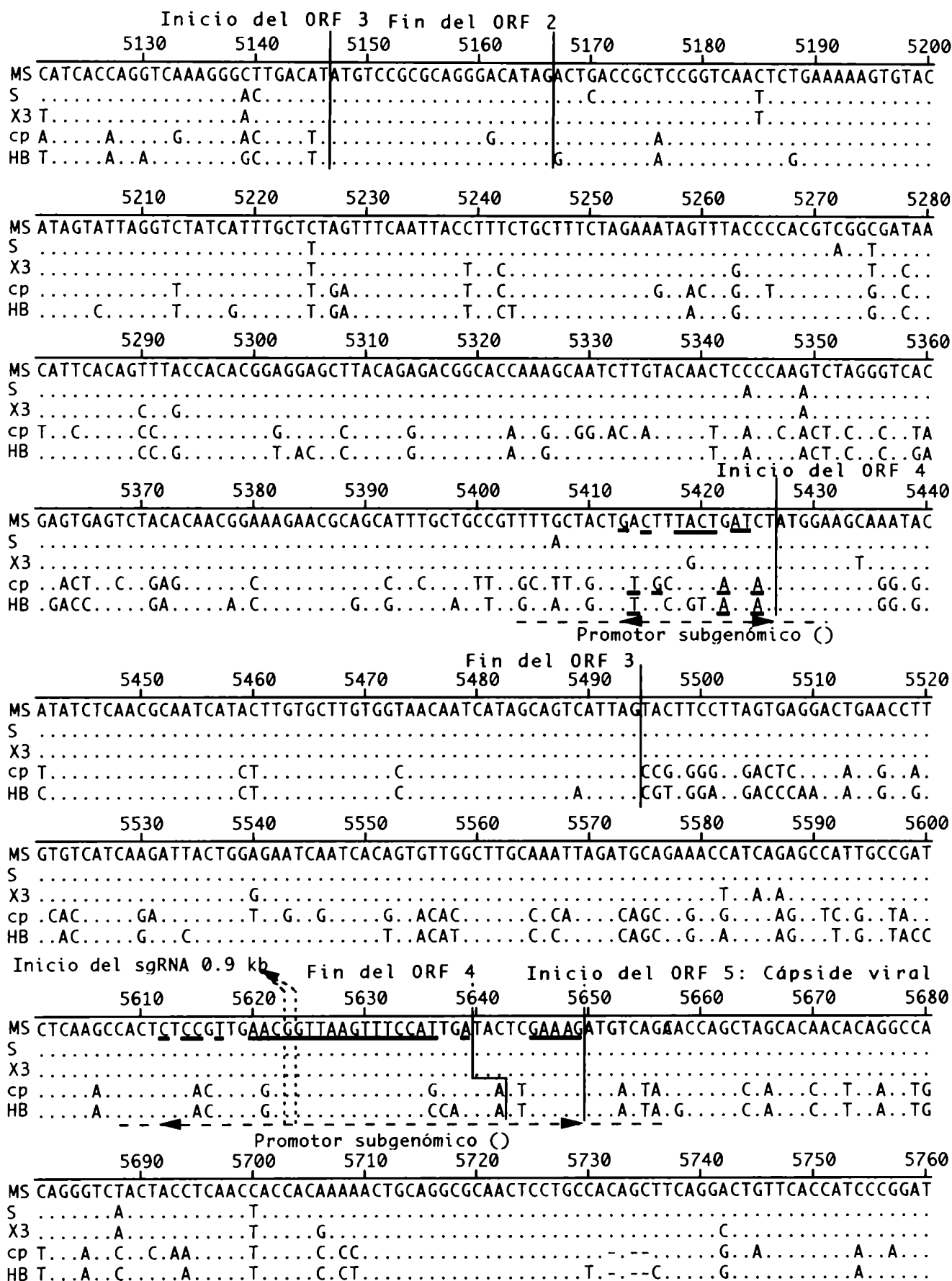
Fin del ORF 1

Promotor subgenómico

Inicio del sgRNA 2.1 kb

Promotor subgenómico

↓ Inicio del ORF 2: proteína de movimiento
 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 MS ATAAGATGGATATTCTCATCATTAGTTTGAAAAGTTTAGGTTATTCTAGGACTCATAAAATCTTTAGATT CAGGACCTTTG
 S
 X3G.....TC.....
 cpC.....A...GC..GGC.....CA.T..C..A
 HBC.....A...TC..G.C.....T.....A
 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640
 MS GTAGTACATGCAGTAGCCGGAGCCGGTAAGTCCACAGCCCTAAGGAAGTTGATCCTCAGACACCCAACATTCACTGTGCA
 S
 X3A.....C.....
 cpG..C..T..T...T...A.....T..A...C...C..C.TGCAC....T.G..C....A..A..
 HBC..T..T...T..T..A..A..T..T..A..GC.A.....C.TGCA....T.G..T....AA.A..
 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720
 MS TACTCTCGGTGTCCTTGACAAGGTGAGTATCAGAAGTCCAGGACCTATTCTGAGGGCAATTTG
 SC.....
 X3
 cp C..T..T..A....A..T..A.C....A..G..C..G.....A..C..C..A.....T..
 HB C..C..T..A....A....A.C..C..T....C..G.....A.....A.....CA.....
 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 MS CAATCCTTGATGAGTATACTTTGGACAACACCACAAGGAAGTCCATACCAGGCACCTTTTGGCTGACCCTTATCAGGCACCT
 SC.....
 X3C.....
 cp .C....G..C....C..GC....GCA.....G.GG.T....A..T..C....A..T..G.....A
 HB .C.....A..C..AC....GCG.....G.AG.T....A..T..C....A.....G.....G..A
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880
 MS GAGTTTAGCCTAGAGCCCACTTCTACTTGGAAACCTCATTTCGGGTTCCGAGGAAAGTGGCAGATTTAATAGCAAGTTG
 SA.....G.....G.C..
 X3A.....A.....G.....TG.C..
 cp ..AC.C..T..C.....C..CA..ACC..A.CC...CA..T.CC..G....T..C..
 HB ..AC.C....T....T..T....C.A.....C..CA..ACC..A.A....CA..C.C.....T..C..
 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960
 MS TGGCTTTGATTTTGGACCAACTCACAGGAAGAAGGGCACTTAGAGATCACTGGTATATTCAAAGGGCCCTACTTGGGA
 SC.....C.....C.....AA.....T.....
 X3C.....C.....T.....T.....C.....A..
 cp C.....C.....T..G..A....G..A...C.C.....A..G.....G..A..T.G..A..A..
 HB C..T..C..C....A..T..T..G.....G.....TC.C..G.T..A..A.....G..A..TT...A..C..
 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 MS AGGTGATAGCAATTGATGAGGAGTCTGAGACAACACTGTCCAGGCATGGCGTTGAGTTGTTAAGCCCTGCCAAGTGACT
 SC.....C.....C.....AA.....T.....
 X3C.....T.....T.....
 cpT..C..A..CTCA...G...A..G..TT...T....C..A....A.....G.....C..G
 HB ...A..T..C..A..CTCA...G.G..A....C....T..A..C..A..C.....C.....G.....G..C..G
 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120
 MS GGAAGTTGAGTTCAAAGTAGTCACTATTGTGTCTGCCGCACCAATAGAGGAAATTGGTCACTACAGCCTTTTACAACGC
 SG.....G.....C.....C.....T..C.....
 X3G.....C.....C.....T..C.....
 cp ..T..G..A...CCG.....C..C....C..A..C..G..C..A.....C.....C..TCTG..C.....
 HB ..T..G..A...CC..G....C..C....A..A..T....T.....C.....C..CCTG..C.....



5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840
 MS GGGGATTTCTTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTTGCAACAAATGAGGACCTCAGCAAGATTGAGGC
 SG.....G.....G.G.....G.....
 X3T....C.....T..C.....
 cpC....C..C..C..AAAG...G.G..C..T.....G..C..C..C.....T...GC...A..AC...A
 HBC....C..C..C..AAAG.TCG.T..G..T.....C..C.....A.....A.CT....AC..AA

5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920
 MS TATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACCATGGCACAGGCTGCTTGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGG
 S .G.....T.....T.....T.....
 X3 .T.....T.....T.....
 cp A.....A..AA.T..TT.....T.....T.....A.....G.....T..C..C..C.
 HB G.....A.....AA.T..TT.G.....T.....T..A..A.....G..G.....T.....C..T.

5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 MS GCTCATCTGCTCAAACAGAAATGATAGATACAGGTCCTATTCCAACGGCATCAGTAGAGCCAGACTGGCAGCAGCAATT
 SG.....C.....C.....C.....
 X3 .A.....T.....C.....T.....C.....
 cp .G..C.....C.....T.....GC..C.....A..C.....T..GG....CC.G..T.....T.....
 HB .G..T..C.....G..T..G.....GC..T..C..A..C..A..T..AG.....T..GT.A..T..T.....

6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080
 MS AAAGAGGTGTGCACACTTAGGCAGTTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAAGTGGATGCTGACTAACAACAGTCC
 SA.....
 X3A.....T.....T.A.....
 cpG.....C.....AA.....C.....C.....C..A.....C..
 HBA.....A..A.....C.....G.....T.....C..C.....C..G.....C..

6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160
 MS ACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTAAGCCTGAGCACAAATTCGCTGCATTGACTTCTTCAATGGAGTCACCAACC
 SG.....C.....
 X3C.....
 cp ...G..C.....G.....C..C.....G.....A..C..T.....TG.....T..T..
 HB ...A.....T.....G..C..C.....G..A.....A..C.....TG.....

6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240
 MS CAGCTGCCATCATGCCCAAAGAGGGCCTCATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAAGTCTGCCTTT
 SG.....T.....
 X3G.....T.....
 cp .C..A..T...CT.....G.....GA.A..T.....A.....C.....
 HB .T..A.....CC..A.....A..G.....AA...T...T...G..A..G.....C..T.....A...C

6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320
 MS GTGAAGATTACGAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGGTCGTATCACTGG
 SA.....
 X3A.....
 cpC..C.....G.....G.....T..G.....C..G.....A.G..C..C.....A..
 HBC..T.....G.....T..G.....C..G.....A...C..C.....C..

Fin del ORF 5: Cápside viral

6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 MS AACAAACACCGCTGAGGCTGTTGTCACCTCTCCACCACCATAA|CTACGTCTACATAAACCGACGCCTACCCAGTT|CA|A
 SA.....
 X3A.....
 cp ...G..TGTT..A..A..A.....TT.A..A..C.....C.....G..T.....
 HBCG.T..A.....A..T.A..A..C.....C.....G..T.....

Promotor de cadena negativa

6410 6420 6430

MS GTATTTTCTGGTTTGATTGTATGAATAATATAAAT
S
X3
cp
HB

Tabla 4.1: Similitud y divergencia entre las secuencia de los genomas de las distintas cepas de PVX.

		Similitud (%)					
		Genoma					
Divergencia (%)		MS	S	X3	cp	HB	
	MS		97.2	96.3	77.5	78.1	MS
	S	2.8		96.2	77.3	77.9	S
	X3	3.7	3.8		77.4	78.2	X3
	cp	22.3	22.6	22.4		87.0	cp
	HB	21.7	22.0	21.6	13.0		HB
	MS	S	X3	cp	HB		

Secuencia de aminoácidos de las proteínas de PVX MS

En las figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran la secuencia de aminoácidos de las proteínas de PVX MS codificadas por los ORF 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En éstas, las secuencias de PVX MS son comparadas con las respectivas proteínas de las cepas S, X3, cp y HB; en la figura 5.6 se agregan las proteínas de cápside de las cepas DX, DX4, UK3 y CP4 ya que esta porción del genoma ha sido secuenciada y publicada para estas cepas. En las distintas figuras se muestran los dominios funcionales identificados dentro de cada proteína y que pudiesen tener relación con su función biológica. Las tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 resumen las comparaciones de las figuras anteriores al mostrar la similitud y divergencia entre las proteínas de las distintas cepas para los ORF 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Figura 4.2: Secuencia de aminoácidos del ORF 1 (replicasa) de PVX MS y su comparación con la proteína replicasa de otras cepas del mismo virus (S, X3, cp y HB). Están indicados los dominios conservados entre las replicasas virales.

	10	20	30	40	50	60	70	80
MS	MAKVREYVQSFTDSTTKTLIQDEAYRNIRPIMEKHKLANPYAQTVEAANDLEGFGIATNPYSIELHTHAAAKTIENKLL							
S	S							
X3							
CPS.....I.....							
HBS.....							
	90	100	110	120	130	140	150	160
MS	VLGSILPQEPVTFMFLKPRKLNMRNPRIKIDIFHNVAIEPRDVARYPKETIIDKLEITTTDAYISDTLHFLDPSYIVE							
S	S.....G.....							
X3E.....							
CPl.....F.....H.A.E.....							
HBL.....F.....H.A.K.....							
	170	180	190	200	210	220	230	240
MS	TFQNCPKLQTLYATLVLPVEAAFMESTHPNIYSLKYFGDGFQYIPGNHGGGAYHHEFSLHQWLKVGKIKWRDPKDSFLG							
S	S.....							
X3A.....							
CPS.....TD.....GL.....							
HBSV.....GL.....							
	250	260	270	280	290	300	310	320
MS	HLNYTTEQVEMHTVTVQLQESFAANHLYCIRRGDLLTPEVRTFGQPDYVIPPQIFLPKVHNCKKPKILKKTMMQLFLYVR							
S	S.....							
X3							
CPH...DT.....NMM.....L.....							
HBH...DT.....NMM.....L.....							
	330	340	350	360	370	380	390	400
MS	TVKVAKNCDIFAKVRQLIKSSDLKYSAVELVYLVSYMEFLADLQATTCFSDTLGGLLTKTLAPVRAWIQEKKMQLFGL							
S	S.....							
X3							
CPR..F.....A.....C.....							
HBI.....F.....A.....C.....							
	410	420	430	440	450	460	470	480
MS	EDYAKLVKAVDFHPVDFSFVKVETWDFRFHPLQAWKAFRPREVSDVEEMESLFSGDGDLDCFTRMPAYAVNAEEDLAAIRK							
S	S.....N.....							
X3T.....							
CPV.....WR.....TQ.GM.....Q.S.L.....NNF.D.....GM.G.....							
HBWR.....N..GM.....Q.S.L.....NNF.D.....GM.G.....							
	490	500	510	520	530	540	550	560
MS	TPETDVGQEVKEPAGDRNQYSNPAETFLNKLHRKHSREVKHQAAKKAKRLAEIQESMKAEGEAEPNEMSGGMGAIPSNAE							
S	S...M.A.....S.....R.....S.....							
X3	...M.....V.....R.....T.....							
CP	NNQEETSTAPR..E.EKKE.I.....D..T...N..TRSR.....D..NRDRTE.GSHKTPN..EA...D							
HB	DNQGETSTAPR..E..KKE.V.....D..T...N..T.SR.....D.INRDQTE.ESQGAPN..EA.....							

	570	580	590	600	610	620	630	640	
MS	LPSTSGARQELTLP	SKVPPARWEDAS	FTDSSVEEEQVK	LPGKEAVETATQ	QVIEGLPWKHWIP	QLNAVGFKALEI	QRDR		
ST.....	
X3	..G..D.....T.....R..L..E...K.....L.....	
cp	..GVNEVEAGT.F..L..AL..QK.....S.....	TIDPTEII..E..DDKA...K..VV.....L.....	
HB	..G..N..GAGT.F..L..AL..QK.....	MTDQMEIM.....	V...K..VDE.....L.....	
	650	660	670	680	690	700	710	720	
MS	SGTMIMPITEMV	SGLKEDFPEGTP	KELARELLAMNR	SPATIPLDLLR	RDYGSDVKNKR	IGAITKTQATS	WGEYLTGKI		
SA.....	
X3V.....	
cp	N.....	F..D..F.....	FA..K.....	T.....A.....	
IIB	N.....	FE..D..E.....	EA..K.....	T.....A.....	
	730	740	750	760	770	780	790	800	
MS	ESLTERKVATC	VIHGAGGSGKSH	AIQKALREIGK	GSDITVVLPTN	ELRLDWSKKVP	NTEPYMFKTYE	KALIGGTGS	IVIF	
SA.....	
X3	
cp	..P..A.....	
HB	..P..A.....	
	Motivo NTPasa - helicasa								
	810	820	830	840	850	860	870	880	
MS	DDYSKLP	PGYIEALICFY	SKIKLVILTG	DSRQSVYHETA	EDASIRHLGP	ATEYFSKYCR	YYLNATHRN	KKDLANMLG	VVYS
S
X3V.....I.....
cp	VS..ST.....T.....SD.....	V..A.....
IIB	VS..ST.....I.....SD.....	V..A.....
	890	900	910	920	930	940	950	960	
MS	ERTGVTEISMS	AEFLEGIPTLV	PSDEKRRLYM	GTGRNDFTY	AGCQGLTKPK	VQIVLDHNTQ	VCSANW	MYTALSRA	TDR
S
X3K.....
cp	..T.....	S.....	V.....S.....
HB	..T.....	S.....	V.....K.....
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
MS	HFVNTSANS	SAFWEKLDST	PYLKTFLSV	VREQALREY	EPAEAEPIQ	EPEPQTHM	CVENEESV	L E E Y K E E L L E K F D R E I H S	
SK.....R.....	
X3	
cp	..I.....	H..K.....K.....	
HB	..I.....	V.....R.....	
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
MS	ESHGHSNCV	QTFDTTIQI	FSHQQAKDE	LLWATIDAR	LKTSNQFTN	REFLSKKD	IGDVLFLNY	QKAMGIPK	FRTPF
S
X3A.....
cp	DA.....	E.....	S.....	R.....P.....
HB	A.....	V.....	S.....	R.....R.....P.....

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 MS VWEACAHEVQSKYLSKSKCNLINGTVRQSPDFDENKIMVFLKSQWVTKVEKLGLPKIKPGQTIAAFYQQTVMLFGTMARY
 S
 X3
 cp
 HB

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 MS MRWFRQAFQPKVEGINCETTPEDMSAWALNNWNFSRPSLANDYTAFDQSQDGAMLQFEVLKAKHHICIPEEIIQAYIDIKT
 S
 X3 V
 cp S T
 HB S T
 Consenso de polimerasa

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 MS NAQIFLGLTSLIMRLTGEGPTFDANTECNIAAYTHTKFDIPAGTAQVYA^HGDD^ISALDCVPEVKHSFHRLEDKLLKSKPVITQ
 S
 X3
 cp F Q
 HB F I Q
 Consenso de polimerasa Motivo GDD

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 MS QKKGSWPEFCGWLITPKGVMKDPIKLVSLKLAEA^HKGELKCCQDSYEIDL^ISYAYDHKDSLHDLFDEKQCAHTLTCRTLI
 S
 X3
 cp R
 HB
 Consenso de polimerasa

1450
 MS KSGRGTVSLPRLRNFL
 S
 X3
 cp K...
 HB

Figura 4.3: Secuencia de aminoácidos del ORF 2 (proteína de movimiento) de PVX MS y su comparación con la misma proteína de otras cepas del virus (S, X3, cp y HB). Las secuencias recuadradas muestran regiones con homología al dominio con función NTPasa helicasa

	10	20	30	40	50
MS	M D T I I I S I K S I G Y S R T H K S L D S G P I	V V H A V A G A G K S T A L R K I I	I R H P I I T		
S
X3	S	S
cp A R P S L A .. S ..
HB	..	S R P L A S

	60	70	80	90	100
MS	V H T I G V P D K V S I R I R G I Q K P G P I P E G N	F A I L D E Y I I D N I	F I R N S Y	Q A I F A D	
S
X3
cp I A E A ..
HB	I I K A E A ..

	110	120	130	140	150
MS	P Y Q A P E F S I F P H E Y L I	I S T R V P R K V A	D L I A S C G F D F E T N S Q E E G H I E I I G		
S G ..		
X3	G		
cp T . T . A .	A
HB T . K . A .	A V

	160	170	180	190	200
MS	I F K G P I I G K V I A I D F F S F T I I S R H G V E F V K P C Q V T G I E F F K V V I I V S A A P I				
S K V ..
X3 I
cp S . A P
HB S . A P

	210	220
MS	F E I G Q S I A I Y N A I T R S	K G I T Y V R A G T B
S B
X3 B
cp	.. L A B
HB	.. I B

Figura 4.4: Secuencia de aminoácidos del ORF 3 de PVX MS y su comparación con la misma proteína de otras cepas del virus (S, X3, cp y HB).

	10	20	30	40	50
MS	M S A Q G H R L T A P V N S E K V Y I V L G L S F A L V S I T F L L S R N S L P H V G D N I H S L P				
S				
X3				
cp I S N				
HB I N				
	60	70	80	90	100
MS	H G G A Y R D G T K A I L Y N S P S L G S R V S L H N G K N A A F A A V L L L T L L I Y G S K Y I S				
S N				
X3 N				
cp V N F . . . T . . S V S R C L .				
HB	. . D N F . . . T . . N . S S R C L .				
	110				
MS	Q R N H T C A C G N N H S S H B				
S B				
X3 B				
cp L B				
HB L N B				

Figura 4.5: Secuencia de aminoácidos del ORF 4 de PVX MS y su comparación con la misma proteína de otras cepas del virus (S, X3, cp y HB).

	10	20	30	40	50
MS	M F A N T Y L N A T T L V L V V T T I A V T S T S L V R T E P C V I K T T G E S I T V I A C K L D A				
S				
X3	V			
cp	G A	F	A	R G . T	T . R
HB	. . G A F A V G . I Q T . R
	60	70			
MS	E T T R A T A D I K P I S V F R L S F H				
S				
X3	. . K				
cp	. . . K . L . N L Q				
HB	. . K L Q				

Figura 4.6: Secuencia de aminoácidos del ORF 5 de PVX MS y su comparación con la misma proteína de otras cepas del virus (S, X3, DX, DX4, UK3, cp, CP4 y HB).

	10	20	30	40	50
MS	M S A P A S T I Q A T G S T T S T T I K T A G A T P A T A S G L F T I P D G D F F S I A R A I V A S				
S V . . .
X3
UK3	.	P I
DX
DX4
cp	. T T . . N . . . V . . . K . . . T N - K . V . . .				
CP4	. T T . . N . . . V . . . T N - K . V . . .				
HB	. T T . . N . . . V T N - K . V . . .				
	60	70	80	90	100
MS	N A V A T N E D L S K I E A I W K D M K V P T D T M A Q A A W D L V R H C A D V G S S A Q T E M I D				
S	D F N T K				
X3
UK3
DX
DX4	.	.	.	P
cp A . . Q E K . I . S G				
CP4 A . . Q E I . S G				
HB T . . Q K I . S G				
	110	120	130	140	150
MS	I G P Y S N G I S R A R L A A A I K E V C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A				
S A				
X3
UK3
DX
DX4
cp V		K		
CP4 V		K		
HB V	K	R		
	160	170	180	190	200
MS	Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L I R P P S E A E M N A A Q T A A F V K I				
S
X3
UK3
DX
DX4
cp D T M				
CP4 D T M				
HB D T				
	210	220	230		
MS	T K A R A Q S N D F A S L D A A V T R G R I T G T T T A E A V V T L P P P				
S	.	.	.		
X3	.	.	.		
UK3	.	.	.		
DX	.	.	.		
DX4	.	.	.		
cp V S				
CP4 V S				
HB A I S				

Tabla 4.2 Similitud y divergencia entre las proteínas del ORF 1 (proteína replicasa) de las cepas de PVX MS, S, X3, cp y HB.

		Similitud (%)					
		ORF 1					
Divergencia (%)		MS	S	X3	cp	HB	
	MS		99.1	98.6	89.4	90.4	MS
	S	0.9		98.1	89.6	90.5	S
	X3	1.4	1.9		89.3	90.0	X3
	cp	10.6	10.4	10.7		96.2	cp
	HB	9.6	9.5	10.0	3.8		HB
		MS	S	X3	cp	HB	

Tabla 4.3 Similitud y divergencia entre las proteínas del ORF 2 (proteína de movimiento) de las cepas de PVX MS, S, X3, cp y HB.

		Similitud (%)					
		ORF 2					
Divergencia (%)		MS	S	X3	cp	HB	
	MS		98.7	98.2	90.7	90.3	MS
	S	1.3		97.8	89.4	89.0	S
	X3	1.8	2.2		89.4	89.4	X3
	cp	9.3	10.6	10.6		96.9	cp
	HB	9.7	11.1	10.6	3.1		HB
		MS	S	X3	cp	HB	

Tabla 4.4 Similitud y divergencia entre las proteínas del ORF 3 de las cepas de PVX MS, S, X3, cp y HB.

Similitud (%)

ORF 3

Divergencia (%)		MS	S	X3	cp	HB	
	MS		99.1	99.1	87.9	87.9	MS
	S	0.9		100.0	88.8	88.8	S
	X3	0.9	0.0		88.8	88.8	X3
	cp	12.2	11.3	11.3		94.0	cp
	HB	12.2	11.3	11.3	6.1		HB
		MS	S	X3	cp	HB	

Tabla 4.5 Similitud y divergencia entre las proteínas del ORF 4 de las cepas de PVX MS, S, X3, cp y HB.

Similitud (%)

ORF 4

Divergencia (%)		MS	S	X3	cp	HB	
	MS		100.0	97.1	74.3	75.7	MS
	S	0.0		97.1	74.3	75.7	S
	X3	2.9	2.9		74.3	75.7	X3
	cp	24.6	24.6	24.6		92.9	cp
	HB	24.3	24.3	24.3	5.7		HB
		MS	S	X3	cp	HB	

Tabla 4.6 Similitud y divergencia entre las proteínas del ORF 5 (proteína de cápside) de las cepas de PVX MS, S, X3, UK3, DX, DX4, cp, CP4 y HB.

ORF 5		Similitud (%)								
		MS	S	X3	UK3	DX	DX4	cp	CP4	HB
Divergencia (%)	MS	97.0	100.0	99.2	100.0	99.6	89.9	90.7	90.3	MS
	S	3.0	97.0	96.2	97.0	96.6	87.8	88.6	88.2	S
	X3	0.0	3.0	99.2	100.0	99.6	89.9	90.7	90.3	X3
	UK3	0.8	3.8	0.8	99.2	98.7	89.5	90.3	89.9	UK3
	DX	0.0	3.0	0.0	0.8	99.6	89.9	90.7	90.3	DX
	DX4	0.4	3.4	0.4	1.3	0.4	89.5	90.3	89.9	DX4
	cp	9.7	11.9	9.7	10.2	9.7	10.2	99.2	96.2	cp
	CP4	8.9	11.0	8.9	9.3	8.9	9.3	0.8	97.0	CP4
	HB	9.3	11.4	9.3	9.7	9.3	9.7	3.8	3.0	HB
		MS	S	X3	UK3	DX	DX4	cp	CP4	HB

Estructura y filogenia de PVX MS

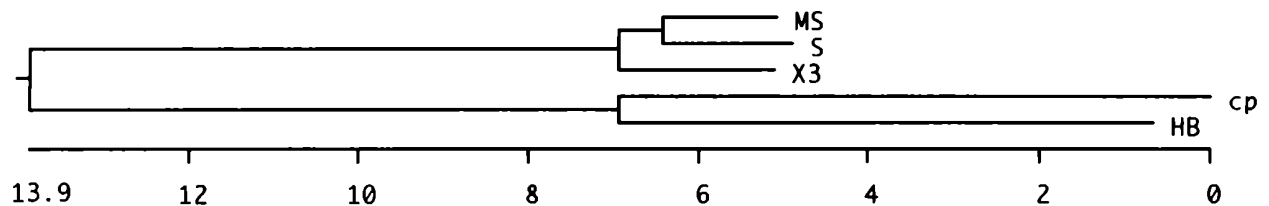
El genoma de PVX MS presenta el mismo tamaño que el de las cepas europeas (6435 nt). La ubicación y longitud de los ORFs corresponde exactamente con lo observado previamente en las otras cepas de PVX (exceptuado el ORF 4 de PVX HB, el cual es un aa más largo). Además, PVX MS no presenta nuevos marcos de lecturas (mayores a 50 aa) ni en la cadena positiva ni en la negativa.

También se encuentran conservados en PVX MS los promotores de los sgRNA (Fig. 4.1) y las secuencias no codificantes de los extremos 5' y 3'. El rol fundamental de todas estas secuencias en la multiplicación viral explicaría el alto grado de conservación de las mismas.

Las proteínas codificadas por los ORFs 1, 2, 3 y 4 de las distintas cepas presentan distintos grados de homología (o similitud). Entre las cepas europeas se observa una similitud que varía entre 97.1 al 100%, mientras que entre las dos cepas andinas la homología presenta un rango de 92 a 96.9%. La similitud registrada entre la cepas europeas y las andinas varía entre 74.3 y 90.7%, observándose los menores valores entre las proteínas del ORF4. Las proteínas de la cepa MS presentan todas mayor homología con las cepas europeas. Esto corrobora lo postulado en base a los datos inmunológicos de la proteína de cápside (reconocimiento por el anticuerpo monoclonal Mab 67). En este sentido, también se observa que la proteína de cápside de PVX MS no presenta la delección del codón 29 característica de las cepas andinas. El fenograma resultante de la comparación de los genomas completos de 5 cepas de PVX (Fig 4.7) también corrobora el origen de esta cepa; y muestra que la cepa MS presenta mayor similitud o parentesco con la cepa S, la cual es de origen ruso.

La perfecta conservación estructural y la alta homología de secuencias que presenta la cepa MS, en especial con la cepa S, indican que no se requiere de mayores muchas sustituciones para adquirir características de virulencia extrema. Esto también se observa en el caso de la cepa HB, la cual muestra una alta homología con una cepa de virulencia menor como lo es la cepa cp.

Figura 4.7: Fenograma basado en la secuencia de nucleótidos completa de las cepas MS, S, X3, cp y HB de PVX. Este diagrama resume los datos presentados en la figura 4.1 y en la tabla 4.1.



Cabe mencionar que los primeros 14 nt de la cepa HB no fueron determinados por los autores (Querci et al, 1993), sino que por la estrategia de clonado y secuenciación empleados se utilizó un primer de 14 nt basado en la cepa cp. Por lo tanto cabe la posibilidad de que en esta porción del genoma PVX HB difiera del resto de las cepas o que el extremo 5' sea más largo, si bien no se observa demasiado polimorfismo en esta región. Por lo tanto los resultados de los análisis comparativos entre cepas podrían diferir ligeramente de conocerse la secuencia exacta de esta porción de PVX HB.

Determinantes en secuencias no codificantes del genoma

En un sentido amplio, se definen a los determinantes de virulencia como aquellas secuencias que directamente determinan la capacidad de infectar a un hospedante en particular, mientras que se consideran determinantes de patogenicidad a aquellas secuencias que, una vez producida la infección, determinan un mayor o menor grado de infección. Como ya se indicó en capítulos previos, PVX MS presenta características de virulencia únicas y también un alto grado de patogenicidad determinado por los altos títulos relativos alcanzados *in planta*. También se mencionó que para el virus PVX han sido identificados determinantes de virulencia en la proteína de cápside que le permiten infectar genotipos portadores de los genes *Rx* o *Nx*. Sin embargo, no han sido determinadas secuencias relacionadas con la patogenicidad. Estos últimos determinantes que permitirían un mayor grado de síntesis de viriones tendrían que afectar la producción de cadenas de RNA y/o la expresión de las proteínas. Por lo tanto, algunas de las secuencias que podrían estar involucradas en el logro de alguno de estos efectos serían: las regiones promotoras de la síntesis de las distintas cadenas genómicas o subgenómicas, los segmentos 5' no codificantes (*leaders*) de los mensajeros virales (genómicos y subgenómicos) y/o las secuencias flanqueantes a los sitios de iniciación de la traducción.

Tabla. 4.7 : Secuencias flanqueantes de los AUGs de inicio de los 5 ORFs de PVX para las cepas MS, S, X3, cp y HB. En el encabezado de la tabla se indica la secuencia consenso para vertebrados según Kozak (1991) siendo las posiciones -3 y +4 las más importantes. También allí se indica el porcentaje de conservación en vertebrados y en plantas de A/G y G en las posiciones -3 y +4 respectivamente. En el cuerpo de la tabla se detallan las secuencias de PVX, resaltándose con mayúsculas y negritas aquellas bases coincidentes con la secuencia consenso.

Posición del nucleótido	-6 -5 -4	-3 -2 -1	+1 +2 +3	+4
Sec. cons. en verteb.	g c c	A/G c c	A U G	G
% conserv. en verteb.		A/G (97%)	A U G	G (46%)
% conserv. en plantas		A/G (93%)	A U G	G (74%)
ORF1 PVX MS, S y X3 PVX HB y cp	u a a u g u	c a a u a a	A U G A U G	G G
ORF2 PVX MS, S, X3, cp y HB	a a u	A a g	A U G	G
ORF3 PVX MS, s y X3 PVX HB y cp	u g a u g a	c a u c u u	A U G A U G	u u
ORF4 PVX MS, S y X3 PVX HB y cp	u g a u a a	u C u u a u	A U G A U G	G G
ORF5 PVX X3, S y MS PVX HB y cp	c g a u g a	A a g A a g	A U G A U G	u a

Las putativas secuencia promotoras de las síntesis de los distintos RNAs subgenómicos (Psg) han sido subrayadas con línea de punto en la figura 4.1 y dentro de estas regiones los nucleótidos coincidentes con la secuencia conservadas del Psg de la cápside de potexvirus (Skryabin et al., 1988a). El análisis comparativo de los distintos Psg de PVX MS muestra que esta cepa no presenta ninguna particularidad que la diferencie en forma exclusiva de las otras cepas.

Los extremos no codificantes 3' y 5' de la cepa MS tampoco muestran ningún cambio que explique la mayor patogenicidad de esta cepa.

Con respecto a las secuencias flanqueantes de los distintos AUGs, y que afectan la eficiencia de inicio de la traducción, de las distintas proteínas de PVX MS, éstas no muestran ninguna diferencia con respecto al resto de las cepas europeas, como se destaca en la tabla 4.7

Por lo tanto, no existen evidencias que indiquen que la mayor patogenicidad y/o virulencia de PVX MS pueda localizarse en alguna de las regiones recién analizadas.

Determinantes de virulencia en las regiones codificantes de PVX MS

En la proteína de cápside

Como se mencionó en la introducción, ha sido comprobado en distintas cepas de PVX el papel preponderante que tiene la proteína de cápside en la inducción de distintas respuestas en el hospedante. En este sentido, son especialmente interesante para el análisis de las propiedades del PVX MS la interacción de los aminoácidos 78 y 122 con los mecanismos mediados por los genes *Nx* y *Rx*, respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de la cepa PVX MS (virulenta frente al gen *Nx*) muestra que ésta no presenta la Pro en el codón 78 (Pro78) que fue encontrada en la cepa DX4 como la mutación responsable de la virulencia frente al gen *Nx* (Santa Cruz y Baulcombe, 1993). Esta situación no es exclusiva de MS, las cepas cp, CP4, y HB, también superan la resistencia mediada por el gen *Nx*, y éstas tampoco presentan la Pro78 de DX4, sino que este codón corresponde a Gln que actúa como determinante de avirulencia en PVX DX.

Con respecto al codón 122, involucrado en el disparo de la resistencia mediada por el gen *Rx*, la cepa PVX HB infecta los genotipos *Rx* debido a que presenta en dicho codón una Lys en lugar de la Thr que muestran las otras cepas avirulentas de PVX (Goulden et al, 1993). La Thr122 no sólo es reconocida por la resistencia mediada por el gen *Rx*, sino que también activa los mecanismos mediados por los genes *Rx_{acl}*, *Rx_{adg}*, *Rx_{cha}*, *Rx_{cur}*, *Rx_{vm}*, y *Rx_{juz}*, (Querci, 1993 tesis) y la respuesta hipersensible en *Gomphrena globosa* (Goulden y Baulcombe, 1993). La secuencia de aminoácidos de la CP del PVX MS presenta una Thr en la posición 122 y sin embargo esta cepa infecta genotipos *Rx_{acl}* (aunque no *Rx_{adg}* que es el usado por Baulcombe).

Estos resultados sugieren que el/los determinantes de virulencia localizados en la proteína de cápside no son los únicos involucrados en el producto de la interacción PVX-gen *Rx*, y éste resulta de alguna forma de la interacción entre los distintos determinantes. Resultados con la cepa recombinante KH2 descritos por Querci (1993b) pueden ser convocados pertinentemente a favor de esta hipótesis. Esta cepa fue creada a partir de PVX UK3 y HB; en el genoma de UK3 fue substituído por la correspondiente región de PVX HB el gen de la CP y el extremo 3' no codificante. Esta cepa recombinante infecta sistémicamente genotipos portadores del gen *Rx* *scr* aún cuando ambos padre (PVX HB y UK3) no lo hacen. En este mismo sentido, es interesante notar que la cepa KH2 produce síntomas más semejantes a los producidos por la cepa UK3 que por la cepa HB (Kavanagh et al., 1992).

En otras interacciones, regiones distintas del gen de la CP han sido involucradas en el resultados de la interacción PVX-hospedante. Para la resistencia mediada por el gen *Nb* se determinó que secuencias a 5' del

gen del CP estarían involucradas en el reconocimiento (A. Forsyth, comunicación personal citada en Santa Cruz y Baulcombe, 1993). En la cepa CP4, además del determinante de la inducción de lesiones necróticas en *Gomphrena globosa* localizado en el codón 122 de la CP, un segundo determinante fue localizado dentro de la región que codifica para los últimos 70 aminoácidos de la replicasa e incluye la región intergénica y los 5 primeros codones del ORF2 (Goulden y Baulcombe, 1993). También en la cepa CP4 se determinó que en la secuencia correspondiente a los genes del bloque triple estarían localizados factores que influyen en la inducción de lesiones en *Chenopodium amaranticolor* (Goulden y Baulcombe, 1993). Esto en su conjunto muestra que todo el genoma de PVX se halla sujeto a presión de selección por parte de los mecanismos de resistencia del hospedante.

El análisis de los resultados obtenidos a partir de MS junto con los datos presentados en la bibliografía indicarían que en PVX MS el/los determinante/s de virulencia frente a los genes *Nx* y *Rx* estarían localizados fuera del gen de la proteína de cápside. Esta hipótesis no se opone a los resultados obtenidos por el grupo de Baulcombe en Inglaterra en torno al rol de la proteína de cápside; sino que simplemente es el producto de la utilización de fondos genéticos distintos. Las cepas recombinantes producidas por el grupo Inglés fueron realizadas sólo sobre los genomas de UK3 o CP4, las cuales pueden presentar el/los mismo/s "alelos" en los potenciales determinantes de virulencia ubicados fuera del gen de la proteína de cápside.

Como consecuencia de estos resultados surgidos de la proteína de cápside de la cepa MS es necesario el análisis de la secuencia del resto del genoma para intentar hallar allí los potenciales determinantes de virulencia que expliquen las características de patogenicidad de esta cepa.

Determinantes devirulencia fuera del gen de la cápside

Los genes de resistencia clonados en distintos hospedantes y contra distintos patógenos, pero que no incluye ningún gen de resistencia a PVX hasta ahora, muestran que las proteínas codificadas por éstos tendrían una estructura y un funcionamiento similar a la de un receptor que participaría en el mecanismo de transducción de señales (Staskawicz et al., 1995; Baker et al., 1997). El determinante de avirulencia funcionaría como ligando del receptor el cual dispararía el mecanismo de resistencia. Este receptor puede estar dirigido a cualquier región de las distintas proteínas virales; como los determinantes de avirulencia de los genes *Rx* y *Nx* que están localizados en distintas posiciones en la cápside y el correspondiente al gen *Nb* que parecen estar localizado en la proteína replicasa. Esto indica que no es posible postular *a priori* la ubicación de un determinante de a/virulencia para un gen dado, y por lo tanto, es necesario recurrir a distintas aproximaciones para poder postular secuencias que pudieren estar involucradas en esta característica fenotípica. En el caso de PVX MS, una de las alternativas es identificar aminoácidos (o combinación de ellos) que sean exclusivos de la cepa y que por esta cualidad sirvan como primera hipótesis de causalidad de la característica también exclusiva de virulencia.

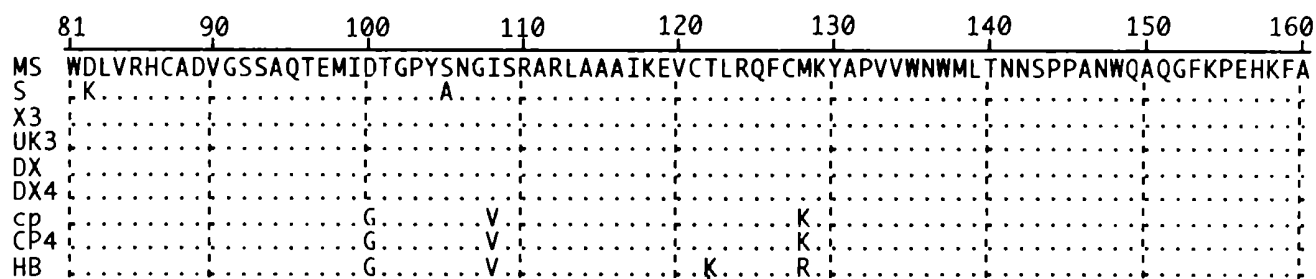
En el proceso de identificación de el/los determinantes de virulencia de la cepa HB, que se sabían localizados en la proteína de cápside, primero, por comparación con las proteína de otras cepas se identificaron aquellas mutaciones exclusivas de HB (8 cambios). Luego se analizó mediante el uso de programas de computación el efecto que éstas podían tener en las propiedades fisico-químicas identificándose aquellos aminoácidos que mostraron tener mayor efecto sobre las propiedades de la cápside. Finalmente, se realizaron mutaciones *in vitro* sobre aquellos codones postulados y se corroboró su efecto *in vivo*.

A manera de ejemplo y de validación de los algoritmos informáticos disponibles se realizó el análisis del efecto que podría tener la sustitución de Thr (T) por Lys (K) en el codón 122 de la proteína de cápside, de manera similar a la realizada por Querci et al., 1993 pero utilizando los algoritmos presentes en el programa

Protean de DNASTar (versión Macintosh). Este resultado se muestra en la figura 4.7. Allí se observa que índice refleja la presencia de la K 122 poniendo de manifiesto una región exclusiva de HB. Así se determinó que la sustitución mencionada no altera o diferencia a HB por sus regiones alfa o beta, por las zonas de plegado o enrollamiento, por la flexibilidad o por la carga negativa (índices 1 al 7, 12 y 14). En cambio, sí lo hace por sus regiones hidrofóbicas, hidrofílicas y por la carga positiva (índices 8 al 11 y 13). Estas posibles modificaciones en las propiedades de la proteína pueden explicar cambios en la afinidad del ligando-receptor y por lo tanto determinar la evasión del virus de los mecanismos de resistencia.

En los resultados de la figura 4.7, es interesante mencionar que la cepa DX4 se distingue de la cepa DX en los mismos índices en que se diferencia HB del resto de las cepas menos en el índice de carga positiva (índice 13). Recordemos que DX4, mutante natural de la cepa DX, es capaz de evadir el mecanismo mediado por el gen *Nx* por presentar la sustitución del aminoácido 78 Q presente en DX por una prolina (P) en DX4 (fig. 4.6).

Fig. 4.7 Propiedades de físico-químicas de la proteína de cápside de PVX HB en la región comprendida entre el aa 70 al 170. En el encabezado se hallan alineadas las secuencias entre los aminoácidos 81 a 160 de las proteínas de cápside de distintas cepas incluidas en el análisis. El codón 122 está resaltado en negritas. En la columna de la izquierda están indicados los índices calculados, denotados a través de los autores que desarrollaron el algoritmo, y las cepas correspondientes a cada análisis. En el cuerpo de la figura se hallan los esquemas resultantes de cada algoritmo para cada cepa (del aminoácido 70 al 170). Los cuadros en negro corresponden a las cepas andinas, mientras que los blancos corresponden a las cepas comunes (o europeas). En color gris oscuro se representan las propiedades de la cepa HB, cuando ésta se diferencia del resto de las cepas. Los resultados de las distintas cepas fueron agrupados cuando éstas presentaban como resultado el mismo esquema.



1) Regiones alfa.

Garnier-Robson HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, S, X3, UK3

2) Regiones alfa.

Chou-Fasman HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, S, X3, UK3

3) Regiones beta.

Garnier-Robson HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, X3, UK3

4) Regiones beta.

Chou-Fasman HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, S, X3, UK3

5) Zonas de plegado.

Garnier-Robson HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, X3, UK3

6) Zonas de plegado.

Chou-Fasman HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, S, X3, UK3

7) Regiones de enrollamiento.

Garnier-Robson HB, cp, CP4
MS, DX, DX4, X3, UK3

8) Regiones hidrofóbicas.

Kyte-Doolittle HE
cp, CP4
MS, DX, X3, UK3
DX4
S

9) Regiones hidrofóbicas.

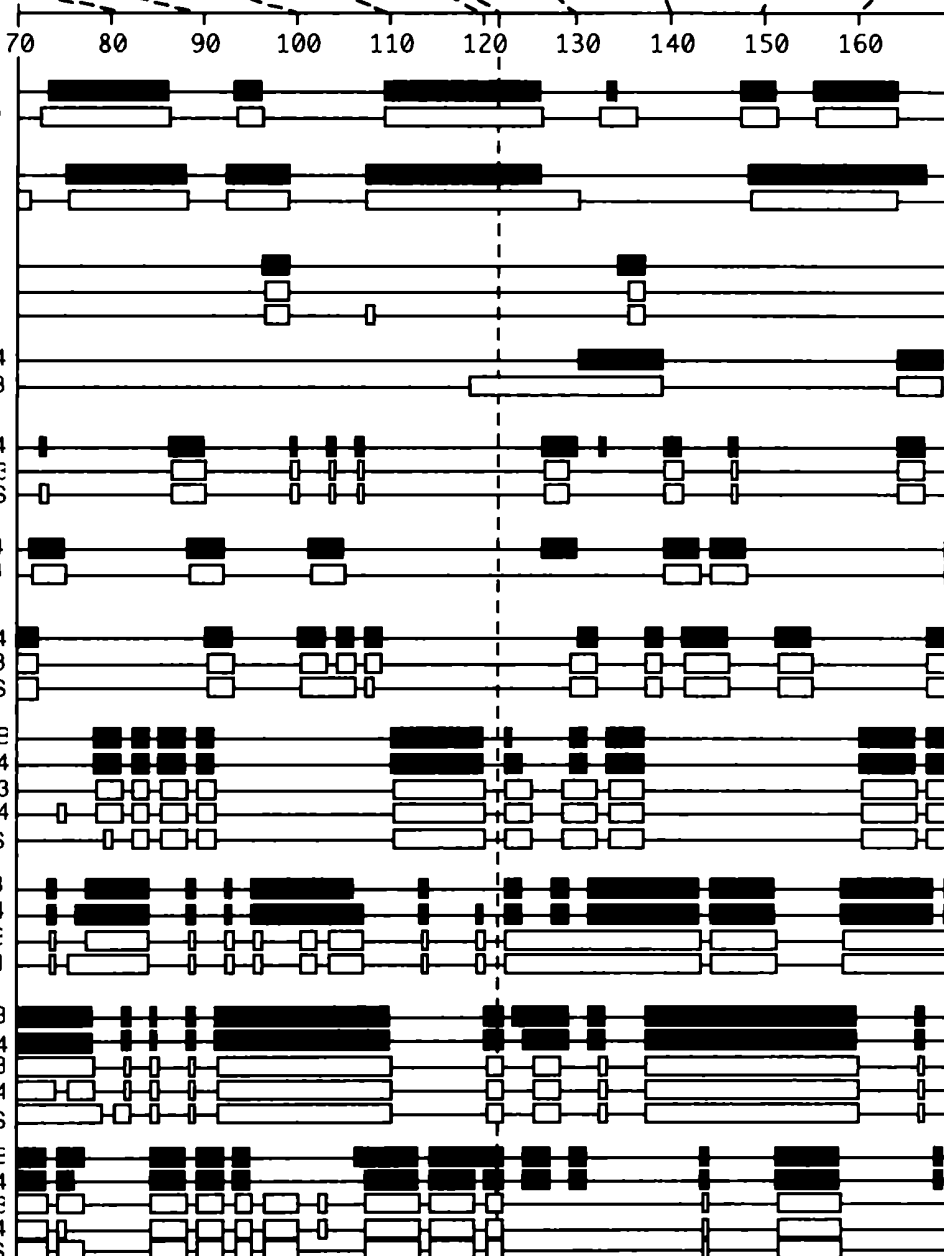
Hopp-Woods HB
cp, CP4
MS, DX, X3, UK3
DX4

10) Regiones hidrofílicas.

Kyte-Doolittle HB
cp, CP4
MS, DX, X3, UK3
DX4
S

11) Regiones hidrofílicas.

Hopp-Woods HE
cp, CP4
MS, DX, X3, UK3
DX4
S



12) Regiones flexibles.En el ORF 1 (replicasa)

En la proteína replicasa se encuentran tres aminoácidos únicos de la cepa MS, éstos son: la treonina 484, la lisina 538 y la serina 576 (Fig. 4.2). Una característica singular en una proteína puede resultar no sólo por la presencia de un aminoácido exclusivo, sino también por una combinación exclusiva de aminoácidos. Así, en la tabla 4.8 se rescatan distintos aminoácidos de la secuencia de la replicasa de la cepa MS. Algunos de estos aa no son exclusivos de MS por si solos, pero sí lo son combinados por lo menos de a dos.

Tabla 4.8: Aminoácidos de la proteína replicasa (ORF 1) exclusivos de la cepa MS o que tomados contiguos de a dos determinan combinaciones exclusivas de esta cepa. La primera columna indica la cepa mientras que la primera fila muestra la posición del aa en la proteína. En negritas se resaltan las posiciones en las que PVX MS presenta aa exclusivos

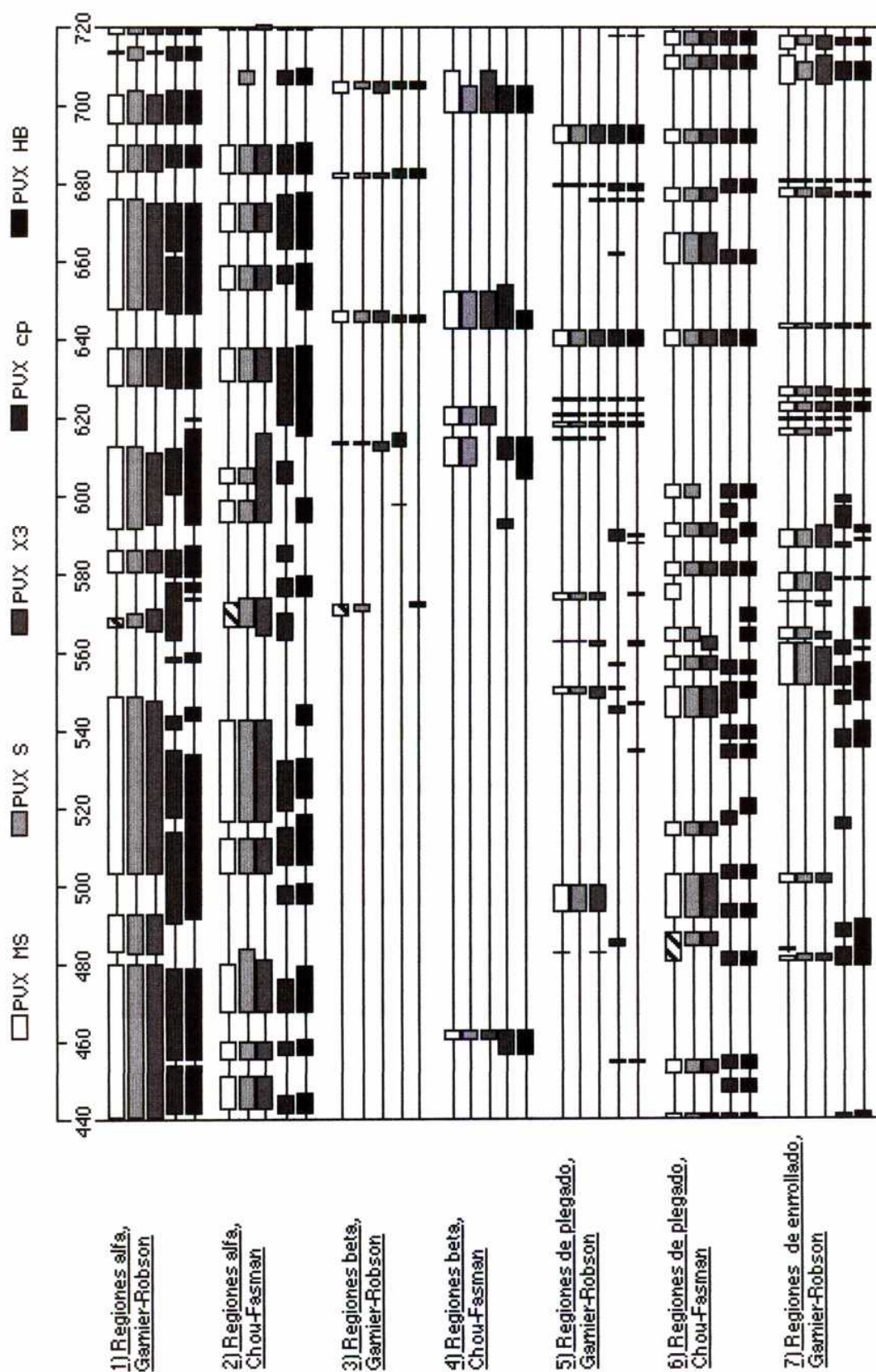
Cepa de PVX	aminoácido										
	450	477	484	509	524	538	544	548	576	674	710
MS	S	A	T	N	A	K	P	M	S	A	T
S	N	A	M	S	A	R	S	M	T	A	A
X3	S	T	M	N	V	R	P	T	T	V	T
cp	N	G	E	D	A	N	G	K	L	A	A
HB	N	G	G	D	A	N	E	G	L	A	A

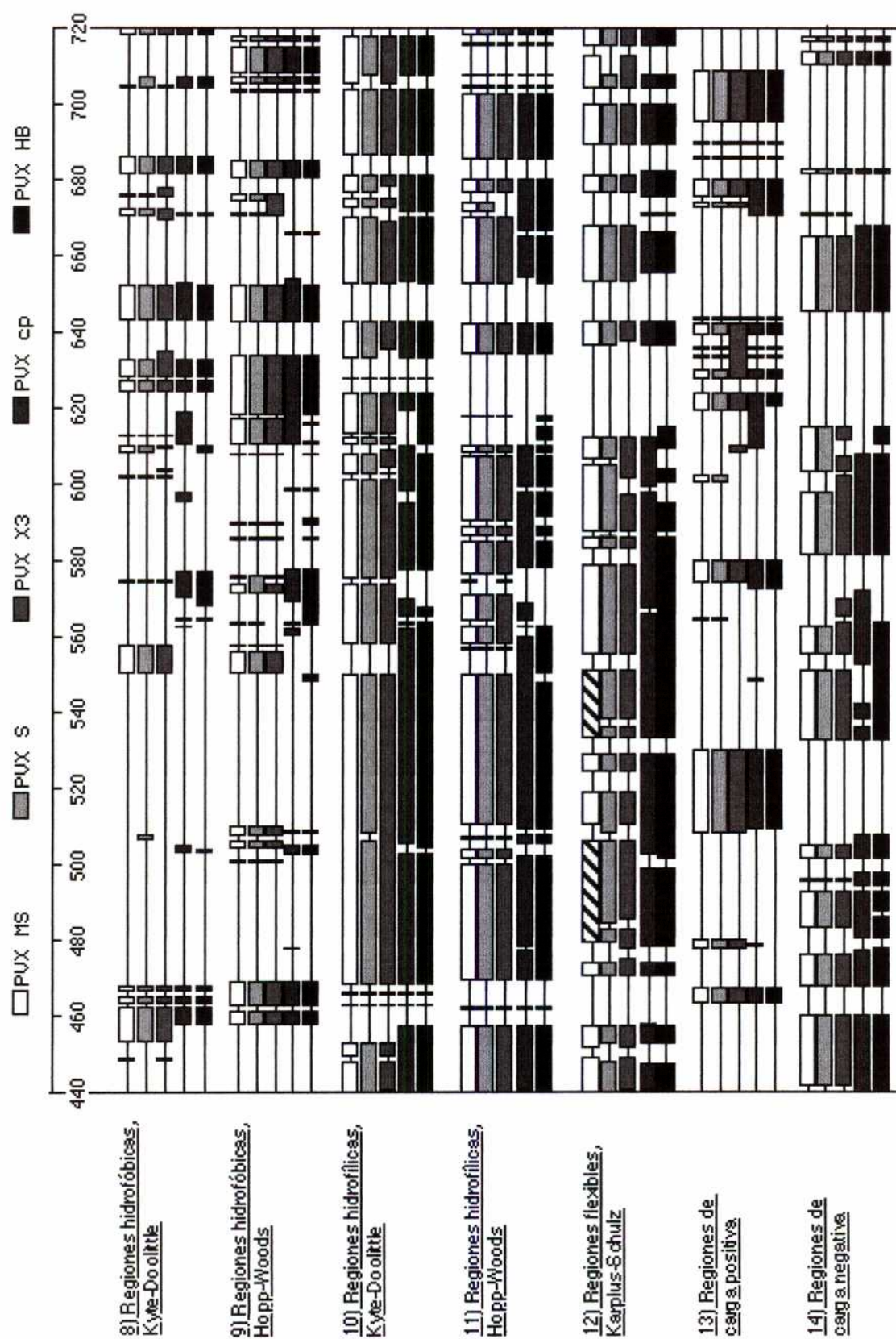
La región comprendida entre los aa 450 y 710 incluye a los aa o combinaciones que son exclusivas de PVX MS. El análisis de las propiedades físico-químicas de la región comprendida entre el aminoácido 440 y 720 de la proteína replicasa (ORF 1) de PVX MS y su comparación con las otras cepas (Fig. 4.8) revela que la cepa MS, en función de su estructura primaria, puede presentar características únicas en su estructura secundaria y/o terciaria. Según los algoritmos analizados, PVX MS muestra en torno al aa 570 una región de estructura alfa (según Garnier-Robson y Chou-Fasman, índices 1 y 2, respectivamente) que por su extensión y ubicación es única en esta cepa. Conjuntamente, en la misma zona se observa una región de estructura beta (índice 3) que es mayor a la observada para las otras cepas en esa misma región. También, el índice de enrollado (según Garnier-Robson, índice 7 de la fig 4.8) presenta una pequeña región diferencial en el aa 484. Sin embargo, todas estas regiones son probablemente muy pequeñas como para que estas estructuras estén realmente presente en la proteína.

PVX MS también presenta una región de plegado (según Chou-Fasman, índice de la Fig 4.8) entre los aa 480 y 590 que es similar a la suma de las regiones que presentan las cepas andinas y las restante europeas en esa misma zona. Para el mismo índice, MS además presenta una región única en torno al aa 576. Otro índice distintivo de MS es el de flexibilidad según Karplus-Shultz (Fig. 4.8. índice 12). Esta cepa se diferencia por su flexibilidad entre los aa 470 y 510 y entre 530 y 550.

El resto de los índices analizados no presentan ninguna característica diferencial significativa.

Fig. 4.8 Análisis y comparación de las propiedades físico-químicas de la región comprendida entre los aminoácidos 440 y 720 de la proteína replicasa (ORF 1) de las cepas MS, S, X3, cp y HB de PVX. Las regiones exclusivas de PVX MS se destacan mediante el llenado con patrón de líneas oblicuas.





En el ORF 2

El ORF2 de PVX MS no presenta ningún aminoácido exclusivo, sin embargo sí presenta combinaciones de aa que sí lo son. Así, en la tabla 4.9 se rescatan los aa (de la fig 4.9) que pueden combinarse en la cepa MS de manera exclusiva con respecto a las otras cepas. La serina 131 de MS forma pares únicos con cualquiera de los aa que le anteceden (121 a 127) e inclusive, un poco más distanciado, con los aa 165 y 167. Los tres aa 173, 189 y 190 también conforman una combinación única en la cepa MS.

Tabla 4.9: Aminoácidos de la proteína del ORF 2 capaces de combinarse de manera única en la cepa MS. La primera columna indica la cepa mientras que la primera fila muestra la posición del aa en la proteína. En negritas se resaltan los aa que forman combinaciones únicas con el resto de los aa.

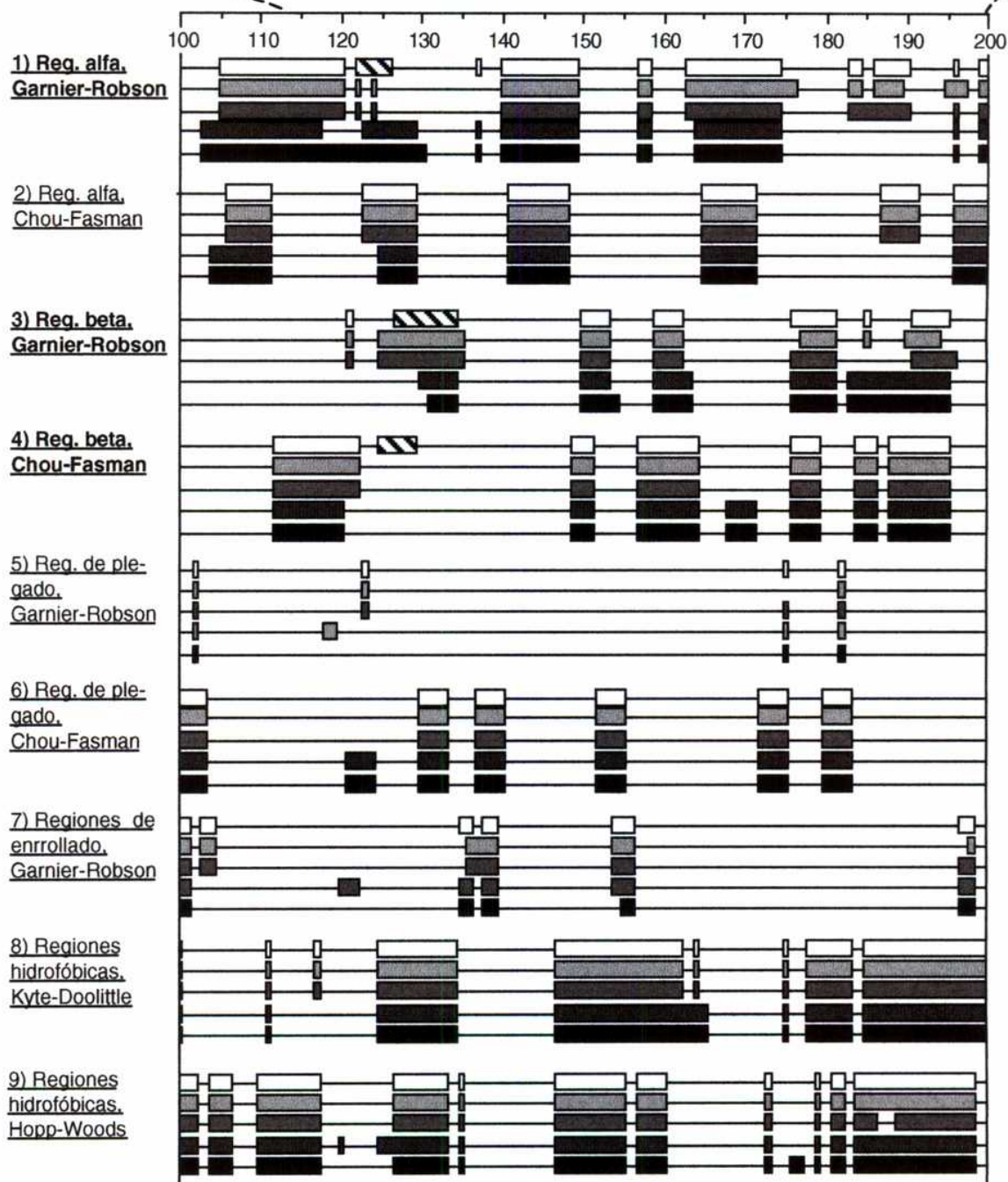
cepa	amino ácido										
	121	123	125	127	131	165	167	173	189	190	194
MS	V	R	V	D	S	E	S	R	F	K	I
S	V	R	V	D	G	E	S	K	F	K	V
X3	V	R	V	D	G	E	S	R	L	K	I
cp	T	T	A	A	S	S	A	R	F	P	I
HB	T	K	A	A	S	S	A	R	F	P	I

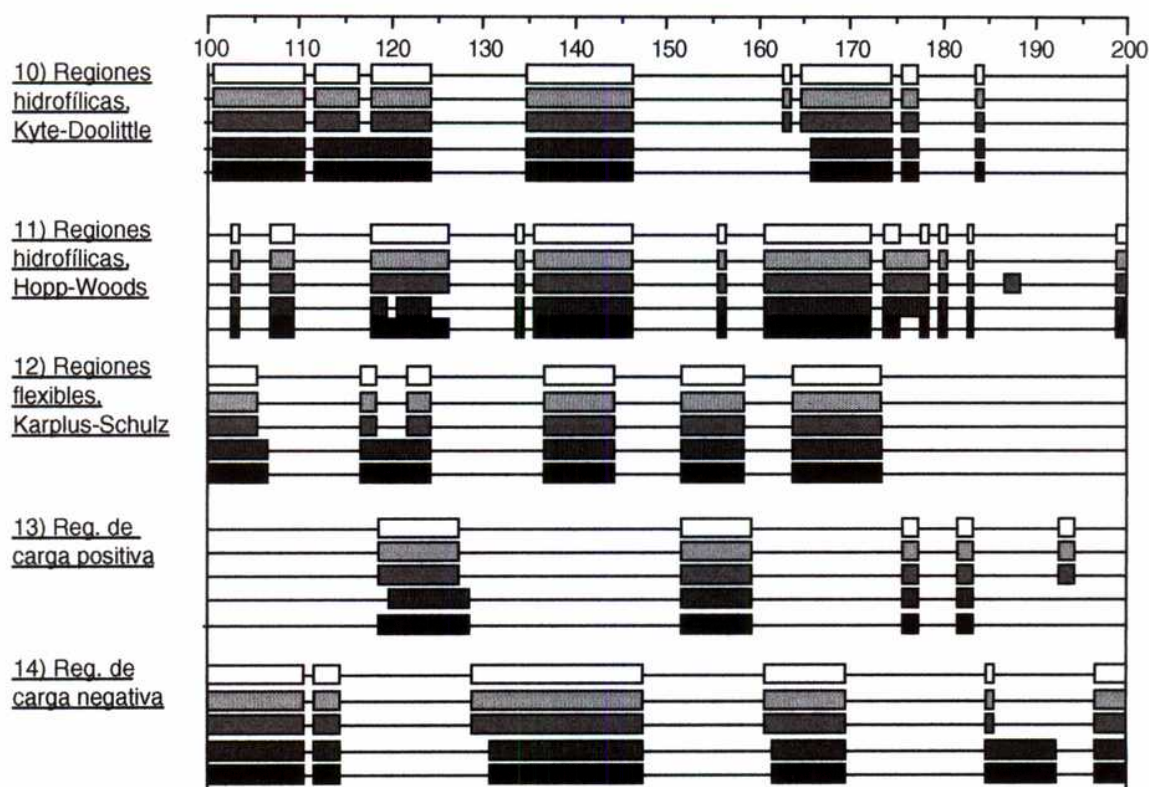
Las características físico-químicas de los aa 100 a 200 de esta proteína (ORF2) para las distintas cepas de PVX (Fig 4.3) muestra que la cepa MS presenta una región exclusiva con estructura alfa, según Garnier-Robson, en torno a los aa 125 y 190 (índice 1), sin embargo esto no se confirma según el algoritmo de Chou-Fasman (índice 2). También se observan características únicas en los índices de estructura beta (índices 3 y 4) en las proximidades del aa 130. Estas regiones son lo suficientemente amplias como para alterar la conformación de la proteína.

Fig. 4.9 Análisis y comparación de las propiedades físico-químicas de la región comprendida entre los aminoácidos 100 y 200 de la proteína de movimiento (ORF 2) de las cepas MS, S, X3, cp y HB de PVX. En el encabezado se hallan alineadas las secuencias entre los aminoácidos 114 a 200 de las proteínas de cápside de distintas cepas incluidas en el análisis y la identificación por cepa se muestra por los tonos del cuadro. En la columna de la izquierda se indican los índices calculados, denotados por el autor del algoritmo. Las regiones exclusivas de PVX MS se destacan mediante el llenado con patrón de líneas oblicuas.

120 130 140 150 160 170 180 190 200
 MS YLETSFRVPRKVADLIASC GFDFETNSQE EGHLEITGIFKGPLLGKV IAIDEESETLSRHGVEFVKPCQVTGLEFKVWTIVSAAPI
 SG.....K.....V.....
 X3G.....L.....
 cpT.T.A.A.....S.A.....P.....
 HBT.K.A.A.....V.....S.A.....P.....

□ PVX MS ▒ PVX S ■ PVX X3 ■ PVX cp ■ PVX HB

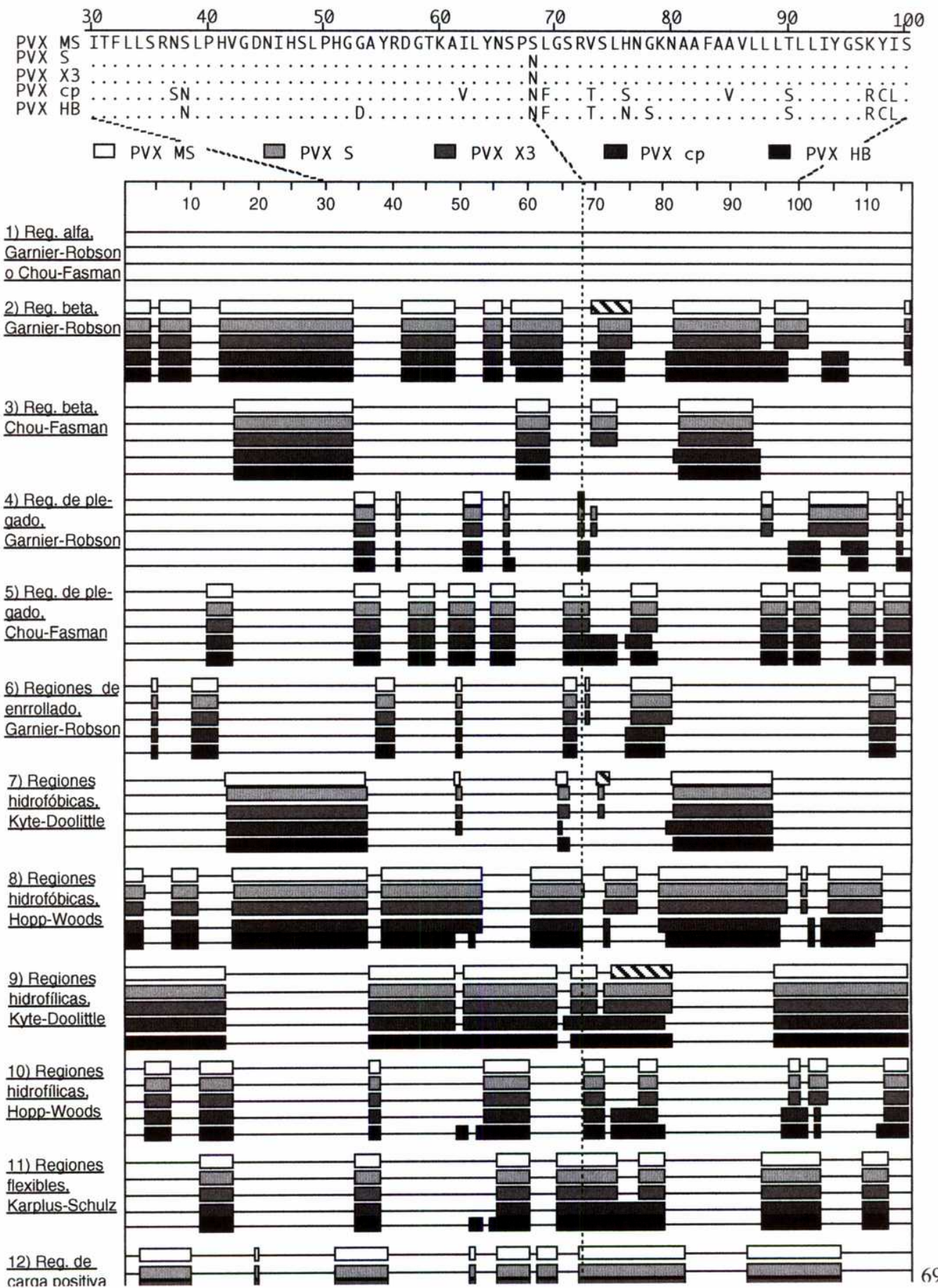




En el ORF 3

Esta proteína muestra un aminoácido exclusivo en la posición 68, una serina (fig. 4.4). En la figura 4.10 se muestra un segmento de la proteína en torno a este aminoácido y la comparación de las propiedades físico-química entre las proteínas de las distintas cepas. De los índices analizados, el de hidrofobicidad según Kyte-Doolittle (índice 7) muestra una pequeña región única en proximidades del aa 70, que es una extensión de la existente en las otras cepas europeas y que falta por completo en las andinas; consecuentemente también se observa una disminución de la región hidrofílica adyacente (índice 9). Por otro lado, los índices calculados según los algoritmos de Hoop-Woods para hidrofobicidad e hidrofiliicidad (índices 9 y 10, respectivamente) no muestran ninguna particularidad por la sustitución de la serina en la cepa MS. Otros índices que si reflejan la presencia de la serina 68 de MS, son los de regiones beta según Garnier-Robson (índice 2) y el de plegado según los mismo autores (índice 4); éstos muestran una ampliación de un área de estructura tipo beta y una disminución de la zona de plegado.

Fig. 4.10: Análisis y comparación de las propiedades físico-químicas de la proteína del ORF 3 de las cepas MS, S, X3, cp y HB de PVX. En la parte superior de la figura se muestra el alineamiento de la secuencia de los aminoácidos 30 a 100 de las cepas mencionadas. En la columna de la izquierda se indican los índices calculados, denotados por el autor del algoritmo. La identificación por cepa se muestra por los tonos del cuadro, como se detalla en el encabezado del mismo. Las regiones diferenciales en los resultados de MS se destacan mediante el llenado con el patrón en líneas oblicuas.



En el ORF4

La proteína codificada por el ORF4 de PVX MS es idéntica a la de la cepa S por lo tanto no presenta aminoácidos o combinaciones de ellos que le sean exclusivos.

Conclusiones

Los análisis hechos de las regiones exclusivas de la cepa MS en los ORFs 1, 2 y 3 muestran que todas ellas pueden tener algún efecto sobre las propiedades de la proteína. No fue así cuando el mismo análisis se realizó sobre las 8 modificaciones exclusivas de la proteína de cápside de PVX HB (Querci et al, 1993 a y b). De éstas sólo 2 mostraron tener efecto sobre alguno de los índices analizados, tal como se ejemplifica en la figura 5.7 para la sustitución por la K 122 de HB. Es difícil estimar la verdadera significancia de estos índices aplicados a la estructura y propiedades de una proteína como la cápside de PVX. Aún más incierta es la predicción de sus efectos sobre la actividad biológica de la proteína.

Cabe considerar también que este análisis por regiones dentro de la proteína no evalúa las combinaciones únicas posibles resultado de la interacción entre aa alejados en la secuencia. Estos aa, aunque distantes en la secuencia, pueden estar próximos en la estructura terciaria y determinar la formación de un dominio conformacional que sea el reconocido por el receptor que media la respuesta de resistencia.

Finalmente, otra alternativa que tampoco es evaluada en el análisis anterior es la posible participación de el/los aa en cuestión en algún tipo de modificación postraduccional, las cuales pueden tener un efecto muy marcado en las funciones biológicas de la proteína. Así, por ejemplo, la treonina 484 de la replicasa o la serina 68 del ORF3 de PVX MS pueden ser susceptibles de glicosilación o fosforilación y así estas proteínas pueden adquirir nuevas propiedades y por lo tanto funciones (ver: implicancias de la glicosilación, sección 5)

Como conclusión, la comparación de las secuencias de las distintas cepas, la identificación de cambios o combinaciones únicas y el posterior análisis del posible impacto de estos cambios sobre las propiedades de la proteína, permite postular aa o regiones involucradas en la determinación del fenotipo de virulencia del virus. Así las regiones analizadas en los ORFs 1,2 y 3 podrían estar involucradas en la determinación del fenotipo virulento de PVX MS.

Estas regiones postuladas deben ser corroboradas mediante la construcción de virus quiméricos. En éstos, se introduce la zona postulada como determinante de virulencia reemplazando la región homóloga de un genoma avirulento y se observa si este cambio tiene efecto sobre la virulencia.

Modificaciones
post-traduccionales
de la cápside de PVX

Sección 5

Estudio de la presencia de modificaciones post-traduccionales en la proteína de cápside

Resultados

La presencia de alguna forma de glicosilación fue el primer tipo de modificación post-traduccionales analizada en la proteína de cápside.

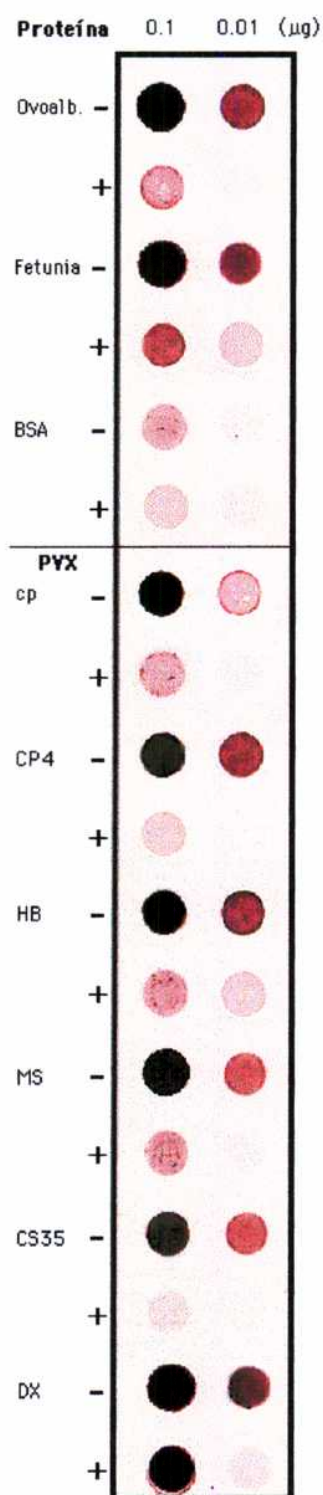
Detección de azúcares y deglicosilación química de la CP

Las proteínas de cápside fueron obtenidas de viriones purificados de 6 cepas (cp, CP4, HB, MS, CS35 y DX, ver M y M para más información) mediante el método de Fraenkel-Conrat (1957) y posteriormente liofilizadas. Las CP así purificadas fueron comparadas con las provenientes de virión sin tratar mediante SDS-PAGE seguido de detección inmunológica. Los resultados indicaron que la purificación de Fraenkel-Conrat no afectó la movilidad de las CPs en los SDS-PAGEs (resultados no presentados).

La presencia de oligosacáridos unidos a la CP fue probada mediante la reacción de oxidación con periodato y la posterior detección de los productos de oxidación por reacción con hidrazina biotinilada. Esto se realizó mediante un ensayo en *dot blot* con muestras de proteína de cápside purificadas y se incluyeron las proteínas fetuina y ovoalbúmina como controles positivos y a la proteína albúmina bovina (BSA) como control negativo. Estos resultados son presentados en la Fig 5.1 ("muestras -", muestras no deglicosiladas) y muestran claramente que las CPs de las distintas cepas de PVX se comportaron de manera similar que los controles positivos glicosilados ya que reaccionaron fuertemente con la hidrazina biotinilada mientras que la BSA (control negativo) no reaccionó.

Para obtener mayores evidencias de la presencia de azúcares y para determinar hasta qué punto éstos afectaban la movilidad electroforética se procedió a la deglicosilación de la CP. Ya que se desconocía la naturaleza del tipo de azúcar unido a la CP se eligió un método de deglicosilación químico inespecífico. La utilización de ácido trifluorometansulfónico (TFMS) proporciona uno de los mejores métodos para el clivado no selectivo de N- y/o O-glicanos presentes en glicoproteínas, dejando intacta la estructura primaria de la proteína (Sojar y Bahl, 1987).

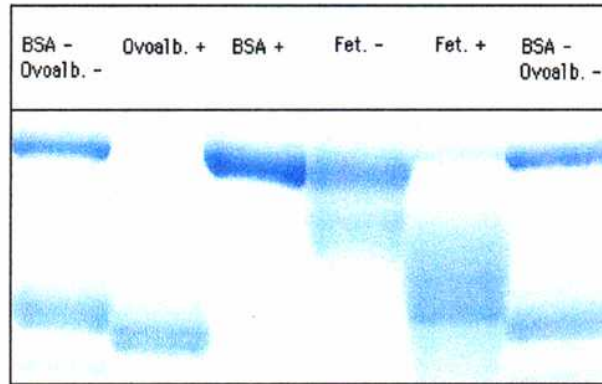
Figura 5.1 : Detección de carbohidratos en la proteína de cápside de 6 cepas de PVX. Como controles positivos se incluyeron las proteínas ovalbúmina y fetuina y como control negativo a la seroalbúmina bovina (BSA). Se sembró CP de las cepas cp, CP4, HB, MS, CS35 y DX. Fueron adheridas 0.1 y 0.01 µg de cada proteína. Cada proteína fue analizada antes (-) y después (+) del tratamiento con TFMS. La detección se realizó mediante la oxidación con periodato. Los productos de esta oxidación se hicieron reaccionar con hidracina-biotinilada y los productos biotinilados fueron detectados mediante estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina y revelados con el cromógeno BCIP/NBT.



La Fig. 5.2 muestra el efecto del tratamiento con TFMS sobre las proteínas control. La movilidad en SDS-PAGE de las proteínas glicosiladas ovoalbúmina y fetuina fueron claramente afectadas, mientras que la

migración de la BSA (no glicosilada) no se altero. Sin embargo, bajo las condiciones usadas, la deglicosilación de la fetuina no fue

Fig. 5.2: Efecto del tratamiento con TFMS sobre la movilidad electroforética de las proteínas ovoalbúmina, fetuina y BSA.



completa como se puede ver en el patrón electroforético (Fig. 5.2) y en la detección de carbohidratos después del tratamiento con TFMS (Fig. 5.1, muestra Fetuina "+"). El efecto del TFMS sobre la CP de las distintas cepas fue caracterizado por SDS-PAGE seguido de tinción por plata (Fig. 5.3). La comparación de las muestra no tratadas (-) con las tratadas (+) indica que la migración de la más lenta de las bandas y que corresponde muy probablemente a la CP intacta (proteína PVX-Ps de Koenig, 1972), fue afectada en todas las cepas, mientras las bandas correspondientes a productos de degradación de la CP permanecieron sin cambios. La magnitud del cambio en la movilidad después del tratamiento químico parece ser el mismo para todas cepas y de aproximadamente 0.5 kDa. Aunque pueden existir pequeñas diferencias en la cantidad o tipo de azúcar ligado a la CP de cada cepa, estas diferencias pueden no ser detectables basándose sólo en el cambio de movilidad electroforética comocriterio.

Por otro lado, el efecto del tratamiento no fue el mismo para todas las cepas de PVX. En las cepas cp, CP4, HB y MS se produjo un aumento de la movilidad electroforética para la más lenta de las bandas, observándose un corrimiento de toda la banda hacia una posición de más bajo peso molecular. En el caso de las cepas CS35 y DX la banda correspondiente a la proteína intacta (la más lenta) es en realidad una doble banda que pudo ser bien distinguida sólo cuando cantidades muy pequeñas de muestra fueron sembradas en el gel (Fig. 5.4). Luego del tratamiento con TFMS la banda superior desaparece (Figs. 5.3 y 5.4). Esto estaría indicando que las muestras de cápside de estas cepas estaban compuestas por proteína glicosilada y por proteína no glicosilada. Esto podría deberse a que durante la purificación del virus y posteriormente de la cápside, por alguna razón (química o enzimática) una proporción de las moléculas de proteínas perdieron sus residuos azucarados. También se puede aceptar que naturalmente estas cepas presentan las dos formas de la proteína, ya que si bien DX presenta la misma secuencia de aminoácidos que MS, los procesos de infección son distintos con efectos también distintos en la célula.

Figura 5.3: Efecto del tratamiento con TFMS sobre la movilidad electroforética de las proteínas de cápside de las cepas cp, CP4, HB, MS, DX, CS35 de PVX

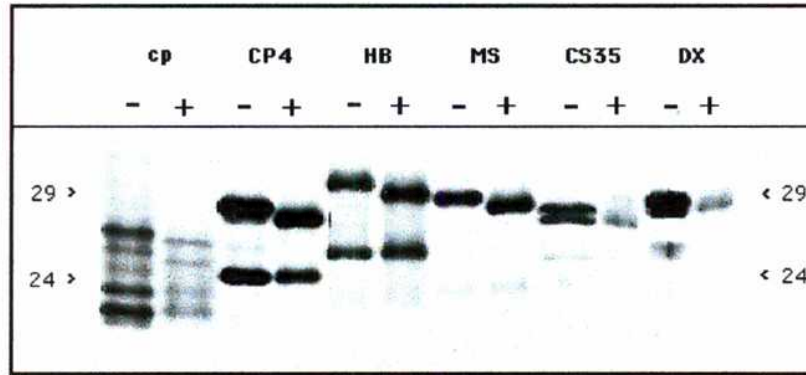
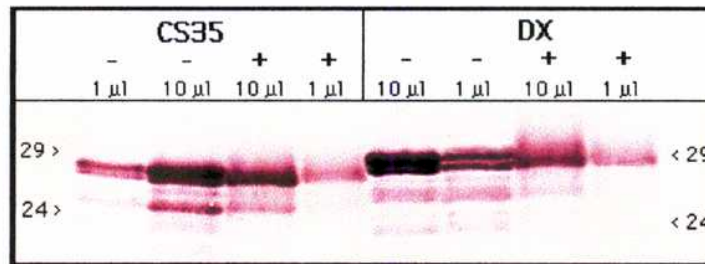


Figura 5.4: Western blotting de las proteínas de cápside de las cepas CS35 y DX, antes (-) y después (+) del tratamiento con TFMS (se sembraron 1 y 10 μ l de cada muestra).

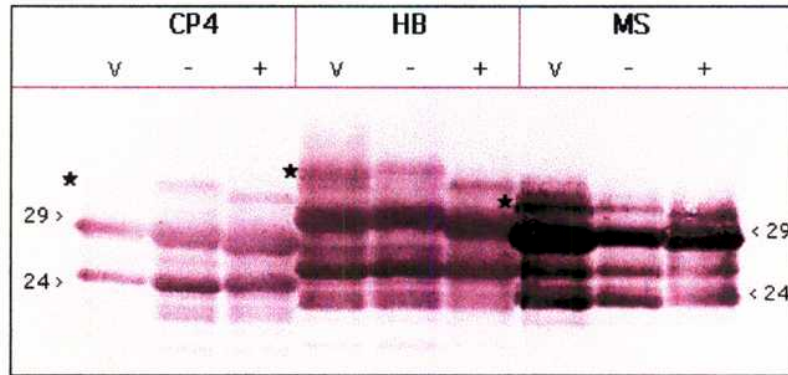


La no detección de carbohidratos en las muestras después del tratamiento deglicosilante con TFMS (Fig. 5.1, muestras +) y los cambios en la movilidad observada en los SDS-PAGE tanto en las proteínas glicosiladas controles (Fig. 5.2) como en las muestras virales (Fig. 5.3 y 5.4) indicarían que las CPs de las cepas de PVX son glicoproteínas.

La banda superior de la cepas DX no desapareció completamente después del tratamiento químico. Los experimentos de β -eliminación descritos posteriormente en este trabajo indican que no se trata de una forma no glicosilada que comigra con la forma glicosilada, sino que se debe a una reacción de deglicosilación parcial tal como ocurrió con una de las proteínas control (fetuína, Fig 5.2).

El análisis inmunológico (*western blotting*) de las CP tratadas y no tratadas con TFMS (Fig. 5.4 y 5.5) confirmó que todas las bandas detectadas mediante la tinción con plata (Fig. 5.3) son diferentes formas de la CP. Además, en las cepas CP4, HB y MS, se detectaron algunas bandas en cantidades menores pero de peso molecular mayor al de la proteína completa y glicosilada (Fig. 5.5, bandas señaladas con un asterisco). En el gel que originó la figura 5.5 se sembró una alta cantidad de proteína y se dejó sobre revelar para mostrar más claramente las bandas de alto peso. Estas bandas muestran un aumento equivalente a 2.5 kDa en las cepas CP4 y HB (30.5 y 31.2 kDa, respectivamente) y de 1.3 kDa en la cepa MS (29.5 kDa). Estas bandas también mostraron una mayor movilidad como consecuencia de la deglicosilación con TFMS.

Figura 5.5: Western blotting de las proteínas de cápside de las cepas CP4, HB y MS antes (-) y después (+) del tratamiento con TFMS, las muestras "v" corresponden a virión purificado sin ningún tipo de tratamiento. Con un asterisco (*) se indica la posición de la banda de alto peso molecular para cada cepa. Los marcadores de 29 y 24 kDa están señalados.



Determinación de la presencia de ácido siálico en la CP

El GlycoTrak kit (Oxford GlycoSystem, UK) permite la detección diferencial del ácido siálico mediante una oxidación en condiciones atenuadas (ver M y M). El ác. siálico es una pequeña estructura hidrocarbonada que se presenta como sustituyente en distintos oligosacáridos de glicoproteínas animales o de virus animales. La CP de las cepas cp, HB y MS fueron tratadas bajo estas condiciones de oxidación suave. En la figura 5.6 se muestra el resultado para la cepa MS. El resultado negativo de estos ensayos muestran que esta estructura no es parte del oligosacárido presente en la CP de PVX.

Figura 5.6: Detección de ácido siálico en la proteína de cápside de PVX MS.



Deglicosilación enzimática de la CP

Se ensayó la deglicosilación de las CPs con las siguientes enzimas endoglicosidasa H, PNGase F, y O-glicosidasa. El resultado del tratamiento de los controles positivos y negativos (ver M y M) se evaluó mediante la observación del cambio de movilidad en SDS-PAGE e indicó que las condiciones usadas fueron correctas (Fig. 5.7). En la figura 5.8 se muestra el resultado del tratamiento de proteínas de cápside de distintas cepas de PVX con las enzimas Endo H y PNGase F simultáneamente. Ninguna de estas enzimas, juntas o por separado (este último ensayo no se muestra) han clivado las CPs como lo muestra la falta de

cambio en la movilidad electroforética. La enzima O-glicosidasa tampoco afectó la migración de las cápsides (resultado no mostrado). Estos resultados descartan la presencia de la mayoría de los tipo de N-glicosilación, indicando que el oligosacárido ligado no es un derivado de alta manosa, un híbrido o del tipo bi-, tri-, o tetracatenario. El O-glicano Galb1'3GalNac1'Ser/Thr, tampoco se halla presente a menos que se halle sustituido, pero de ser éste el caso, el sustituyente no sería ác. siálico como se demostró en el punto anterior.

Figura 5.7: Deglicosilación enzimática de las proteínas ovoalbúmina y asialofetuína mediante las enzimas Endo H y PNGase F respectivamente. La proteína BSA fue incluida como control negativo y como protector de las enzimas en las reacciones.

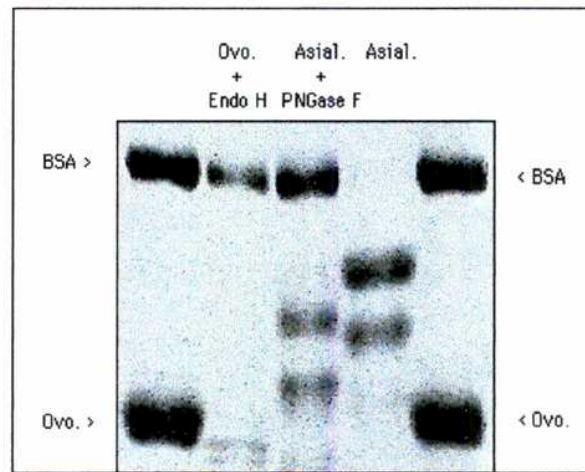
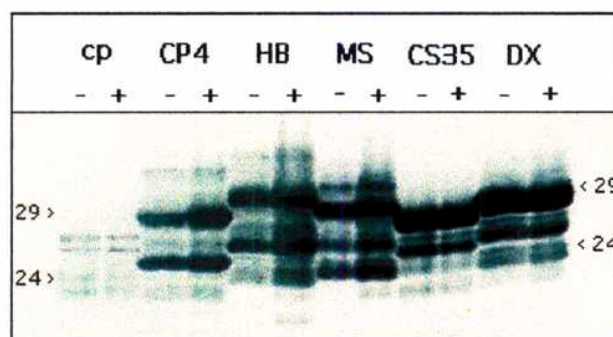


Figura 5.8: Deglicosilación enzimática de las cápsides de las cepas cp, CP4, HB, MS, CS35 y DX de PVX mediante la incubación simultánea con las enzimas Endo H y PNGase F. Muestras no tratadas: -, muestras tratadas: +.



Caracterización de la glicoproteína de cápside mediante lectinas

La afinidad por la CP de PVX de las lectinas GNA, SNA, MAA, PNA, ConA y DSA (marcadas con digoxigenina) fue ensayada para las 6 cepas. Ninguna de las lectinas mostró afinidad por la estructura hidrocarbonada de la cápside (no presentado). Este resultado negativo, en conjunto con los obtenidos del tratamiento con las enzimas, nos permite descartar algunas estructuras terminales en común. Como ya se dijo,

los N-sacáridos del tipo de alta manosa, los híbridos o las cadenas de tipo complejo pueden ser excluidas. Las estructuras α Glc, α Man, α GlcNac, Sa-Gal y Sa-GalNac (presentes en la proteína de cápside de varios virus animales), tampoco parecen estar en la CP del PVX. Los O-sacáridos GlcNac- o Gal β 1 \rightarrow 3GalNac1- pueden ser descartados basados en los resultados de las lectinas DSA y PNA en conjunto con el resultado obtenido con la O-glicosidasa. Sin embargo, estas estructuras podrían estar presentes en una forma sustituida, con fucosa por ejemplo. Por otro lado, no puede ser descartada la presencia de estructuras terminadas con arabinosa, fucosa o xilosa.

β -eliminación de azúcares

La reacción de β -eliminación en condiciones alcalinas suaves es un tratamiento ampliamente usado para elucidar la presencia de oligosacáridos unidos por un hidroxilo. Sin embargo, si el O-glicano está unido a un aminoácido terminal que contiene un amino o un carboxilo libre, la β -eliminación no tendrá lugar (Downs y Pigman, 1976). Los N-sacáridos son resistentes al tratamiento alcalino como lo son las uniones peptídicas. Las condiciones de reacción logradas aquí fueron tales que la movilidad de la BSA (no glicosilada) y de la ovoalbúmina (N-glicosilada) no fue afectada, mientras que la migración de la proteína asialofetuína (O- y N-glicosilada) fue alterada de manera similar que cuando ésta fue incubada con O-glicosidasa (Fig. 5.9). Al mismo tiempo, se puede observar que el incremento en la velocidad de migración de esta proteína luego de la β -eliminación (Fig. 5.9) es menor que cuando fue N-deglicosilada enzimáticamente (Fig. 5.7). La movilidad de las CPs de las distintas cepas, como la de la asialofetuína, fue afectada por el tratamiento alcalino (Fig. 5.10) obteniéndose un patrón de bandas similar al observado después de la deglicosilación química con TFMS (Figs. 5.3, 5.4 y 5.5).

Este resultado, en conjunto con los resultados negativos obtenidos con la enzima PNGase F y las lectinas que reconocen N-glicanos, sugieren fuertemente que los residuos azucarados de la CP del PVX presentan unión O-glicosídica.

Fig. 5.9: Efecto de la β -eliminación sobre la movilidad electroforética de la proteína O-glicosilada asialofetuína

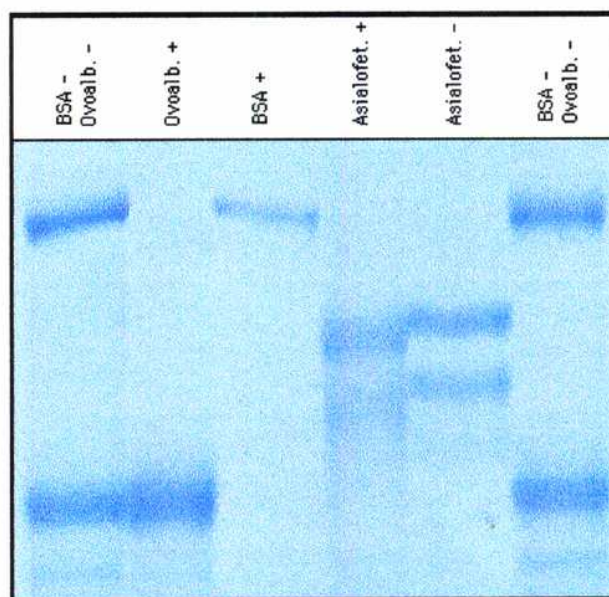
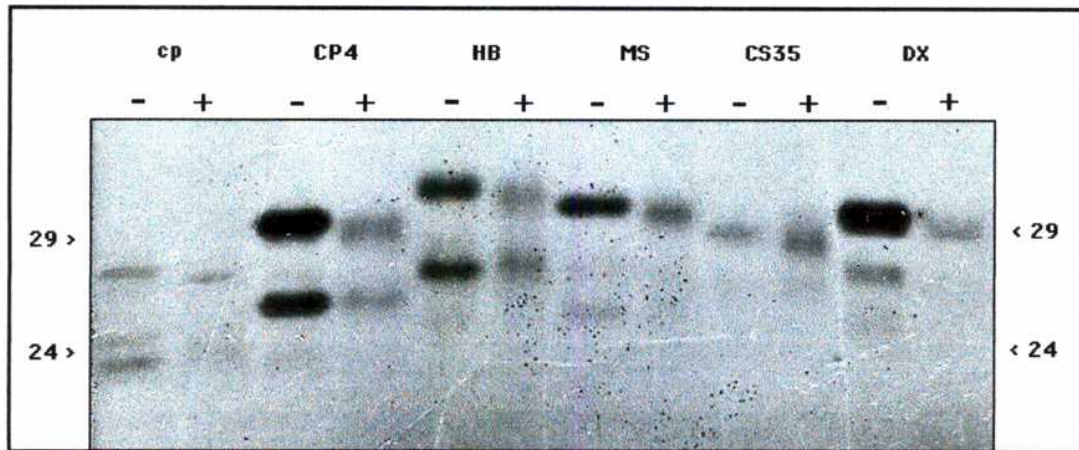


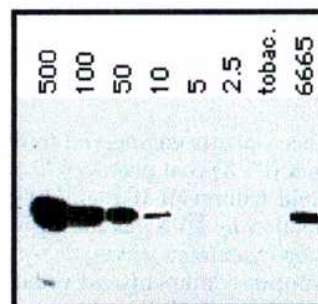
Fig 5.10: Efecto de la β -eliminación sobre la movilidad electroforética de las CPs de las cepas cp, CP4, HB, MS, DX y CS35. Muestras no tratadas: -, muestras tratadas: +.



Síntesis de la CP en plantas transgénicas y en distintos hospedantes

Numerosos grupos de investigación y desarrollo han producido plantas transgénicas de papa y tabaco que expresan el gen de la proteína de cápside del PVX con el objeto de obtener resistencia a la infección por este virus (Hemenway et al., 1988; Hoekema et al., 1989; Lawson et al., 1990). El análisis por *western blot* de las CP producidas por estas plantas transgénicas y publicado en diferentes trabajos muestra que éstas comigran en SDS-PAGE con la CP producida en plantas infectadas (Fig. 5.11). Esto indicaría que la CP sintetizada en plantas transgénicas es modificada post-traduccionamente de la misma manera (o al menos en forma equivalente) que lo es cuando ésta es sintetizada durante un proceso de infección. Esto indicaría que esta/s modificaciones son realizadas por enzimas del hospedante y sin colaboración de proteínas virales, como era de esperarse en el caso de un virus con un genoma pequeño como el de PVX. Sin embargo, no pueden descartarse la existencia de algunas diferencias en el proceso de modificación ocurrido en una célula transgénica o en una infectada, debidas a los cambios en el estado metabólico de la célula como consecuencia del proceso de infección y/o debida a la localización subcelular de los procesos.

Figura 5.11: Comparación del peso molecular de la proteína de cápside PVX X3 y la producida por una planta de tabaco transgénica (línea 6665) con el gen de la cápside de la misma cepa. La resolución se realizó en un gel de 12.5% con SDS y la detección se realizó por western blot, sembrándose de 500 a 2.5 μ g de virus purificado y proteínas totales de tabaco no transgénico y de la línea 6665. Reproducción de la figura 1B del trabajo publicado por Hemenway et al., 1988.



Entonces, debido a que la glicosilación de la CP es realizada por enzimas del hospedante, la misma es, al menos en parte, una propiedad del tipo de hospedante. Por lo tanto, hablar de los oligosacáridos unidos al virus sin considerar al hospedante puede ser erróneo en algunos casos. Por esta razón, se infectó con PVX de distintas cepas (cp, HB y MS) hospedantes de diversas especies (*Trifolium repens*, *Pisum sativum*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*) con el objeto de observar si la migración de la CP variaba según el hospedante donde había sido sintetizada y procesada la CP. El análisis por *western blotting* de las proteínas extraídas de las distintas especies infectadas mostró que las CPs de PVX migraron de igual manera, independientemente del hospedante donde se había originado (resultados no mostrados). Esto indica que en las especies probadas, la CP de las distintas cepas sufre sino las mismas, al menos equivalentes modificaciones post-traduccionales desde el punto de vista de la migración en los geles de SDS. Las bandas correspondientes a alguno de los productos de degradación de la CP fueron distintas según el hospedante, sugiriendo la presencia de diferentes proteasas en éstos.

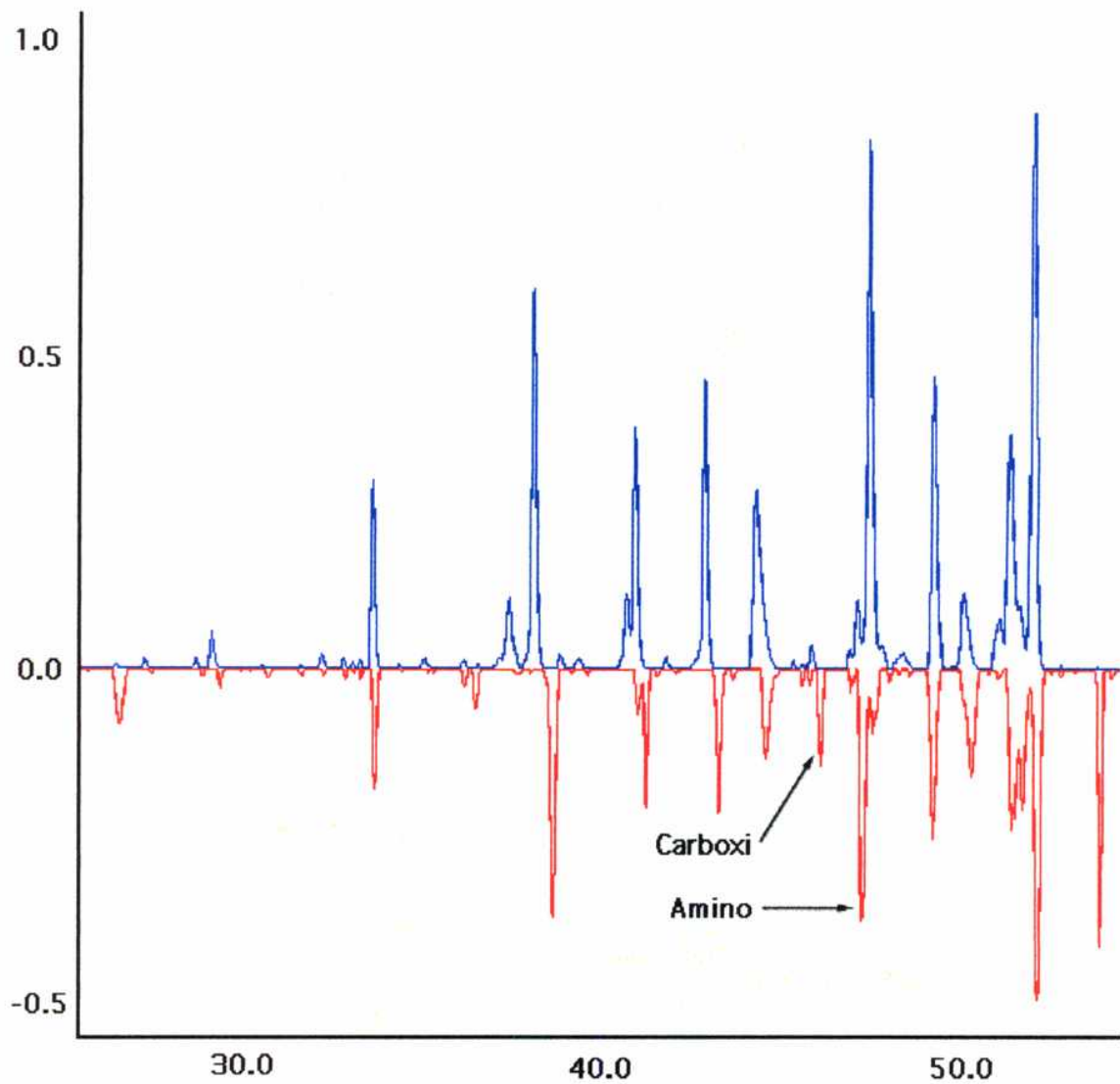
Separación por HPLC e identificación por secuenciación de los péptidos trípticos de la cápside

La migración de los productos de degradación de la proteína de cápside no se vió afectada por el tratamiento de deglicosilación, y estos productos, según la bibliografía, corresponden a formas de la cápside que han perdido sus extremos amino y carboxi terminales. Además, las bandas correspondientes a las formas degradadas de la CP no dieron reacción positiva cuando luego de ser separados electroforéticamente y transferidos a una membrana se realizó la detección de azúcares con el método de la oxidación con periodato (resultado no mostrado).

Para determinar la presencia de oligosacáridos unidos a estas regiones se clivó la cápside intacta con tripsina. La digestión con tripsina genera dos péptidos de tamaño adecuado conteniendo ambos extremos de la proteína. Sin embargo, también genera varios péptidos a partir de la región central de la cápside. Por esta razón y con el objeto de minimizar los péptidos a ser secuenciados para su inequívoca identificación, se realizó la digestión con tripsina además de la CP intacta, de la forma deglicosilada. Ambas muestras fueron separadas mediante cromatografía en fase reversa (HPLC SmartSystem, Pharmacia) y los cromatogramas fueron comparados para detectar las fracciones que son exclusivas de la forma intacta (Fig. 5.12). De esta forma se observaron varios picos diferenciales de los cuales se seleccionaron aquellos que presentaban una concentración de masa y una relación de absorbancia 280/215 nm acorde a lo esperado según la estructura primaria del péptido. Estos fueron secuenciados y de esta forma se identificaron las fracciones correspondientes al amino terminal (secuencia negativa por el acetilo bloqueando el amino terminal) y al carboxi terminal (secuencia iniciada con los aminoácidos ITGTTVA...,).

Cada una de esta fracciones y por separado fueron repurificadas en el HPLC repitiendo el pasaje por la columna siguiendo el protocolo utilizado previamente. Cada fracción eluyó en la misma posición (relativo al tiempo y al gradiente de solventes) observada en el fraccionamiento inicial, obteniéndose un pico único homogéneo para el péptido amino-terminal y un pico angosto con varios "hombros" muy pequeños para el carboxiterminal (resultado no mostrado).

Figura 5.12: Cromatograma de separación por micro-HPLC de los péptidos trípticos de la proteína de cápside de PVX CP4 en su forma deglicosilada (cromatograma azul) y de su forma completa (cromatograma rojo e invertido para su mejor comparación). Están indicados los picos de elusión correspondientes a los péptidos amino y carboxi terminales.



Espectroscopía de masa de los péptidos amino y carboxi terminales

La masa de los péptidos amino y carboxi terminales repurificados fue determinada mediante espectroscopía. El primero de los péptidos presentó una masa de 4424.5 kDa (Fig. 5.13), mientras que el péptido C-terminal mostró 5 picos con un rango de pesos de 1765.4 a 1842.6 kDa (Fig. 5.14)

Fig 5.13: Resultado de la espectroscopía de masa realizado sobre el péptido triptico amino terminal de la cápside de PVX CP4

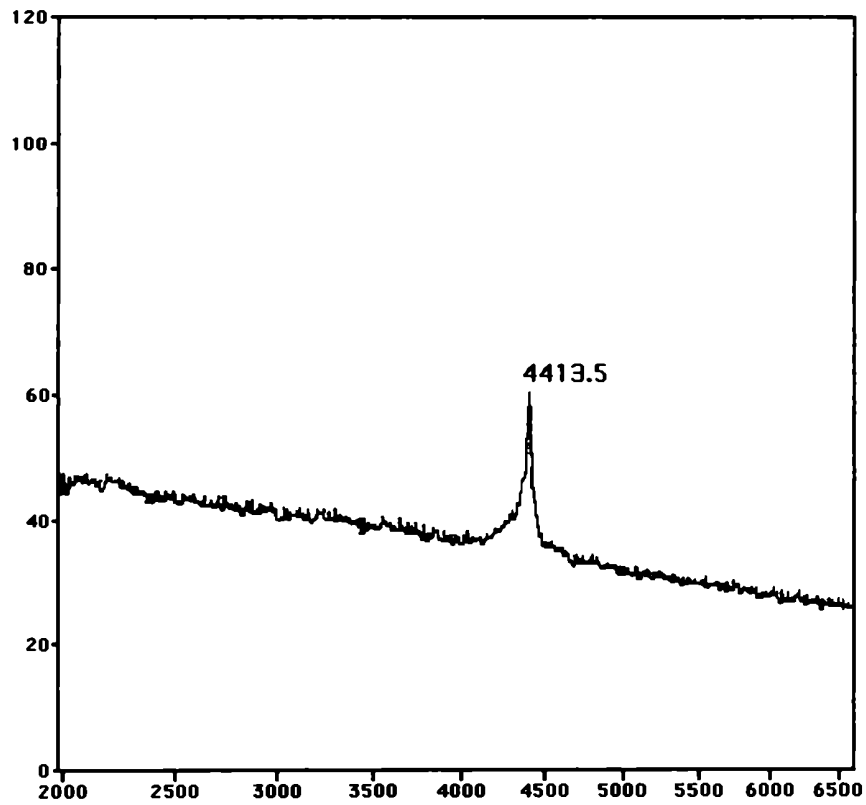
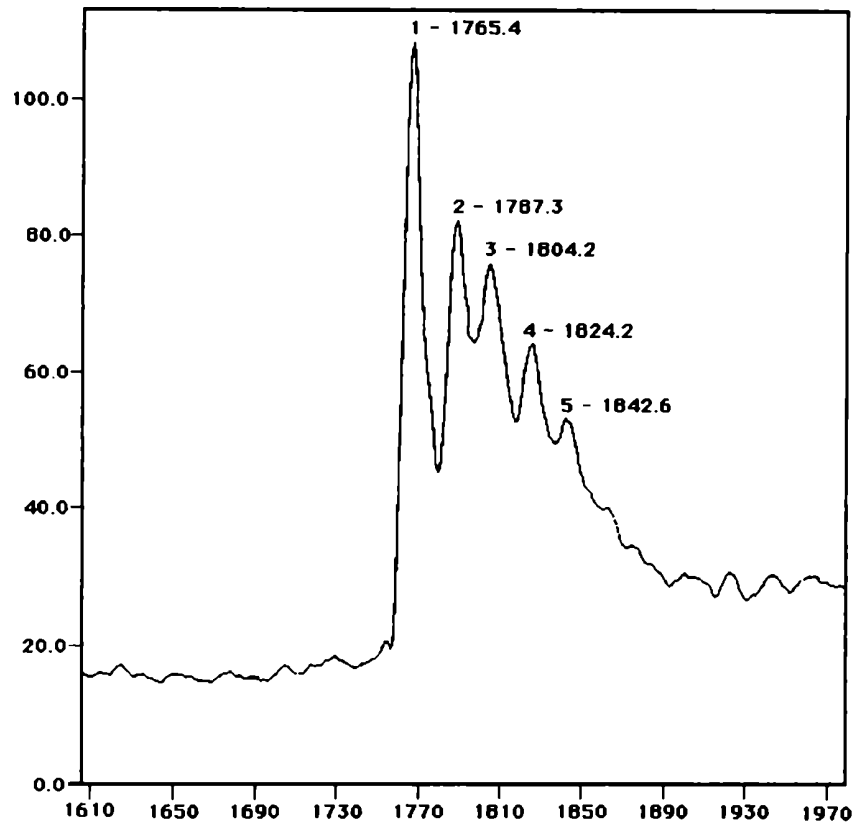


Fig 5.14: Resultado de la espectroscopía de masa realizado sobre el péptido tríptico carboxi terminal de la cápside de PVX CP4



Secuenciación de los aminoácidos del extremo amino

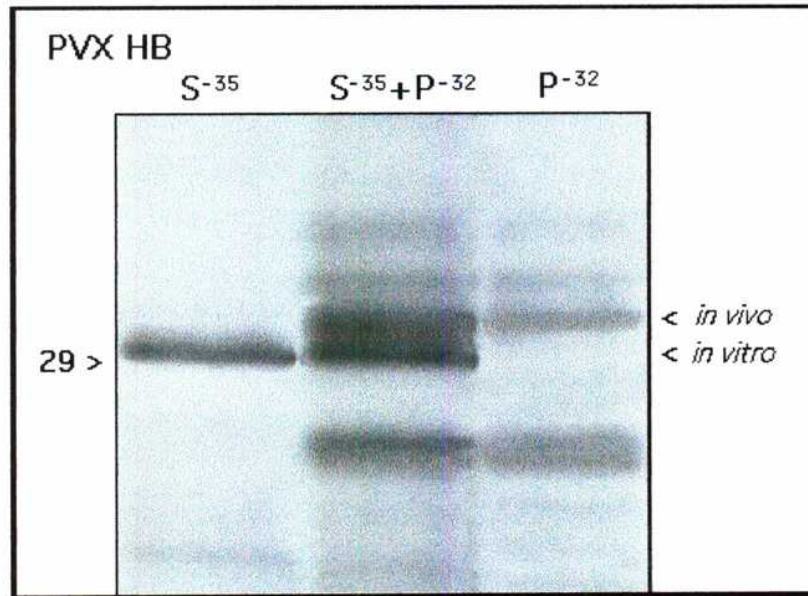
La secuenciación siguiendo la metodología de Edman de la forma intacta de la CP de PVX CP4 no produjo la liberación de amino ácidos en los distintos ciclos ensayados. Esto indica que el amino terminal de esta proteína se hallaría bloqueado y que, en conjunto con los resultados de Miki y Knight (1968), podría estarlo por un grupo acetilo. El mismo procedimiento de secuenciación de la forma degradada de la CP mostró que el amino terminal de esta proteína correspondía al amino ácido 13 (ser) de la secuencia determinada a partir del gen. Luego de ensayar distintas formas para desbloquear el amino terminal, se consiguió liberar el amino terminal y generar unos pocos sitios de ruptura internos, de forma tal que los cromatogramas generados por el secuenciador de amino ácidos pudieron ser inequívocamente interpretados con la ayuda de la secuencia predeterminada a partir de la secuencia de nucleótidos del gen. Estos resultados se correspondieron con tal secuencia a excepción de la metionina inicial que no fue detectada en los cromatogramas, indicando que este amino ácido es clivado en un procesamiento post-traduccionales.

Traducción *in vitro* de la CP

Se realizaron varios ensayos de traducción *in vitro* en distintas condiciones y con distintos objetivos, entre ellos, estudiar el efecto de la presencia de CP en la traducción del gRNA, corroborar las modificaciones post-traduccionales que ocurren *in vivo* u observar si este tipo de O-glicosilación se repite *in vitro* (lisado de

reticulocitos de conejo). En uno de estos ensayos la traducción de gRNA (PVX HB) en lisado de reticulocitos de conejo se realizó en presencia de S^{35} -metionina y con S^{35} Met y g^{32} ATP junto con el agregado de proteína de cápside. Los productos de la traducción fueron separados por SDS-PAGE y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa y expuesta a un film autoradiográfico. Como resultado de este experimento el fósforo no fue incorporado a la cápside sintetizada *de novo*, pero curiosamente se adhirió a la proteína agregada a la reacción, por lo cual dejó una leve impronta en el film. Esta impronta coincidió con la posición de la detección inmunológica. Este efecto casual, y no bien entendido, sin embargo ofreció una forma muy exacta de comparar el peso molecular de la cápside sintetizada *in vivo* vs. *in vitro* como se puede observar en la figura 5.15.

Figura 5.15: Traducción *in vitro* de gRNA de PVX HB. Los títulos S^{35} y P^{32} indican el agregado de S^{35} metionina y g^{32} ATP en las reacciones, respectivamente. La posición de las cápsides sintetizadas *in vivo* e *in vitro* están señaladas.

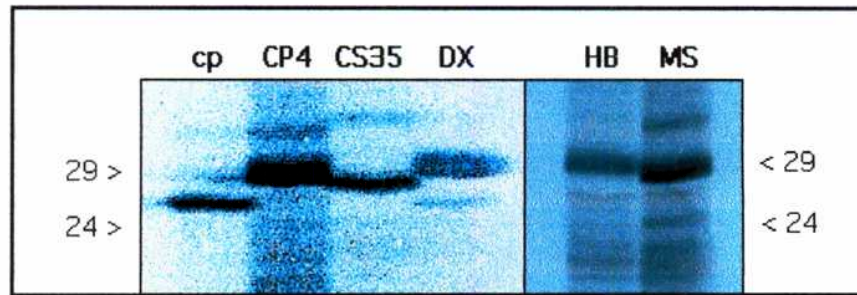


En los sistemas de traducción *in vitro* (en lisado de reticulocitos o extracto de germen de trigo), el gRNA de PVX se comportaría como un mRNA monocistrónico según lo informado en trabajos previos (Ricciardi et al., 1978; Wodnar-Filipowicz et al., 1980; Adams et al., 1987) y lo esperado según el modelo de *linear scanning* de inicio de traducción (Kozak, 1989). Sin embargo, en todas las reacciones que se realizaron con gRNA, completamente purificado o con el agregado de distintas cantidades de CP, el producto mayoritario y marcado con metionina- S^{35} fue una proteína que migró de manera similar a la proteína de cápside. Contrariamente a lo reportado previamente, una proteína con peso molecular equivalente al correspondiente al ORF 1 (replicasa) fue un producto de reacción raramente visto y minoritario. Iguales resultados fueron obtenidos y confirmados a partir de gRNA de varias cepas (cp, CP4, HB, MS, DX).

La proteína mayoritaria sintetizada *in vitro* migró en los geles de SDS como una proteína 0.5 kDa menor que la CP sintetizada *in vivo* y que comigra con la CP deglicosilada. Además, este producto inmunoprecipita con un anticuerpo anti-cápside por lo que se confirma que se trata de una proteína sintetizada *in vitro* a partir del gen de la CP.

Las diferencias de migración entre las CPs de las distintas cepas sintetizadas *in vivo* se mantuvieron aún cuando éstas fueron traducidas *in vitro* (Fig. 5.16).

Figura 5.16: Traducción *in vitro* del gRNA de distintas cepas de PVX. La posición de los marcadores de 24 y 29 kDa se indica para los dos geles.



La integridad de los distintos RNAs utilizados en las traducciones *in vitro* fueron analizadas mediante *northern blot*. Esto mostró que el gRNA se hallaba intacto, no detectándose productos degradados o sgRNAs (resultados no mostrados). Con el objeto de preservar la integridad de los mismos durante las reacciones se agregó inhibidor de RNAsas de placenta humana (RNAsin, Pharmacia Suecia), pero no se realizaron *northern blot* para corroborar ésta luego de finalizada las reacciones. Esto es importante porque los fragmentos de gRNA que pudieren formarse por degradación durante la reacción podrían en algunos casos funcionar como mRNA monocistrónicos (Kozak, 1992)

Discusión

Glicosilación de la proteína de cápside de PVX

Los resultados positivos en los ensayos de oxidación con periodato en las proteínas de cápside de todas las cepas de PVX ensayadas, junto con la posterior observación de un aumento de la movilidad electroforética luego del tratamiento con TFMS o con condiciones alcalinas suaves indican que esta proteína se halla modificada postraduccionalmente por el agregado de al menos un residuo de azúcar. Los resultados de los ensayos de traducción *in vitro* confirman con precisión los resultados de las deglicosilaciones químicas (TFMS y alcalina).

La labilidad de la unión del residuo frente al tratamiento alcalino suave sugiere que se trata de una O-glicosilación. Este tipo de uniones se produce sobre aminoácidos que presentan un hidroxilo, generalmente serina o treonina, aunque también se puede localizar en una tirosina o una hidroxiprolina (prolina modificada). La determinación por espectroscopia de las masas reales de los péptidos amino y carboxi terminales comparada con las esperadas en función de su estructura primaria confirman la presencia de modificaciones en ambos extremos e indican que se trata de agregados postraduccionales de bajo peso molecular. Curiosamente, la glicosilación que en este trabajo se informa no fue detectada en ninguno de los estudios previos sobre la naturaleza molecular de la CP de este virus modelo de la virología (Shaw et al., 1962; Miki y Knight, 1968; Tung y Knight, 1972; Tremaine y Agrawal, 1972; Baratova y et al., 1992a y b). Esto posiblemente se debió a las fuertes condiciones de hidrólisis usadas en estos trabajos (12 N ClH, 105°C, durante por lo menos 24 hs) las cuales destruyen a los azúcares.

En resumen, la proteína de cápside del PVX es una O-glicoproteína con al menos un residuo de azúcar. Uno de ellos en las proximidades del extremo amino y probablemente uno o dos en el extremo carboxilo de la proteína. Los detalles de estas determinaciones y las implicancias biológicas se discuten a continuación.

Ubicación y tamaño de las glicosilaciones

La gran precisión y repetibilidad del equipo de HPLC usado (Smart System de Pharmacia) permitió comparar los picos de elución de las digestiones con tripsina de la CP intacta y su forma deglicosilada. De esta forma se pudieron identificar los picos diferenciales y por las estimaciones de masas en cada uno de ellos y de las absorbancias a 215, 225 y 280 nm fue posible elegir dos ellos. Cada uno de éstos fue secuenciado y de esta forma se confirmó que correspondían a los extremos de la proteína. Estos péptidos fueron repurificados repitiendo el protocolo utilizado en la corrida inicial y una alícuota de cada uno fue analizada mediante un espectrógrafo de masa. La masa determinada para los péptidos terminales obtenidos fue superior en ambos casos a la esperada según su estructura primarias. Este resultado indica la presencia de estructuras adicionales a la cadena peptídica, y en este sentido la espectroscopia de masa ha demostrado ser una técnica valiosa en la detección de glicosilaciones (Carr y Bieman, 1984; Dwek et al, 1993).

El peso molecular esperado para el péptido N-terminal es de 4208.9 Da mientras que el observado fue de 4413.5 Da (Fig. 5.13). Esta diferencia en el peso observado (204.6 Da) puede ser explicada por la presencia del acetilo bloqueante en el amino terminal (42 Da) junto con la presencia una hexosa (162 Da), los cuales suman 204 Da de masa. Por lo tanto, en base a esta información se puede postular la presencia de un monosacárido en el extremo amino terminal.

El peso molecular observado para el péptido C-terminal también fue mayor al esperado de 1550.8 Da, sin embargo para este péptido la muestra no se presentó homogénea (Fig. 5.14). Esto podría obedecer a una degradación parcial de la muestra o a una heterogeneidad propia del tipo de modificación post-traduccional

involucrada. En la tabla 5.1 se muestra la masa observada en cada uno de los picos de la figura 5 y su diferencia con la esperada (obs- esp), en las dos columnas siguientes se muestra la masa remanente luego de restar el peso de una hexosa (162 Da) o una pentosa (132 Da). El pico de menor masa, el 1, es aún mayor que el esperado para el péptido sin modificaciones. En este pico la diferencia es de 214.6 Da lo cual es suficiente como para incluir un monosacárido de 5 o de 6 carbonos. Considerando el mayor de los pesos moleculares observado para este péptido (1842.6 Da) se observa una diferencia con el esperado de 291.8 Da la cual podría ser adjudicada a la presencia de dos monosacáridos o a un disacárido, en ambos casos constituidos por una hexosa y una pentosa (294 Da entre ambos). Sin embargo, con la presente información no se pueden descartar otras modificaciones alternativas que también podrían justificar la diferencia de peso observada, como por ejemplo, la presencia de un monosacárido (pentosa o hexosa) más un número no bien determinado de modificaciones alternativas como acilaciones o metilaciones.

Como las masas determinadas no concuerdan exactamente con la presencia de azúcares, se podría postular otro tipo de estructuras carbonadas unidas a la región C-terminal. Al mismo tiempo, dos resultados favorecen la hipótesis de que también sean glicanos los existentes en este extremo. Una, la fuerte reactividad de la cápside frente al método de detección de azúcares, lo que sugiere la presencia de más de una terminación hidrocarbonada en proteína de cápside. La segunda, la deglicosilación con TFMS produjo un cambio en la movilidad equivalente a aproximadamente 500 Da y dos hexosas más una pentosa suman 456 Da. En este sentido, cabe recordar que en los geles de SDS los cambios en la movilidad resultantes por modificaciones post-traduccionales no siempre son iguales a las masas de las estructuras unidas (Tung y Knight, 1972).

Tabla 5.1: Diferencias entre las masa observadas y la esperada para los distintos picos determinados por espectroscopía para el péptido C-terminal. También se incluye la diferencia entre la masa observada y la esperada con el agregado de una hexosa (6C, 162 Da) o una pentosa (5C, 132 Da).

Pico	Masa (Da)				
	obs.	esp.	obs-esp	obs-esp-6C	obs-esp-5C
1	1765.4	1550.8	214.6	52.6	82.6
2	1787.3	1550.8	236.5	74.5	104.5
3	1804.2	1550.8	253.4	91.4	121.4
4	1824.2	1550.8	273.4	111.4	141.4
5	1842.6	1550.8	291.8	129.8	159.8

En resumen, los resultados del presente análisis de las masas de los péptidos amino- y carboxi-terminal corroboran la hipótesis de la presencia de modificaciones post-traduccionales en ambos extremos de la proteína de cápside del PVX. También indican que éstas serían modificaciones de bajo peso molecular. La detección positiva de azúcares en la proteína de cápside y la masa determinada para la región amino terminal sugieren fuertemente la presencia de una hexosa en este extremo. En el extremo carboxi terminal, si bien los datos no son concluyentes, las determinaciones de masa dan lugar a postular que un hexosa o dos pentosas podrían estar unidas en este extremo. Considerando los resultados originados a partir de la detección con lectinas y las digestiones enzimáticas, estos sacáridos podrían ser arabinosa, fucosa o xilosa.

Aminoácidos potencialmente glicosilados

Las secuencias de aminoácidos de las cepas de PVX que pertenecen al serotipo PVX^A contienen dos sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) en los codones 6-8 y 144-146, mientras que las pertenecientes

al serotipo PVX^O presentan sólo uno en los codones 145-147. El segundo de estos sitios se encuentra en el medio de la proteína, por lo tanto, no concuerda con la ubicación determinada por espectroscopia de masa; además, el primero de los sitios no está conservado en todas las cepas. Esto descarta la posibilidad de una N-glicosilación y refuerza los resultados a favor de la O-glicosilación. Se puede agregar también que ninguna de las secuencias del gen de la CP muestra la presencia del péptido señal necesario para ser co-traduccionalmente exportada al retículo endoplasmático (ER), donde las N-glicosilaciones tiene lugar. Desde ER las proteínas pueden luego alcanzar el aparato de Golgi, donde ocurren las O-glicosilaciones. Los estudios ultraestructurales de células infectadas con PVX muestran que el virus se localiza en el citoplasma y que el ER es afectado por la infección masiva de la célula pero el virus no se halla en su interior (Kozar y Sheludko, 1969). Algunas cepas pueden, eventualmente, formar estructuras dentro de los cloroplastos (Kozar y Sheludko, 1969). Pareciera entonces que la O-glicosilación que sufre la cápside de PVX no tiene lugar en el Golgi.

Otros tipos de O-glicosilaciones ocurren en el citoplasma y aún en sistemas de traducciones *in vitro* mediadas por enzimas no unidas a membrana (ver review de Hart et al., 1989, y los trabajos de Haltiwanger et al., 1990, 1991, 1992). Considerando la falta de señal de transporte y la biología citoplasmática del PVX, se sugiere que la O-glicosilación detectada en la CP se produciría, muy probablemente, en el citoplasma. Desafortunadamente es difícil de probar de manera directa esta hipótesis ya que poco es lo que se sabe respecto de las O-glicosilaciones en general y menos aún de las citoplasmáticas, en comparación con los conocimientos que se tienen en el campo de las N-glicosilaciones.

En las O-glicosilaciones, el primer monosacárido es unido a un hidroxil aminoácido, usualmente Ser o Thr, pero también puede ser un aa modificado como hidroxiprolina o hidroxitirosina. Las O-glicosilaciones unidas a hidroxiprolina no son susceptibles a la β -eliminación (Lamport, 1984). Aunque no existe una secuencia consenso para el sitio de O-glicosilación, las posiciones -3, -1 y +3 con respecto a los hidroxiaminoácidos Ser y Thr parecen ser las posiciones que más influyen sobre la eficiencia con que este tipo de glicosilación se produce. La presencia de prolina, alanina, serina o treonina tienen una influencia positiva, mientras que los aa cargados electrostáticamente afectan negativamente la glicosilación (O'Connell et al., 1992). La mayoría de las O-glicosilaciones ocurren en grupos (*clusters*). Se conocen algunas serintransferasas y treonintransferasas que tienen sustratos específicos separados y/o superpuestos (O'Connell et al., 1992), lo cual podría ser una de las razones por las cuales aún no se ha identificado ninguna secuencia consenso de O-glicosilación.

El análisis de los aa de las CP de las distintas cepas muestra que se trata de una proteína rica en Ser/Thr (19%). Variando levemente según la cepa de PVX, el 53% de los primeros 30 aa N-terminales y el 33% de los 15 últimos aa C-terminales son Ser o Thr (Fig. 4.6). Considerando las amplias condiciones que favorecen las O-glicosilaciones dadas previamente, es posible detectar en la CP varios sitios potenciales para este tipo de glicosilación. La mayoría de estos sitios son conservados en las distintas cepas. En la región N-terminal hay un grupo de Ser/Thr (aa 13 a 21) altamente conservado, pero las cepas cp (aa 15), X3, UK3, S (aa 20) presentan la sustitución de una Thr por una aa cargado como lo es la Lys (K), lo cual sería desfavorable para la glicosilación. Las Ser y Thr de la región C-terminal están también altamente conservadas en las distintas cepas. En resumen, ambos extremos de la proteína de cápside presentan regiones conservadas que podrían ser sustrato de O-glicosilación.

Implicancias de la glicosilación

El análisis mutacional de la CP de PVX ha demostrado el rol que la misma cumple en la acumulación del gRNA, en su dispersión más allá de la célula inoculada, y en la inducción de distintos mecanismos de resistencia en los hospedantes (ver Introducción: rol de la proteína de cápside). El conocimiento de que la CP

sufre modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones u otras) es importante para entender el efecto fenotípico que tienen ciertas mutaciones del gen de la CP y su relación con su rol biológico.

La glicosilación es una característica común en la envoltura de los virus animales (Hart et al., 1989) pero ha sido raramente descrita en los virus vegetales. Sólo se han informado unos pocos casos de glicosilación en virus vegetales; en los pertenecientes al grupo de los Rhabdovirus (virus vegetales con envoltura y muy próximos a los virus animales) (Goldberg et al., 1991), en el *barley stripe mosaic virus* (BSMV) y en el virus del mosaico del caupí (CPMV). Para los virus BSMV y CPMV se ha propuesto que la glicosilación de las CPs sería el determinante de la transmisibilidad por semilla (Partridge et al., 1974).

La unión de un glicano a una proteína viral puede conferirle propiedades muy importantes para un virus, como ser resistencia a la proteólisis, estabilizar la interacción proteína-proteína, o servir de señal para la localización a compartimientos subcelulares (Hart et al., 1989; Haltiwanger et al., 1992). A grandes rasgos dos roles bioquímicos distintos han sido propuestos para los O- y N-oligosacáridos. Mientras que los N-sacáridos pueden servir como marcadores (para el reconocimiento y transporte), los O-sacáridos pueden principalmente modificar la conformación y estructura de las proteínas (proveyendo protección frente a las proteasas) (Gerken et al., 1992).

Como surge de los resultados y el análisis anterior, ambos extremos de la CP estarían glicosilados. Chapman et al., (1992b) produjo varias mutantes el gen de la CP por deleciones o cambios de marco de lectura, algunas de las cuales afectan los sitios potenciales de glicosilación mencionados previamente. Las mutantes con la región N-terminal afectada (TXD9S y TXDRS) presentaron una agregación inusual del virión, una infección retardada en el tiempo y una reducción en la acumulación de RNA. De estos resultados se concluyó que la región N-terminal podría influenciar la interacción inter e intramolecular de la partícula viral, facilitar la producción de virión, y/o estabilizar la partícula viral (Chapman et al., 1992b). Otra mutante (TXD11S), que presentaba los últimos 18 aa C-terminales reemplazados por 10 aa correspondientes al marco de lectura +1, no infectó a las plantas de *N. tabacum* cv Samsun NN (Chapman et al., 1992b). Los fenotipos presentados por estas mutantes con las regiones N- o C-terminales de la CP modificadas ponen de manifiesto la importancia de estas regiones de la proteína. Estos fenotipos podrían deberse en parte a la falta de la parte hidrocarbonada de la glicoproteína, lo cual podría estar afectando la conformación, estructura y estabilidad de la proteína. Recordemos que ambos extremos se encuentran localizados hacia el exterior en el virión (Baratova et al., 1992 a y b).

Otra consecuencia que podrían tener las glicosilaciones es la de afectar levemente el modelo espacial propuesto para la partícula de PVX a partir del bombardeo con tritio (Baratova et al., 1992 a y b), ya que los carbonos de los azúcares interfieren con el bombardeo protegiendo a los aminoácidos y por lo tanto sesgando los valores de radiactividad recolectados en éstos.

Finalmente, las glicosilaciones parecen no actuar como determinantes de virulencia. En primer lugar, las modificaciones se muestran iguales en todas las cepas desde el punto de vista del cambio de movilidad electroforética (0.5 kDa), Además, dado que éstas también se producen en las plantas transgénicas, como se observó para la cepa X3 (Fig. 5.11), esto indicaría que la estructura primaria de la proteína determina el tipo y la ubicación de la glicosilación. Las cepas X3, MS y DX presentan la misma secuencia de aminoácidos por lo que se espera que las tres presenten el mismo tipo de modificación (en nuestros ensayos las cepas MS y DX mostraron tener el mismo peso molecular aparente, 28.2 kDa). Estas tres cepas presentan características de virulencia distintas, X3 pertenece al grupo III, mientras que DX es del grupo II y MS pertenecería al grupo IV superando además al gen *Rxacl*. Estos resultados sugieren, como ya mencionamos, que los azúcares de la cápside no influirían en las características de virulencia de la cepa.

Otras modificaciones post-traduccionales

En primer lugar, la imposibilidad de secuenciar por el método de Edman la proteína de cápside intacta confirmó la presencia de un grupo bloqueante del amino terminal. La posibilidad de que este extremo se hallara bloqueado fue sugerida por Miki y Knight (1968) al observar el desprendimiento, mediante un método químico, de ácido acético a partir de cápside purificada. En el presente trabajo, la presencia de un grupo acetilo fue determinada mediante el análisis de masa del extremo N-terminal, cuyo resultado concuerda exactamente con la presencia de un grupo acetilo y una hexosa.

Otra de las modificaciones determinadas fue el clivado de la metionina con la cual se inicia el proceso de traducción. Una vez logrado el desbloqueo del amino terminal de la cápside, la secuencia mostró comenzar en una treonina, el segundo aminoácido según la secuencia nucleotídica del gen. Esta modificación es muy frecuente en las proteínas de los eucariontes (Redman y Rubenstein, 1984; Wold, 1981).

También se detectó inmunológicamente la existencia de formas de la cápside de "alto" peso molecular. Estas formas se presentaron en cantidades minoritarias con respecto a la cápside no degradada y glicosilada (cerca a los 29 kDa), presentando un aumento aparente de 1.3 o 2.5 kDa (Fig. 5.5) según la cepa. Estas pueden deberse a proteínas del hospedante covalentemente unidas a la cápside. Similarmente, formas de mayor peso molecular al esperado fueron observadas para la cápside del TMV, donde se determinó que éstas eran formas ubiquitinadas (Dunigan et al., 1988). Sin embargo, éste no es el caso para PVX ya que la proteína ubiquitina agrega 8.6 kDa. Las cepas CP4 y HB muestran un aumento del peso molecular aparente de 2.5 kDa mientras que en MS éste alcanza a 1.3 kDa. El incremento en las cepas CP4 y HB es el doble que en la cepa MS. Esto, junto con la observación en algunos casos de una sutil banda coincidente con un incremento de 1.3 kDa en las cepas CP4 y HB sugieren la hipótesis de que dos moléculas están normalmente unidas a la cápside de CP4 y HB mientras que sólo una está unida a la proteína de MS. Cabe destacar que este tipo de modificación sólo se observó en la cepa MS y no en ninguna de las purificaciones hechas de PVX DX. Considerando que estas cepas presentan la misma secuencia de aminoácidos en la cápside, esto sugeriría que estas modificaciones están determinadas por el proceso de infección más que por la estructura primaria en sí.

La naturaleza de estas moléculas unidas es desconocida, aunque se puede descartar que se trate de azúcares porque las mismas no fueron removidas por el tratamiento con TFMS.

Como se mencionó, el presente estudio de modificaciones post-traduccionales se inició al observarse la gran diferencia de migración en SDS-PAGE entre las cápsides de las cepas andinas (cp, CP4 y HB), a pesar de la gran homología de aminoácidos que éstas presentan. Al mismo tiempo también era llamativa la diferencia entre el peso molecular esperado y los observados para las distintas cepas. Además, considerando los trabajos ya existentes que informaban sobre la migración anómala de esta proteína de PVX (refs). Con los resultados actuales, de la diferencia entre los valores esperados y los observados (2 a 3.7 kDa) 0.5 kDa pueden ser adjudicados a las glicosilaciones presentadas. De esta diferencia aún queda un margen sin explicar (1.5 a 3.2 kDa), el cual podría ser adjudicado al valor estimativo que tienen las determinaciones de peso molecular a través de la comparación con marcadores en geles de SDS. Sin embargo, la diferencia que más llama la atención, es la que se observa, por ej. entre la cepa cp y CP4. Ambas cepas sólo se diferencian en dos aminoácidos (una metionina y una treonina en CP4 fueron reemplazadas por dos lisinas de cp, ver fig. 4.6), los cuales modifican la carga y el punto isoeléctrico de la proteína de cp, como se detalla en la tabla 5.2. Estos cambios importantes, sin embargo no permiten una explicación coherente si se considera que las modificaciones en la cepa HB producen cambios aún mayores pero el peso observado de esta cepa es mayor que el de CP4, y no menor como ocurre con cp. Esto concuerda con los resultados que muestran la carga de la proteína tiene poco o ningún efecto sobre la migración en SDS-PAGE (Dunker y Rueckert, 1969; Panyin y Chalkley, 1971; Tung y Knight, 1972). Por lo tanto, dos hipótesis pueden ser postuladas para explicar estas observaciones: 1) que las sustituciones en la cápside de cp determinan una conformación de la proteína en los geles de SDS tal que migra más rápidamente que las proteínas de otras cepas. 2) que existen modificaciones

post-traduccionales aún no determinadas que justifican las diferencias de peso entre cepas y tal vez la diferencia con el peso esperado.

Con respecto a la primera hipótesis, existen informes referidos a algunas proteínas que se comportan de manera impredecible en los geles de SDS (Dunker y Rueckert, 1969; Tung y Knight, 1972; Nelson, 1971). Con respecto a la segunda hipótesis, hay que recordar que estas diferencias de migración se mantuvieron aún cuando las proteínas fueron sintetizadas *in vitro* (fig. 5.16), por lo tanto, se trataría de modificaciones reproducibles en el lisado de reticulocito de conejo (Redman y Rubenstein, 1984; Tsunasawa y Sakiyama, 1984; Allfrey et al., 1984; Haltiwanger et al., 1992).

En resumen, con los presentes datos no se puede explicar completamente la migración anómala de la cápside de PVX en los geles de SDS, quedando abierta la posibilidad de que existan modificaciones post-traduccionales adicionales a las reportadas en el presente trabajo.

Tabla 5.2: Datos físico-químicos de las proteínas de cápsides de distintas cepas de PVX. (n.r: no registrado)

Cepa	cp	CP4	HB	MS/DX	UK3/X3	S/DX4
Peso molecular observado	27	28	28.7	28.2	n.r.	n.r.
Peso molecular esperado	25	25	25	25	25	25
Punto isoeléctrico	8.26	7.15	8.59	7.15	7.15	7.15
Carga a pH=7	2.16	0.17	3.16	0.17	0.17	0.17
Amino ácidos						
básicos (+) (K, R)	22	20	22	20	20	20
ácidos (-) (D, E)	20	20	19	20	20	20
hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V)	89	89	89	90	90	90
polares (N, C, Q, S, T, Y)	68	69	69	69	69	68

Conclusiones

y

perspectivas

Conclusiones

Se identificó una cepa con capacidad de superar uno de los genes de resistencia extrema Rx (Rx_{acl}), la cual fue denominada PVX MS. La misma pertenece al patotipo HB, pero no es de origen andino.

Las características de interacción de esta cepa obliga a redefinir al grupo de genes de resistencia extrema Rx , dividiéndolo en al menos dos subgrupos.

En esta cepa se buscaron los determinantes de virulencia extrema localizados en la proteína de cápside y descriptos para otras cepas, determinándose que los mismos no estaban presentes y que por lo tanto debía haber otros determinantes ubicados fuera del gen de la cápside.

En la búsqueda de los posibles determinantes de virulencia, la secuenciación y el análisis del genoma completo mostró tres potenciales regiones determinantes. Estas son exclusivas de la cepa MS (por comparación con las cepas cp, HB, S y X3) y por esta razón alguna de ellas podría ser responsable de las características de virulencia particulares de esta cepa.

El estudio de la proteína de cápside resultó en la identificación de modificaciones post-traduccionales que no habían sido confirmadas o descriptas hasta el presente:

- se confirmó el bloqueo del amino terminal por un grupo acetilo
- se determinó el clivado de la metionina con que se inicia la traducción de la cápside
- se descubrió la presencia de azúcares unidos covalentemente a través de un hidroxilo, por lo tanto la cápside de PVX es una O-glicoproteína. Este tipo de glicosilación no había sido descripta en ningún virus vegetal
- en algunas cepas se identificaron formas de peso molecular superior al de la cápside intacta y glicosilada y que posiblemente se deban a la unión de moléculas no-hidrocarbonadas del hospedante.

Perspectivas

A partir de los resultados del presente trabajo se generan nuevos interrogantes que sería interesante responder, por ej:

- Determinar la epidemiología de la cepa MS, tal vez, mediante el diseño de primers que permitan una amplificación positiva sólo con esta cepa de alguna región de su genoma mediante RT-PCR.
- Verificar el papel de las regiones identificadas en las cepa MS como potenciales determinantes de virulencia. Esto se haría mediante la generación de cepas quiméricas en las cuales se sustituyan las secuencias mencionadas en un fondo genético avirulento y observando sus efectos sobre el fenotipo
- Determinar el tipo de azúcar/es unidos a la cápside
- Determinar qué aminoácidos de la cápside se encuentran glicosilados
- Establecer el papel de las glicosilaciones en la biología del PVX
- Tratar de identificar la/s molécula/s y su origen que conjugadas con la cápside determinan las formas de mayor peso molecular
- Determinar la existencia de modificaciones post-traduccionales adicionales a las reportadas en el presente trabajo

Referencias

Adams, S.E., Jones, A.C. and Coutts, R., H.A. (1987). A Comparison between the Capsid Proteins and the Products of in vitro Translation of three Strains of Potato Virus X. *J. Gen. Virol.* 68, 3207.

Adams, S.E., Jones, R.A.C. and Coutts, R.H.A. (1984). Occurrence of resistance-breaking strains of potato virus X in potato stocks in England and Wales. *Plant Pathology.* 33, 435-437.

Allfrey, V.C., Di Paola, E.A. and Sterner, R. (1984). Protein Side-Chain Acetylations. *Meth. Enzym.* 107, 224-240.

Allison, R., Thompson, C. and Ahlquist, P. (1990). Regeneration of a functional RNA virus by recombination between deletion mutants and requirement for cowpea chlorotic mottle virus 3a and coat genes for systemic spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1820-1824.

Atabekov, J.G. and Dolja, V.V. (1986). Hordeivirus: structure and replication. *In* The plant virus, H. Fraenkel-Conrat and M.H.V. van Regenmortel, ed). (Plenum Press, 397-417.

Atabekov, J.G. and Dorokhov, Y.L. (1984). Plant virus-specific transport function. *Adv. Virus Res.* 38, 313-364.

Atabekov, J.G. and Taliansky, M.E. (1990). Plant virus-coded transport. *Adv. Virus Res.* 38, 313-364.

Bagnall, R.H. (1961). Recovery of potato virus X from leaves of graft-inoculated immune potato plants. *Phytopathology.* 51, 338-340.

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in Plant-Microbe interactions. *Science.* 276, 726-733.

Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Dobrov, E.N., Gedrovich, A.V., Kashirin, I.A., Shishkov, A.V., Efimov, A.V., Järvekülg, L., Radavsky, J.L. and Saarma, M. (1992b). The Organization of Potato Virus X Coat Proteins in Virus Particles Studied by Tritium Planigraphy and Model Building. *Virology.* 188, 175-180.

Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Shishkov, A.V., Kashirin, I.A., Radavsky, J.L., Järvekülg, L. and Saarma, M. (1992a). The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology.* 73, 229-235.

Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Andersen, M.T. and Forster, R.S. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology.* 183, 695-702.

Benson, A.P. and Hooker, W.J. (1960). Isolation of virus X from "immune" varieties of potato, *Solanum tuberosum*. *Phytopathology.* 50, 231-234.

Brown, C.R., Salazar, L., Ochoa, C. and Chuquillanqui, C. (1984). Strain-specific immunity to PVX HB is controlled by a single dominant gene. 9th triennial Conference of the European Association for Potato Research. 249-250.

- Bruenn, J.A. (1991). Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. *19*, 217-226.
- Carr, S.A. and Bieman, K. (1984). Identification of Posttranslational Modified Amino Acids in Proteins by Mass Spectrometry. *Meth. Enz.* *106*, 29-58.
- Chapman, S., Hills, G., Watts, J. and Baulcombe, D. (1992b). Mutational Analysis of the Coat Protein Gene of Potato Virus X: Effects on Virion Morphology and Viral Pathogenicity. *Virology*. *191*, 223-230.
- Chapman, S., Kavanagh, T. and Baulcombe, D. (1992a). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*. *2*, 549-557.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978). Prediction of the Secondary Structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* *47*, 45-148.
- Clinch, P.E.M. (1944). Observation on severe strain of potato virus X. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. N.S.* *23*, 273-299.
- Cockerham, G. (1943). The reactions of potato virus X, A, B, and C. *Ann. Appl. Biol.* *30*, 338-344.
- Cockerham, G. and Davidson, T.M.W. (1963). Note on an unusual strain of potato virus X. *Scottish Plant Breeding Station, Record 1963*. 26-29.
- Culver, J.N., Lindbeck, A.G.C. and Dawson, W.O. (1991). Virus-Host interactions: Induction of Chlorotic and Necrotic Response in Plants by Tobamoviruses. *Annu. Rev. Phytopathology*. *29*, 193-217.
- Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A. and Grantham, G.L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *83*, 1832-1836.
- Dawson, W.O., Bubrick, P. and Grantham, G.L. (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopath.* *78*, 783-789.
- Delhey, V.R. (1974). Zur natur der extremen virusresistenz beider kartoffel. I. Das X-virus. *Phytopath. Z.* *80*, 97-119.
- Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (1992). Evolution of positive-strand RNA viruses. *Seminars in Virology*. *3*, 315-326.
- Domingo, E., Martinez-Sala, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., Lopez-Galindez, C., Perez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R., VandePol, S., Stainhauer, D., DePolo, N. and Holland, J.J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a review. *Gene*. *40*, 1-8.
- Downs, F., Herp, A., Moschera, J. and Pigman, W. (1973). b-elimination and reduction reactions and some applications of dimethylsulfoxide on submaxillary glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. *328*, 182-192.

- Drake, J.W. (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 4171-4175.
- Dunker, K.A. and Rueckert, R.R. (1969). Observation on Molecular Weights Determinations on Polyacrylamide Gel. *J. B. Chem.* *244*, 5074-5080.
- Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J., Wormald, M.R. and Parekh, R.B. (1993). Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* *62*, 65-100.
- Endo, Y. and Kobata, A. (1976). Partial Purification and Characterization of an Endo- α -N-acetylgalactosamine from the culture Medium of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Biochem.* *80*, 1-8.
- Fernández-Northcote, E.N. (1990). Variability of PVX and PVY and its relationship to Genetic Resistance. *In* International Potato Centre (CIP). Control of virus and virus-like disease of potato and sweet potato. Report of the 3 Planing Conference, Lima, Peru, 20-22 Nov. 1989, ed). Internacional Potato Center, Lima, Perú.), 131-139.
- Fernández-Northcote, E.N. and Lizárraga, C. (1991). Distribución Geográfica de serotipos del virus X de la papa. *Fitopatología.* *26*, 13-18.
- Flor, H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathology.* *9*, 275-296.
- Forster, R.L.S., Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Doleweerd, C.J. and Andersen, M.T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potexvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology.* *191*, 480-484.
- Forster, R.L.S., Bevan, M.W., Harbison, S.-A. and Gardner, R.C. (1988). The complete nucleotide sequence of potexvirus white clover mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* *16*, 291-303.
- Fraenkel-Conrat, H. (1957). Degradation of Tobacco Mosaic Virus with Acetic Acid. *Virology.* *4*, 1-4.
- Fraser, R.S.S. (1986). Genes for resistance to plant viruses. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* *3*, 257-294.
- Fraser, R.S.S. (1990). The genetics of plant-virus interactions: mechanisms controlling host range, resistance and virulence. *In* Recognition and response in Plant-Virus interactions, R.S.S. Fraser, ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 71-92.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* *120*, 97-120.
- Goldbach, R.W. (1986). Molecular Evolution of Plant RNA Viruses. *Annu. Rev. Phytop.* *24*, 289-310.
- Goldberg, K.-B., Mondrell, B., Hillman, B.I., Heaton, L.A., Choi, T.-J. and Jackson, A.O. (1991). Structure of the Glycoprotein Gene of Sonchus Yellow net Virus, a Plant Rhabdovirus. *Virology.* *185*, 32-38.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1988). A novel family of nucleoside triphosphate-binding proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letts.* *235*, 16-24.

- Goth, R.W. and Webb, R.E. (1985). Detection and distribution of latent viruses in the potato cultivar Atlantic. *Plant Disease*. 69, 851-853.
- Goulden, M.G. and Baulcombe, D.C. (1993b). Functionally homologous host components recognize potato virus X in *Gomphrena globosa* and potato. *Plant Cell*. 5, 921-930.
- Goulden, M.G., Köhm, B.A., Santa Cruz, S., Kavanagh, T. and Baulcombe, D.C. (1993a). A Feature of the Coat Protein of Potato Virus X Affects both Induced Virus Resistance in Potato and Viral Fitness. *Virology*. 197, 293-302.
- Grama, D.P. and Mashkovsky, N.N. (1986). The discovery and study of subgenomic RNA of potato virus X. *Biopolim. Kletka*. 2, 328-334.
- Hall, T.C., Miller, W.A. and Bujarski, J.J. (1982). Enzymes involved in the replication of plant viral RNAs. *Adv. Plant Path.* 1, 179-211.
- Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A. and Hart, G.W. (1991). Glycosylation in the cytoplasm and the nucleus: purification and characterization of the O-GlcNac transferase. *Glycoconjugate J.* 8, 212.
- Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. and Hart, G.W. (1990). Enzymatic Addition of O-GlcNac to Nuclear and Cytoplasmic Proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 2563-2568.
- Haltiwanger, R.S., Kelly, W.G., Roquemore, E.P., Blomberg, M.A., Dennis Dong, L.-Y., Kreppel, L., Chou, T.-Y. and Hart, G.W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochemical Society Transactions*. 20, 264-269.
- Harrison, B.D. (1981). Plant virus ecology: ingredients, interactions and environmental influences. *Annals of Applied Biology*. 99, 195-209.
- Harrison, B.D. and Robinson, D.J. (1986). Tobravirus. *In* The plant virus, H. Fraenkel-Conrat and M.H.V. van Regenmortel, ed). (Plenum Press, 339-369.
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. and Kelly, W.G. (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874.
- Hefferon, K.L., Fakhrai, H. and AbouHaidar, M.G. (1994). Initiation of translation of the Potato Virus X (PVX) coat protein in transgenic potato plants by internal ribosome binding. American Society for Virology, 13th Annual Meeting.
- Hemenway, C., Fang, R.-X., Kanieski, W.K., Chua, N.-H. and Tumer, N.E. (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.
- Hoekema, A., Huisman, M.J., Molendijk, L., van den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. (1989). The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *Bio/Technology*. 7, 273-278.

- Hopp, H.E., Hain, L., Bravo Almonacid, F., Arese, I.A., Tozzini, A.C., Ceriani, M.F., Saladrigas, M.V., Orman, B., Celnik, R. and Mentaberry, A. (1991). Development and application of a nonradioactive nucleic acid system for the simultaneous detection of four potato pathogens. *Journal of Virological Methods*. 31, 11-30.
- Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981). Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences. *PNAS*. 78, 3824-3828.
- Huarte, M.A., Mendiburu, A.O., Monti, M.C. and Butzonich, I.P. (1986). Serrana INTA: a widely adapted virus resistant potato cultivar from Argentina. *American Potato Journal*. 63, 695-699.
- Huisman, M.J., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. and Cornelissen, B.J.C. (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X reveals homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 69, 1789-1798.
- Hull, R. (1989). The movement of viruses in plants. *Ann. Rev. Phytopath.* 27, 213-240.
- Jones, R.A.C. (1981). The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in Andean region of South America. *In Pest, pathogen and vegetation: the role of weeds and wild plants in the ecology of crop pest and diseases*, J.M. Thresh, ed). London), 89-107.
- Jones, R.A.C. (1982). Breakdown of potato virus X resistance gene Nx: selection of a group four strain from strain group three. *Plant Pathology*. 31, 325-331.
- Jones, R.A.C. (1982). Breakdown of potato virus X resistance gene Nx: selection of a group four strain from strain group three. *Plant Pathology*. 31, 325-331.
- Jones, R.A.C. (1985). Further studies on resistance-breaking strains of potato virus X. *Plant Pathology*. 34, 182-189.
- Joshi, R.L., Joshi, V. and Ow, D.W. (1990). BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. *EMBO J.* 9, 2663-2669.
- Karplus, P.A. and Schultz, G.E. (1985). Prediction of Chain Flexibility in Protein. *Naturwissenschaften*. 72, 212-213.
- Kavanagh, T., Goulden, M., Santa Cruz, S., Chapman, S., Barker, I. and Baulcombe, D. (1992). Molecular Analysis of a Resistance-Breaking Strain of Potato Virus X. *Virology*. 189, 609-617.
- Knorr, D.A. and Dawson, W.O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana glauca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 170-174.
- Köhm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C. (1993). A potato virus X resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell*. 5, 913-920.
- Koonin, E.V. and Gorbalenya, A.E. (1989). Evolution of RNA genomes: does the high mutation rate necessitate high rate of evolution of viral proteins? *J. Mol. Evol.* 28, 524-527.

- Kozak. (1992). A Consideration of Alternative Models for the Initiation of Translation in Eukariotes. *Crit. Rev. Bioch. Mol Biol.* 27, 385-402.
- Kozak, M. (1989). The Scanning Model for Translation: An Update. *J. Cell Biol.* 108, 229-241.
- Kozak, M. (1991). An Analysis of Vertebrate mRNA Sequences: Intimations of Translational Control. *J. Cell Biol.* 887-903.
- Kozar, F.E. and Sheludko, Y.M. (1969). Ultrastructure of Potato and *Datura stramonium* Plant Cells Infected with Potato virus X. *Virology.* 38, 220-229.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lai, M.M.C. (1992). RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiological Reviews.* 56, 61-79.
- Lampert, D.T.A. (1984). Hydroxyproline Glycosides in the Plant Kingdom. *Methods in Enzymology.* 106, 523-528.
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. and Tumer, N.E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology.* 8, 127-134.
- Lecommandeur, D., Sirou, Y. and Lauriere, C. (1990). Glycan research on Barlye, Maize, Oats, and Sorghum Grain α -Amylases: Comparison with Rice α -Amylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 278, 245-250.
- Levit, M. (1976). A Simplified Representation of Protein Conformations for Rapid Simulations of Protein Folding. *J. Mol. Biol.* 104, 59-107.
- Loebenstein, G. and Gera, A. (1990). Inhibitor of virus replication associated with resistance response. *In Recognition and response in Plant-Virus interactions*, R.S.S. Fraser, ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 395-404.
- Mann, M. and Wilm, M. (1995). Electrospray and mass spectrometry for protein characterization. *TIBS.* 20, 219-224.
- Matthews, R.E.F. (1949). Studies on potato virus X. II. Criteria of relationship between strains. *Ann. Appl. Biol.* 36, 460-474.
- Mendiburu, A.O. (1990). Approaches to Developing Resistance to Viruses through Breeding. *In International Potato Centre (CIP). Control of virus and virus-like disease of potato and sweet potato. Report of the 3rd Planning Conference, Lima, Peru, 20-22 Nov. 1989, ed). Internacional Potato Center, Lima, Perú.),* 101-106.
- Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K. and Okada, Y. (1986). *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 5043-5047.

- Meshi, T., Motoyoshi, F., Atsuko, A., Watanabe, Y., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1988). Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, Tm-1. *EMBO J.* 7, 1575-1581.
- Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H. and Okada, Y. (1989). Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *Plant Cell.* 1, 515-522.
- Miki, T. and Knight, C.A. (1968). The protein subunits of potato virus X. *Virology.* 36, 168-173.
- Moreira, A., Jones, R.A.C. and Fribourg, C.E. (1980). Properties of a resistance breaking strain of potato virus X. *Annals of Applied Biology.* 95, 93-103.
- Morozov, S.Y., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* 29, 52-62.
- Morozov, S.Y., Lukasheva, L.I., Chernov, B.K., Skryabin, K.G. and Atabekov, J.G. (1987). Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Letts.* 213, 438-442.
- Nelson, C.A. (1971). The binding of Detergents to Proteins. *J. Biol. Chem.* 246, 3895-3901.
- O'Connell, B.C., Hagen, F.K. and Tabak, L.A. (1992). The Influence of Flanking Sequence on the O-Glycosylation of Threonine *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry.* 267, 25010-25018.
- Orman, B., Celnik, R.M., Mandel, A.M., Torres, H.N. and Mentaberry, A.N. (1990). Complete cDNA sequence of South American isolate of potato virus X. *Virus Research.* 16, 293-306.
- Pacha, R.F., Allison, R.F. and Ahlquist, P. (1990). Cis-acting sequences required for *in vivo* amplification of genomic RNA 3 are organized differently in related bromoviruses. *Virology.* 174, 436-443.
- Padgett, H.S. and Beachy, R.N. (1993). Analysis of a Tobacco Mosaic Virus Strain Capable of Overcoming N Gene-Mediated Resistance. *The Plant Cell.* 5, 577-586.
- Panyin, S. and Chalkley, R. (1971). The molecular weights of vertebrate histones exploiting a modified sodium dodecyl sulfate electrophoresis method. *J. Biol. Chem.* 246, 7557-7560.
- Partridge, J.E., Shannon, L.M., Gumpf, D.J. and Colbauch, P. (1974). Glycoprotein in the Capsid of Plant Viruses as a Possible Determinant of Seed Transmissibility. *Nature.* 247, 391-392.
- Paul, H.L. (1974). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Virion Proteins as a Tool for detecting the Presence of Virus in Plants. *Journal of Phytopathology.* 80, 330-339.
- Petty, I.T.D. and Jackson, A.O. (1990a). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA b. *Virology.* 179, 712-718.
- Pitt-Rivers, R. and Ambesi Impiobato, F.S. (1968). The binding of Sodium Dodecyl Sulphate to various Proteins. *J. Biol. Chem.* 109, 825-830.

- Price, M. (1992). Examination of Potato Virus X Proteins Synthesized in Infected Tobacco Plants. *Journal of Virology*. *66*, 5658-5661.
- Price, M. (1993). Multipartite Nature of Potato Virus X. *J. of Virology*. *67*, 596-600.
- Querci, M. (1993b). Molecular characterization of potato virus X: development of detection and identification of resistance-breaking capacity of strain HB. PhD. Tesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Querci, M., van der Vlugt, R., Goldbach, R. and Salazar, L.F. (1993a). RNA sequence of potato virus X strain HB. *J. Gen. Virol.* *74*, 2251-2255.
- Raleigh, W.P. (1936). An abnormal graft reaction in potato resulting from virus infection scion on a resistant stock. *Phytopathology*. *26*, 795-796.
- Redman, K.L. and Rubenstein, P.A. (1984). Actin Amino-Terminal Acetylation and Processing in a Rabbit Reticulocyte Lysate. *Methods in Enzymology*. *106*, 179-192.
- Ricciardi, R.P., Goodman, R.M. and Gottlieb, D. (1978). Translation of PVX RNA in vitro by wheat Germ. *Virology*. *85*, 310-314.
- Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. (1991). RFLP mapping on potato chromosome of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* *227*, 81-85.
- Ross, H. (1986). Potato breeding: problems and perspectives. *In Advances in Plant Breeding - Supplements to Journal of Plant Breeding*, ed). (Verlag Paul Parey, Berlin - Hamburg), Pages.
- Rozendaal, A. (1966). Potato grafting as a source of virus strains dangerous for the potato crop. Third Triennial Conference of the European Association for Potato Research. 231-233.
- Rupasov, V.V., Morozov, S.Y., Kanyuka, K.V. and Zavriev, S.K. (1989). Partial nucleotide sequence of potato virus M RNA shows similarities to potexviruses in genome arrangement and the encoded amino acid sequences. *J. Gen. Virol.* *70*, 1861-1896.
- Russell, G.E. (1978). Plant breeding for pest and disease resistance. ed). (Butterworths, London), Pages.
- Sacher, R. and Ahlquist, P. (1989). Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic spread. *J. Virol.* *63*, 4545-4552.
- Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1987). Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *84*, 6074-6077.
- Saito, T., Yamanaka, K. and Okada, Y. (1990). Long distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology*. *176*, 329-336.

- Saladrigas, M.V., Ceriani, M.F., Tozzini, A.C., Arese, A.I. and Hopp, H.E. (1990). Potato Gene Xi Confers Inoculum Dependent Resistance to Potato Virus X Replication in Protoplasts. *Plant Cell Physiology*. *36*, 749-755.
- Salaman, R.N. (1938). The potato virus "X". Its strains and reactions. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*. *229*, 137-217.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A laboratory manual*. ed). (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), Pages.
- Santa Cruz, S. and Baulcombe, D.C. (1993). Molecular Analysis of Potato Virus X Isolates in Relation to the Potato Hypersensitivity Gene Nx. *Molec. Plant-Microbe Interaction*. *6*, 707-714.
- Sarkar, S. and Smitana, P. (1981). A truly coat-protein-free mutant of tobacco mosaic virus. *naturwissenschaften*. *68*, 145-147.
- Shaw, J.G., Plaskitt, K.A. and Wilson, T.M.A. (1986). Evidence that Tobacco Mosaic Virus Particles Disassemble Cotranslationally *in Vivo*. *Virology*. *148*, 326-336.
- Siegel, A., Zaitlin, M. and Seghal, O.P. (1962). The isolation of defective tobacco mosaic virus strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *48*, 1845-1851.
- Skryabin, K.G., Morozov, S.Y., Kraev, A.S., Rozanov, M.N., Chernov, B.K., Lukasheva, L.I. and Atabekov, J.G. (1988a). Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Letts*. *240*, 33-40.
- Sojar, H.T. and Bahl, O.P. (1987). A Chemical method for the Deglycosylation of Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. *259*, 52-57.
- Staskawicz, B., Ausubel, F.M., Baker, B., Ellis, J.G. and Jones, D.G. (1995). Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science*. *268*, 661-667.
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. and Okada, Y. (1987). Expression of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J*. *6*, 307-311.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M. and Plummer, T.H. (1985). Deglycosylation of Asparagine-Linked Glycans by Peptide: N-Glycosidase F. *Biochemistry*. *24*, 4665-4671.
- Tavantzis, S.M. and Southard, S.G. (1983). Incidence of potato virus X in foundation and certified seed of seven cultivars. *Plant Disease*. *67*, 959-961.
- Tozzini, A.C. (1994b). Identificación y caracterización de mecanismos de resistencia al virus X de la papa en germoplasma de *Solanum*. Tesis Magister Scientiae. Escuela para graduados, Facultad de Agronomía UBA.
- Tozzini, A.C., Ceriani, M.F., Cramer, P., Palva, E.T. and Hopp, H.E. (1994a). PVX MS - a new strain of potato virus X that overcomes the extreme resistance gene Rx. *J. Phytopath.* *141*, 241-248.
- Tozzini, A.C., Ceriani, M.F., Saladrigas, M.V. and Hopp, H.E. (1991). Extreme resistance to infection by potato virus X in genotypes of wild tuber-bearing *Solanum* species. *Potato Research*. *34*, 317-324.

- Trimble, R.B. and Maley, F. (1984). Optimizing Hydrolysis of N-Linked High-Mannose Oligosaccharides by Endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *Analytical Biochemistry*. *141*, 515-522.
- Tsunasawa, S. and Sakiyama, F. (1984). Amino-Terminal Acetylation of proteins: An Overview. *Methods in Enzymology*. *106*, 165-170.
- Tung, J.-S. and Knight, C.A. (1972). Relative importance of some factors affecting the electrophoretic migration of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* *48*, 153-163.
- Vance, V.B. (1991). Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology*. *182*, 486-494.
- Verduin, B.J.M. (1992). Early interactions between viruses and plants. *Seminars in Virology*. *3*, 423-431.
- Webb, R.E. and al., e. (1978). Atlantic: a new potato variety with high solids, good processing quality, and Resistance to Pests. *Am. Pot. J.* *55*, 141-145.
- White, A., Handler, P. and Smith, E. (1964). *Principles of Biochemistry*. ed). Pages.
- Wiersema, H.T. (1972). Breeding for Resistance. *In* *Viruses of Potatoes and Seed potato production*, J.A. Bokx, ed). Wageningen), 174-187.
- Wilson, T.M.A. (1984). Cotranslational Disassembly of Tobacco Mosaic Virus *in vitro*. *Virology*. *137*, 255-265.
- Wodnar-Filipowicz, A., Skrzeczkowski, L.J. and Filipowicz, W. (1980). Translation os potato virus X RNA into high molecular weight proteins. *FEBS Letters*. *109*, 151-155.
- Wold, F. (1981). *In vivo* Chemical modification of proteins (Post-Translational Modifications). *Ann. Rev. Biochem.* *50*, 783-814.
- Zimmern, D. and Wilson, T.M.A. (1976). Location of the origin for viral assembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragment formation. *FEBS Letts*. *71*, 294-298.
- Zuidema, D., Linthorst, H.J.M., Huisman, M.J., Asjes, C.J. and Bol, J.F. (1989). Nucleotide sequence of narcissus mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* *70*, 267-276.

Agradecimientos

Como siempre esta sección queda para último momento y entre apuros y otras yerbas seguro que uno se olvida de agradecer a quien más se lo merece.

A Esteban, director que da consejos, más que director es un amigo

Al Dr. Palma por favorecer siempre el trabajo de investigación en el Instituto de Biotecnología.

A Caro, mi becaria predilecta, por su comprensión y ayuda

A los paperos, Ceci, Sebas, Tere y Andrea....y por que no a Mariana (ex-papera)

a los ex, Ferce, Paula, Diego, Magda y Dino (secuenciador).

A todos los plantólogos del IB en general, Susi, Marcela, Daniela, Fer, Mercedes y al resto del bosque

A los integrantes del IB: Silvio, Osvaldo, Oscarta, Laurita, Alicia, Ceci T., Lela, Angel,... y a el resto de malón

A las chicas de la cocina

A Mantenimiento (Cristo, Rocha y Lucio) por que siguen manteniendo la maquina en funcionamiento

Al personal administrativo del CICV, que también supo hacer los suyos en colaboración con esta tesis también.

A los plantólogos del INGEBI (Mentaberry's group)

Al Dr. Tapio Palva y su magnífica gente por la colaboración recibida durante mi estadía en Suecia.

A Bosse Ek, proteinólogo de ley

A la oficina SAREC del gobierno sueco por haber financiado mi estadía y trabajo en la Universidad Sueca de Ciencias Agrarias.

Al Dr. Balumelli, por cortarme y enyesarme la mano derecha para que termine de una vez de escribir esta tesis

A mis viejos, por su apoyo, paciencia y subsidio durante todos estos años de investigación en el país y en Suecia.

Y a Analía, que aca, en Suecia o en USA, estuvo y estará conmigo ayudandome hasta en el último detalle

A todos, muchisimas gracias!